

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651090

研究課題名(和文)新規モノマー導入型ポリマーの微生物合成を実現するモノマー供給酵素の進化工学的創成

研究課題名(英文) Evolutionary engineering based creation of monomer-supplying enzyme that allows the microbial synthesis of new monomer-incorporated polymers

研究代表者

田口 精一 (TAGUCHI, SEIICHI)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70216828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本プロジェクトでは、PHA微生物ポリマーの重合酵素に焦点を当て、その基質特異性を改変することで新規ポリマーを合成することを基盤としている。これまでは、重合酵素改変の最大の成果として従来重合が不可能であった乳酸の取り込みが挙げられる。この際、乳酸CoA体の合成に関与するCoA転移酵素の反応性が鍵となっていた。そこで、2位に水酸基を有する乳酸類似体であるグリコール酸の取り込み能力およびCoA活性化の検証とポリマー合成向上に有効な因子の探索に移行した。グリコール酸を外部添加し微生物培養したところ、確かにグリコール酸ユニットが取り込まれ、その分率も添加したグリコール酸濃度に依存していた。

研究成果の概要(英文)：This study is based on the microbial system for production of the new type polymer s by polymerizing enzyme with altered substrate specificity. So far the most fascinating achievement is the first incorporation of lactic acid as a monomer into the polymer through engineering the polymerase. Upon the project, the reactivity of CoA-transferase towards new monomers such as lactic acid should be a key for the synthesis of monomer CoA forms. Glycolic acid is a second target monomer bearing 2-OH. Through engineering the CoA transferase as well as polymerase, the incorporation of glycolic acid into the polymeric backbone was demonstrated by using the microbial system carrying engineered enzymes. The fraction of glycolic acid was increased depending on the increase in the glycolic acid concentration.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：新規モノマー 基質特異性 モノマー組成 ポリマー物性 乳酸ポリマー 微生物工場 CoA転移酵素 重合酵素

1. 研究開始当初の背景

再生可能な植物バイオマス資源から微生物の物質変換能力を利用して合成されるバイオベースポリマーである PHA (ポリヒドロキシアルカン酸) は、モノマー構成ユニットとして 150 種類以上が知られ、その構造・機能多様性が大きな特徴である。特に、構成するモノマーユニットは、立体化学的に全て R 体であり、ポリマーとしての光学純度は極めて高い。我々は、これまでポリマー合成の鍵となる PHA 重合酵素に焦点を当てて進化学アプローチにより分子改変を実施し、乳酸重合酵素 (LPE) の発見に至った。この新規エンジニアリング酵素は、乳酸と同様に 2 - ヒドロキシアルカン酸モノマーを重合可能か? に興味をもたれた。また、同時にその前提として 2 - ヒドロキシアルカン酸モノマーの CoA 活性化に関わる CoA 転移酵素のターゲットモノマーに対する反応性が鍵となっていた。

2. 研究の目的

乳酸に続く新規 2 - ヒドロキシアルカン酸モノマーの導入可能な系を構築し、新規ポリマーの創製を目的とした。そのためには、重合酵素に加えモノマー供給酵素の基質特異性が重要であり、既存の CoA 転移酵素の詳細な酵素学的性質を調べることが必要である。場合によっては、重合酵素と同様に分子改変する。

3. 研究の方法

ポリマー生産宿主として、大腸菌株の JM109 と乳酸高蓄積変異体 JW0885 を使用した。細胞内発現遺伝子として、3HB-CoA 供給に関与する 2 種の酵素 (PhaA/B) と LA-CoA 供給に関わる CoA 転移酵素 PCT をコードする遺伝子を発現ベクターに挿入して使用した。遺伝子操作や変異体作成が適正に進行しているかは、DNA 配列分析によりチェックした。グリコール酸は系外から濃度希釈系列を考慮して添加した。ポリマーの細胞からの抽出は、クロロフォルムに溶解後、エタノール沈殿にて行った。ポリマー含量は HPLC および GC、分率は GC、GC/MS および NMR、分子量は GPC、モノマー配列は NMR、熱的性質は DSC、機械的物性は、引っ張り試験機を使用して測定・分析した。また、重合酵素の精製・活性測定は、既報にしたがって行った。測定の際、コントロールサンプルとして、化学合成 PLA も使用し、微生物合成ポリマーとの比較に使用した。LPE および PCT の進化学実験は、エラープローン PCR 法 (突然変異) と色素含有培地をベースとしたプレートアッセイ法 (スクリーニング) を利用した。

4. 研究成果

乳酸ポリマー合成は、微生物細胞内でモノマー供給酵素およびモノマー重合酵素の連携が作動すること成立する。そこで、まずモ

ノマーの前駆体 (初発原料) である乳酸の合成は、内在性の LDH によって起こる。使用した大腸菌では、R 体の乳酸が生成することから、R 体乳酸モノマーに対して極めて高い選択的反応性を有する重合酵素にとっては最適である。また、lactyl-CoA (LA-CoA) の供給酵素であるプロピオニル CoA 転移酵素 (PCT) 遺伝子を大腸菌に導入し、CE/MS 分析によって、LA-CoA の生産を確認した。続いて、LA-CoA を重合可能な乳酸重合酵素を *in vitro* ポリマー合成系によって探索することにした。本研究では、第二の 2 - ヒドロキシアルカン酸であるグリコール酸をターゲットに、多種の PHA 重合酵素を利用してその CoA 体活性化能力を評価する系を立ち上げた。結果、*in vitro* ポリマー合成系においては、LA-CoA と同様にグリコール酸 CoA への転換は可能であることがわかった。つまり、天然の PCT 酵素で微弱ながら CoA 活性化が実現した。本発見は、デザインしたポリマー合成システムを作動させるための第二のプレイクスルーであった。しかし、グリコール酸 CoA 供給遺伝子のみを導入した場合は、*in vitro* ポリマー合成系の場合と同様に、純粋なグリコール酸ホモポリマーは検出されなかった。一方、グリコール酸 CoA および 3HB-CoA 供給遺伝子を導入した場合にのみ、グリコール酸ユニットの取り込みが認められ、3HB ユニットとの共重合体が合成された。

さらに、新規乳酸重合酵素の創製に取り組むことで、同時にグリコール酸の取り込み能力が強化されるかに取り組んだ。本システムにおいて、高 LA 分率の乳酸ベースポリマーを効率的に生産するためには、先に行った LA モノマー供給の増強という方法以外に、ポリマーを直接重合している重合酵素の LA 重合能力を向上させるという方法が考えられる。そこで、新規の変異を乳酸重合酵素に導入することで、重合酵素の LA-CoA に対する基質特異性を増強することを目指した。これまでに唯一見つかった乳酸重合酵素は、野生型 PHA 重合酵素の 3HB-CoA 重合能を向上させる変異を 2 つ導入した 2 重変異体であった。本知見から、PHA 重合酵素における 3HB-CoA 重合能力をさらに向上させれば、LA-CoA 重合能力の増強につながるのではないかと考えた。そこで、3HB-CoA 重合能を向上させると報告されていた新規の変異を乳酸重合酵素に導入し、好気培養条件下で、従来の乳酸重合酵素よりも、LA 分率およびポリマー蓄積率が向上した新規乳酸重合酵素を創製した。さらに、本研究で見出した新規変異点におけるアミノ酸飽和変異導入を行うことで、16~45 mol% と幅広い範囲で LA 分率が調節された P(LA-co-3HB) を、再現性よく、高蓄積に微生物合成することができた。以上、乳酸分率を制御できる新たな LPE 酵素群を創出することに成功している。問題は、S 体選択的反応を示す PCT 酵素と LPE の創出は、これから本格的に移行できるステージまで

進んだ。

種々の乳酸およびグリコール酸の分率を有する合成ポリマーを精製し、基礎的な熱的性質を調べたところ、乳酸分率およびグリコール酸の向上に伴いガラス転移温度の上昇が見られた。また、共重合化することで、期待通り軟質性が増すことも初めて明らかとなった。

以上、本研究の成果のインパクトを列挙する。(1)構築した微生物工場により、乳酸につづき同じく2-ヒドロキシアルカン酸であるグリコール酸新規モノマーを導入した新規グリコール酸ポリマーを合成することに成功した。(2)合成されたグリコール酸ポリマーから成形したフィルムは半透明性を示し、機械的特性として硬質の3HBホモポリマーよりも柔軟性を獲得していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)全て査読有

- (1) A. Ochi, K. Matsumoto, T. Ooba, K. Sakai, T. Tsuge, S. Taguchi: Engineering of class I lactate-polymerizing polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* that synthesize lactate-based polyester with a block nature, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 3411-3447, (2013).
- (2) J. M. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved lactate-polymerizing enzyme, *Metab. Eng.*, **15**, 159-166, (2013).
- (3) Y. Song, K. Matsumoto, T. Tanaka, A. Kondo, S. Taguchi: Single-step production of polyhydroxybutyrate from starch by using α -amylase cell-surface displaying system of *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 12-14, (2013).
- (4) K. Matsumoto, T. Okei, I. Honma, T. Ooi, H. Aoki, S. Taguchi: Efficient (R)-3-hydroxybutyrate production using acetyl-CoA regenerating pathway catalyzed by coenzyme A transferase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 205-210, (2012).
- (5) J. Sun, K. Matsumoto, J. M. Nduko, S. Taguchi: Biosynthesis, physical properties and enzymatic degradation of isotactic (R)-2-Hydroxybutyrate-based polyester, *Frontier Chemistry Center International Symposium 2013 "Advanced Materials Science"*, Sapporo, 2013.12.9.
- (6) J. M. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: Efficient production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using hemicellulose-derived sugar, xylose, in engineered *Escherichia coli* overexpressing a galactitol transporter, *Frontier Chemistry Center International Symposium 2013 "Advanced Materials Science"*, Sapporo, 2013.12.9.
- (7) 後藤早希, 佐藤美咲, 田中賢, 松本謙一郎, 田口精一, 松崎弘美: *Lactobacillus acetotolerans* HT株の乳酸脱水素酵素遺伝子のクローニングと乳酸ユニットを含む生分解性プラスチックの生合成, 日本生物工学会九州支部佐賀大会, 佐賀, 2013.12.7.
- (8) K. Matsumoto, J. Sun, S. Taguchi: Microbial synthesis of isotactic P(2-hydroxybutyrate) from racemic precursor and its property analysis, *The 13th Pacific Polymer Conference*, Taiwan, 2013.11.24.
- (9) 門屋亨介, Y. Song, 飛谷康太, 松本謙一郎, 田中勉, 近藤昭彦, 田口精一: デンプンを炭素源に用いたポリ乳酸様ポリマーの合成, 日本生物工学会大会, 広島, 2013.09.20.
- (10) 三宅政裕, 寺井彩月, 松本謙一郎, 加藤泰三, 岩田忠久, 田口精一: 2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの微生物合成とその物性解析, 日本生物工学会大会, 広島, 2013.09.20.
- (11) 斯波哲史, 松本謙一郎, 田口精一: 糖を利用した組換え大腸菌でのグリコール酸ベースポリマーの生産, 日本生物工学会大会, 広島, 2013.09.20.
- (12) 松本謙一郎, 越智杏奈, 大場貴史, 高谷真宏, 田口精一: ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の機能改変によるポリマー構造制御, 日本生物工学会大会, 広島, 2013.09.20.
- (13) 門屋亨介, Y. Song, 飛谷康太, 松本謙一郎, 田中勉, 近藤昭彦, 田口精一: コリネ菌の細胞表面提示技術を用いたデンプンからの乳酸様ポリマーの生産, 日本農芸化学会北海道支部夏季シンポジウム, 旭川, 2013.08.10.
- (14) 飛谷康太, 笹森哲弥, 松本謙一郎, 田口精一: 組換えコリネ型細菌によるポリ乳酸様ポリマー生産の増強, 日本農芸化学会北海道支部夏季シンポジウム, 旭川, 2013.08.10.
- (15) 飛谷康太, 宋育陽, 松本謙一郎, 田口精一: *Corynebacterium glutamicum*をプラットフォームとしたポリ乳酸様ポリマー合成系の効率化のための代謝工学および培養工

1. [学会発表等](計44件)(代表的な発表を掲載)

1. 一般講演(計27件)

- (1) 三宅政裕, 松本謙一郎, 寺井彩月, 加部泰三, 岩田忠久, 田口精一: 微生物を利用したキラル P(2-ヒドロキシ酪酸)の合成とポリマー解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 東

- 学的アプローチ、日本農芸化学会 2013 年度大会、仙台、2013.03.27.
- (13) 青木駿介、大場貴史、越智杏奈、松本謙一郎、田口精一: 改変型重合酵素による 2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの生合成と物性解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、仙台、2013.03.27.
- (14) 越智杏奈、大場貴史、坂井浩平、松本謙一郎、柘植丈治、田口精一: *Ralstonia eutropha* 由来 PHA 重合酵素の改変による 2-ヒドロキシブタン酸重合能力の強化、日本農芸化学会 2013 年度大会、仙台、2013.03.27.
- (15) 越智杏奈、大場貴史、坂井浩平、松本謙一郎、柘植丈治、田口精一: *Ralstonia eutropha* 由来ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の改変による Class I 乳酸重合酵素の創出、農芸化学会北海道支部 学術講演会、札幌、2012.11.3.
- (16) 寺井彩月、石山絢子、松本謙一郎、田口精一: 2-ヒドロキシブタン酸ベース新規バイオプラスチックの微生物合成と物性解析、日本生物工学会大会、神戸、2012.10.24.
- (17) 松本謙一郎、宋育陽、大井俊彦、田中勉、近藤昭彦、田口精一: 糖質バイオマスから多様なポリエステルを生産するコリネ菌微生物工場の開発、日本生物工学会大会、神戸、2012.10.24.
- (18) 大場貴史、越智杏奈、坂井浩平、松本謙一郎、柘植丈治、田口精一: 乳酸重合活性を有する Class I ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 重合酵素の創出、日本生物工学会大会、神戸、2012.10.24.
- (19) K. Matsumoto, S. Taguchi: Expanding microbial polyesters: syntheses and properties, ISBP2012, Cairns, Queensland, Australia, 2012.10.7-10.
- (20) J. Sun, A. Ochi, K. Matsumoto, T. Ooba, K. Sakai, T. Tsuge, S. Taguchi: Engineering of class I polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha* for acquiring lactate-polymerizing ability, ISBP2012, Cairns, Queensland, Australia, 2012.10.7-10.
- (21) Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada, S. Taguchi: Biosynthesis of lactate-based polyester using engineered *Corynebacterium glutamicum* as a whole cell catalyst, ISBP2012, Cairns, Queensland, Australia, 2012.10.7-10.
- (22) A. Ochi, K. Matsumoto, T. Ooba, K. Sakai, T. Tsuge, S. Taguchi: Engineered class I lactate-polymerizing polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase from *Ralstonia eutropha*, 15th IBS, Daegu, Korea, 2012.09.18.
- (23) J. M. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: Efficient bioconversion of lignocellulosic biomass-derived sugars into poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) by metabolically engineered *Escherichia coli.*, 15th IBS, Daegu, Korea, 2012.09.18.
- (24) N. J. Masani, K. Matsumoto, S. Taguchi: Biosynthesis and properties of advanced biopolymers containing lactate by metabolically engineered bacteria, The 244th ACS National Meeting & Exposition, Philadelphia, Pennsylvania, 2012.08.19-23.
- (25) J. M. Nduko, K. Matsumoto, Y. Song, S. Taguchi: Microbial plastic factory: Synthesis and properties of the new lactate-based and related biopolymers, The 244th ACS National Meeting & Exposition, Philadelphia, Pennsylvania, 2012.08.19-23.
- (26) Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada, S. Taguchi: Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform for lactate-based polyester production, Japan-Chica-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kanazawa, 2012.05.30.
- (27) J. M. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: Lactate-based polyesters production by recombinant bacteria using lignocellulosic biomass sugars as carbon sources, Japan-Chica-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kanazawa, 2012.05.30.

2. 招待講演等 (計 17 件)

- (1) 松本謙一郎、前田理久、田口精一: "バイオマスから高効率で乳酸プラスチックを生産する微生物工場の開発とポリマー物性評価", 日本農芸化学会 2014 年度 (平成 26 年度) 大会シンポジウム、明治大学、平成 26 年 3 月 30 日
- (2) S. Taguchi: Microbial Plastic Factory: Biosynthesis and Properties of the Lactate-based and Related Polymers from Renewable Carbon Sources, International Symposium for Green-Innovation Polymers (GRIP2014), Ohmicho Kouryu Plaza, Kanazawa, Japan, 2014.03.7.
- (3) 田口精一、田中歩: "夢の"プラ"ライフ ~ 二酸化炭素を資源に ~", 第 74 回サイエンス・カフェ札幌、紀伊國屋書店札幌本店 1 F インナーガーデン、平成 26 年 2 月 16 日
- (4) S. Taguchi: Microbial Plastic Factory towards Sustainable Industry, Joint Symposium on Environmental Science 2013 -Bridging Finland and Japan-, auditorium 1, Korona Information Centre and B-Building, Viikki Campus, University of Helsinki, Finland, 2013.11.27.
- (5) K. Matsumoto, S. Taguchi: Properties of Newly Biosynthesized Lactate-based Polymers and Related Polymers, ICBP2013-The 3rd International Conference on Bio-based polymers 2013, Hanyang Institute of Technology, Seoul, Korea, 2013.09.26.

- (6) 松本謙一郎、森本健二郎、大場貴史、横尾俊憲、田口精一：“微生物産生ポリエステル植物の植物合成 -植物の脂質代謝系はポリエステル合成に利用できるか-”、第26回植物脂質シンポジウム、北海道大学学術交流会館、平成25年9月15日
- (7) S. Taguchi: Microbial Plastic Factory: Lactate-based Polymers Production, Singapore Catalysis Society, 6th Annual Forum, Matrix Building, Biopolis, Singapore, 2013.05.
- (8) 田口精一：“モノ作りのための合成生物学*微生物ポリマーのケース(他)”(招待講演)協和発酵バイオ株式会社技術研究所講演会、大会議室、防府市、山口県、平成25年4月23日
- (9) 松本謙一郎、田口精一：“微生物ポリエステル合成系酵素の機能改変と多元ポリ乳酸の創製”、日本農芸化学会2013年度(平成25年度)大会シンポジウム、東北大学、平成25年3月30日
- (10) 田口精一：“Microbial Plastic Factory 生体触媒開発によって実現する多元ポリ乳酸微生物生産システム”(招待講演)第34回生体触媒化学シンポジウム、生体触媒化学学会、富山県民会館大会議室、平成24年11月29日
- (11) 田口精一：“Microbial Plastic Factory バイオと化学のクロスオーバー”(招待講演)産業技術総合研究所関西センター、大会議室、平成24年11月20日
- (12) 田口精一：“Microbial Plastic Factory バイオと化学のクロスオーバー”(依頼講演)東京理科大学大講義室室、平成24年10月29日
- (13) K. Matsumoto, S. Taguchi: “Expanding microbial polyesters: syntheses and properties”, (Invited Lecture), ISBP 2012, International Symposium on Biopolymers, Pulluman Reef Hotel, Queensland, Australia, 2012.10.07-10.
- (14) S. Taguchi, K. Matsumoto, M. Yamada, Y. Song, J. Nduko, Microbial Plastic Factory: "New Lactate-based and Related Biopolymers"(Invited Lecture), International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials, Nice, France, 2012.10.4.
- (15) S. Taguchi: “Creation of Bio-based Polymers Based on Biological Systems” (Plenary Lecture), International Union of Materials Research Sciences-International Conference on Electronic Materials 2012 (IUMRS-ICEM 1012), Pacifico Yokohama, 2012.09.23-28.
- (16) S. Taguchi: “Biosynthesis and precise characterization of bio-based polymers containing 2-hydroxyalkanoates: lactate, glycolate and 2-hydroxybutyrate”, (Invited Lecture, ACS National Meeting in Philadelphia, PA on "Green Polymer

Chemistry: Biocatalysis and Biobased Materials." 2012.08. 19-23.

- (17) 田口精一：“バイオを駆使した環境調和型プラスチックの創製：微生物生産から植物生産へ”(招待講演)高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、平成24年5月29日～31日

〔図書〕(計5件)

- (1) 田口精一：進化分子工学：「機能向上：産業酵素と抗菌ペプチド」、高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発(エヌ・ティ・エス出版)、pp.237-245、2013年10月 ISBN-13: 978-4-7813-0271-3
- (2) T. Hiraiishi, S. Taguchi: “Protein Engineering of Enzymes Involved in Bioplastic Metabolism”, Protein Engineering -Technology and Application, INTECH, pp. 133-165, 2013.05 ISBN 978-953-51-1138-2
- (3) T. Iwata, T. Tsuge, S. Taguchi: Polyhydroxyalkanoate", Handbook of R&D Information Japan, Bio-Based Polymers, Supervised by Y. Kimura, CMC Publishing, pp. 71-85, 2013.02. ISBN-13: 978-4-7813-0271-3
- (4) 松本謙一郎、田口精一：細胞システム工学「バイオポリエステルの生産システム工学」、生命システム工学(化学同人)、pp. 177-204、2013年1月 ISBN-9784759815061
- (5) J. M. Nduko, K. Matsumoto, S. Taguchi: “Biological Lactate-Polymers Synthesized by One-Pot Microbial Factory: Enzyme and Metabolic Engineering”, Biobased Monomers, Polymers, and Materials, ACS Symposium Series Vol. 1105, Edited by Patrick B. Smith, Richard A. Gross, American Chemical Society, pp. 215-2351 2012.08.20. ISBN-13: 9780841227675

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/](http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/TOP.html)
TOP.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 精一 (TAGUCHI SEIICHI)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70216828

(2) 研究分担者

なし。 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし。 ()

研究者番号：