

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25292058

研究課題名(和文)優れた共重合ポリエステル生産菌の分子育種と次世代型ポリエステル生合成経路の構築

研究課題名(英文) Metabolic engineering of polyester-producing bacterium for establishment of efficient biosynthesis pathways of biopolyesters

研究代表者

福居 俊昭 (FUKUI, TOSHIAKI)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：80271542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を環境低負荷型高分子素材として実用化するには、物性の優れた共重合PHAを低コストで生産する必要がある。本研究では*Ralstonia eutropha*改変株によるポリ(3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシヘキサン酸)[P(3HB-co-3HHx)]生合成について、脂肪酸酸化経路の改変による植物油原料からの生合成経路の改善、糖質原料からの生合成を可能とする人工代謝経路の構築、メタボロミクスによる代謝解析、利用可能炭素源の拡張を検討し、次世代型バイオプラスチック生合成技術の確立に向けた知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Bacterial polyhydroxyalkanoates has been attracted much attention as bio-based eco-friendly polymeric materials. This study focused on biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from inexpensive biomass resources by engineered strains of *Ralstonia eutropha*. The biosynthesis from vegetable oils was improved by modification of beta-oxidation pathway, and an artificial pathway was established for the biosynthesis from structurally unrelated sugars. Metabolomic analysis was performed to obtain knowledge for the global metabolisms. Finally, the range of utilizable carbon sources by this bacterium was expanded by metabolic engineering. These results are expected to be useful for establishment of low-cost microbial production of PHAs with superior properties.

研究分野：微生物工学

キーワード：生分解性プラスチック バイオマスプラスチック ポリヒドロキシアルカン酸 *Ralstonia eutropha*
代謝工学

1. 研究開始当初の背景

プラスチックは安価で丈夫な材料であることから現代社会には必須となっているが、そのほとんどは石油から合成されていることに加え、難分解性であるために廃棄や環境に流出した際の処理が問題となっている。プラスチックによる地球環境への負荷の軽減、および低炭素社会への転換を達成するためにはバイオマスを原料とし、かつ、自然界の微生物によって分解される生分解性バイオマスプラスチックの開発と実用化が望ましい。

微生物の中にはエネルギー貯蔵物質としてポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を合成し蓄積するものが知られている。この微生物ポリエステルは生産原料として糖や植物油などを利用できる生分解性バイオマスプラスチックであることから、環境低負荷型プラスチックとして期待されている。しかし代表的な PHA であるポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] は硬く脆い高結晶性高分子であるために材料としての実用化は困難であり、物性向上と効率的生合成によるコストダウンが必須である。

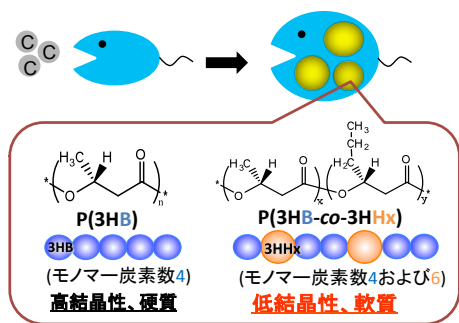


Fig. 1. P(3HB) および P(3HB-co-3HHx) の構造と特徴

我々はこれまでに、柔軟性に優れた共重合 PHA であるポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-co-3HHx)] (Fig. 1) の微生物合成について研究を行い、P(3HB)生産菌 *Ralstonia eutropha* H16 株の代謝改変により適度な柔軟性を示す P(3HB-co-10 mol% 3HHx) を大豆油から生産する組換え株を作製した。一方で、植物油と並ぶ莫大なバイオマス資源である糖質を炭素源とした P(3HB-co-3HHx) の効率的生合成は未達成であった。これまでに *R. eutropha* の糖代謝を改変した人工 P(3HB-co-3HHx) 生合成経路を設計し導入したが、生産量および C₆ ユニット分率ともに低く、改善が必要であった。

2. 研究の目的

微生物を用いたバイオマス資源からのバイオプラスチック生産技術の確立に向け、本研究では *R. eutropha* を対象とし、各種の炭素源から共重合 PHA を生合成する人工代謝経路の改善および利用可能な炭素源の拡張などにより、実用用途に適した PHA 共重合体を多様な炭素源から効率生産が可能な組換え株の分子育種を目的とした。

3. 研究の方法

以前に作製した *R. eutropha* P(3HB-co-3HHx) 生合成株をベースに、各種炭素源の代謝経路、および C₆ モノマーである 3HHx-CoA を生合成し共重合体する人工代謝経路について、経路で機能する酵素の遺伝子導入、および必要に応じて遺伝子破壊を行った。作製した組換え株について、各種炭素源を添加した窒素源制限無機塩培地で培養し、生育および菌体内 PHA の蓄積を測定した。また、キャピラリー電気泳動-質量分析 (CE-MS/MS) による *R. eutropha* のメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

1) 植物油炭素源からの P(3HB-co-3HHx) 生合成

植物油を炭素源とした *R. eutropha* による PHA 生合成においては、脂肪酸β-酸化経路の中間体である 2-ヘキセノイル-CoA の (R)-選択的水和反応によって C₆ モノマーである (R)-3HHx-CoA が供給される。このことから、*R. eutropha* での脂肪酸β-酸化経路を理解し、改変することでより優れた生産株を育種できることが考えられる。*R. eutropha* H16 株のゲノム情報では、脂肪酸β-酸化経路中で機能する二機能酵素 (S)-2-エノイル-CoA ヒドラターゼ / (S)-3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼとして 3 種の候補 (FadB1, FadB2, FadB') が存在していた。そこでこれら候補遺伝子の単独・二重・三重の各遺伝子破壊株を作製し、その大豆油炭素源からの PHA 生合成を評価したところ、本菌のβ-酸化経路では FadB1 と FadB' の 2 つが重要な役割を果たしていることを見出した。P(3HB-co-3HHx) 生合成株について *fadB1* 破壊した株では大豆油からの PHA 生産量を低下させることなく 3HHx 組成が約 1 mol% 増加しており、本改変が 3HHx 分率がより高い共重合体の生合成に有用であることを示した (Fig. 2) (発表論文 1)。

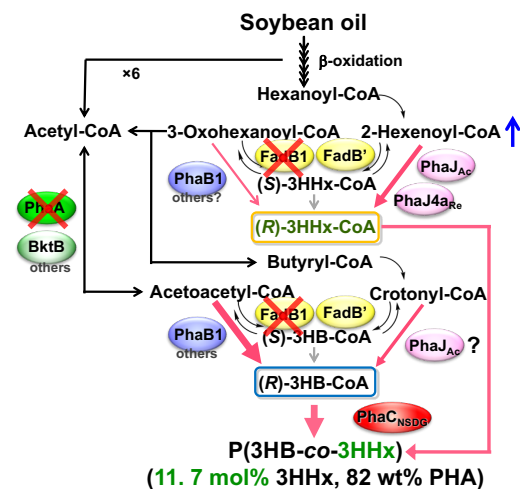


Fig. 2. *R. eutropha* 改変株による大豆油原料からの P(3HB-co-3HHx) 生合成

2) 糖質炭素源からの P(3HB-co-3HHx) 生合成

我々は以前に、糖質に由来するアセチル-CoA 3 分子から C₆ 中間体を生成して P(3HB-co-3HHx) を生合成することを考え、クロトニル-CoA をブチリル-CoA に変換する放線菌由来クロトニル-CoA 還元酵素 (Ccr) の導入を含む改変を *R. eutropha* に導入したところ、フルクトース炭素源から 1.2~1.6 mol% の 3HHx ユニットを含む共重合体を生合成した。設計した経路は確かに機能していたものの、その代謝フラックスは十分でなく、ポリマー物性に重要な 3HHx 分率が低いことが課題であった。

本研究では宿主とする *R. eutropha* 株について検討したところ、高 3HHx 組成の共重合体生合成には NADPH 依存アセトアセチル-CoA 還元酵素 1 (PhaB1) の欠失が必要であった。これは PhaB1 欠失により (R)-3HB-CoA への変換フラックスが低下し、炭素数 6 の骨格が生成しやすくなったためと考えられた。さらにこの人工代謝経路にはメタノール資化性菌由来 *crr* の強力プロモーターによる高発現、および *R. eutropha* 由来 (R)-エノイル-CoA ヒドラーターゼ遺伝子の 1 つである *phaJ4a* の導入が効果的であることを見出し、フルクトースから P(3HB-co-11.1 mol% 3HHx) を 31 重量% で生合成する株を作製した。

一方、クロトニル-CoA 還元酵素は還元活性だけでなく、CO₂ 存在下では還元的炭酸固定活性を示す二機能酵素であることが報告された。この還元的炭酸固定反応ではクロトニル-CoA からエチルマロニル-CoA が生成するが、この反応は PHBH 生合成において望ましくない副経路を構成する可能性がある。さらにその後、動物細胞ではプロピオニル-CoA カルボキシラーゼなどによる副反応で生じたエチルマロニル-CoA をブチリル-CoA に分解するためのエチルマロニル-CoA 脱炭酸酵素が発見された。そこで Ccr を含む P(3HB-co-3HHx) 生合成経路においてもエチルマロニル-CoA 脱炭酸酵素の機能が有効であることを考え、マウス由来エチルマロニル-CoA 脱炭酸酵素の遺伝子 (*R. eutropha* のコドン使用頻度に最適化) *emdMm* を導入した。その結果、22.2 mol% 3HHx ユニットを含む P(3HB-co-3HHx) が 48 重量% でフルクトースから生合成された

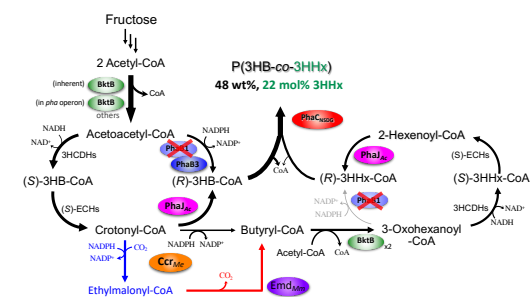


Fig. 3. *R. eutropha* 改変株によるフルクトース原料からの P(3HB-co-3HHx) 生合成

(Fig. 3)。3HHx 分率および PHBH 生産量が共に大きく増加し、人工代謝経路を大幅に改善することができた (発表論文 4)。

3) *R. eutropha* のメタボローム解析

R. eutropha の糖代謝および脂肪酸β-酸化による生育での代謝状態の理解のため、フルクトース培養およびオクタン酸培養した菌体から代謝物を抽出し、CE-MS/MS によるメタボローム解析を行った。オクタン酸培養菌体の解析では C₄・C₆・C₈ のアシル-CoA 中間体の菌体内濃度はアセチル-CoA と比較して顕著に低く、オクタン酸はβ-酸化により速やかに分解されていた。またフルクトース培養での PHA 蓄積期では増殖期と比較してヘキソースリン酸濃度が低下し、PHA は減少した糖代謝フラックスで生合成されていることが示唆された (発表論文 2)。

4) 利用可能炭素源の拡張

R. eutropha H16 株はグリセロールに対しては非常に遅い増殖しか示さない。グリセロールはバイオディーゼル生産における主要副産物であり有効利用が望まれていることから、*R. eutropha* のグリセロール資化能の強化を行った。ゲノム情報から *R. eutropha* ではグリセロール取り込みおよびリン酸化に関する遺伝子が見出されなかったことから、大腸菌 *Escherichia coli* 由来グリセロールトランスポーター遺伝子 *glpF* およびグリセロールキナーゼ遺伝子 *glpK* を相同性組換えにより染色体に挿入した (Fig. 4)。この組換え株はグリセロール炭素源において良好に生育し、P(3HB) を高い蓄積率で生合成した (発表論文 3)。

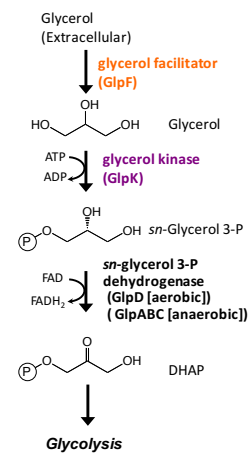


Fig. 4. 導入したグリセロール代謝経路

このグリセロール資化能強化の改変、および以前に確立したグルコース資化能付与の改変を *R. eutropha* P(3HB-co-3HHx) 生合成株に集積した。作製した株はフルクトースに加えてグルコース炭素源で良好に生育し、P(3HB-co-3HHx) を高効率で生合成した。中でも、短鎖特異的 (R)-エノイル-CoA ヒドラーターゼを導入した株はグルコースから約 7~12 mol% P(3HB-co-3HHx) を 70 重量% 以上で蓄積した。さらに、*R. eutropha* においてアセトアセチル-CoA を NADH 依存的に (S)-3HB-CoA に還元する (S)-3HB-CoA 脱水素酵素、および (S)-3HB-CoA をクロトニル-CoA に脱水和するクロトナーゼを同定した。これらの高発現による 3HHx ユニット生合成経路の強化を行ったところ、生産量が増加した。

一方、グリセロール炭素源においては作製

した改変株は生育および PHA 蓄積速度が顕著に低下し、PhaB1 欠失のためと考えられた。PhaB1 を保持させつつ 3HHx ユニットの高い分率で導入するための改変戦略を今後検討する。

また、*R. eutropha* グルコース資化性株については、コメ籾殻をアルカリ処理および加水分解した糖質を原料とした P(3HB)生合成が可能性であることを国際共同研究により示した(発表論文 5)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1) C. Insomphun, J. Mifune, I. Orita, K. Numata, S. Nakamura, T. Fukui.

“Modification of β -oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from soybean oil”

J. Biosci. Bioeng., **117**:184-90 (2014) (査読有)

2) T. Fukui, K. Chou, K. Harada, I. Orita, Y. Nakayama, T. Bamba, S. Nakamura, E. Fukusaki. “Metabolite profiles of polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha* H16”

Metabolomics, **10**:190–202 (2014) (査読有)

3) T. Fukui, M. Mukoyama, I. Orita, S. Nakamura. “Enhancement of glycerol utilization ability of *Ralstonia eutropha* H16 for production of polyhydroxyalkanoates”

Appl. Microbiol. Biotechnol., **98**:7559-7568 (2014) (査読有)

4) C. Insomphun, H. Xie, J. Mifune, Y. Kawashima, I. Orita, S. Nakamura, T. Fukui.

“Improved artificial pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with high C₆-monomer composition from fructose in *Ralstonia eutropha*”

Metab. Eng. **27**:38-45 (2015) (査読有)

5) K.-S. Heng, R. Hatti-Kaul, F. Adam, T. Fukui, K. Sudesh.

“Conversion of rice husks to polyhydroxyalkanoates (PHA) via a three-step process: optimized alkaline pretreatment, enzymatic hydrolysis, and biosynthesis by *Burkholderia cepacia* USM (JCM 15050)”

J. Chem. Technol. Biotechnol. **92**:100-108 (2017) (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1) C. Insomphun, J. Mifune, Y. Kawashima, I. Orita, S. Nakamura, T. Fukui.

“Modification of β -oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from soybean oil”

The 4th International Conference on Biobased Polymer (ICBP2013), 2013. 9.25-28, Soul, South Korea.

2) T. Fukui, Y. Kawashima, C. Insomphun, I. Orita, S. Nakamura

“Microbial synthesis of biodegradable copolyesters from biomass”

Enzyme Engineering XXII, 2014.9.22-26, Toyama

3) T. Fukui

“Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from biomass resources”

The 4th ACIKITA International Conference on Science & Technology 2014, 2014.8.25-27, Jakarta, Indonesia.

4) C. Insomphun, H. Xie, 御船 淳, 折田和泉, 中村 聡, 福居俊昭

「糖質からの C₆ ユニット含有共重合ポリエステル生合成に向けた *Ralstonia eutropha* の代謝改変」

第 66 回日本生物工学会大会、平成 26 年 9 月 9-11 日、札幌

5) 瀬川睦、清水理恵、折田和泉、福居俊昭

「PHA 生産菌 *Ralstonia eutropha* における 3-ヒドロキシブチリル-CoA 脱水素酵素の同定と機能解析」

第 66 回日本生物工学会大会、平成 26 年 9 月 9-11 日、札幌

6) T. Fukui

“Advanced artificial pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with high 3-hydroxyhexanoate composition from unrelated fructose in *Ralstonia eutropha*”

International Symposium on Biopolymers 2014, 2014.9.28-10.1, Santos, Brazil.

7) M. Zhang, Y. Kawashima S. Kurita I. Orita, S. Nakamura, T. Fukui

“Integrated engineering of *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from structurally unrelated sugars and glycerol”

日本農芸化学会 2016 年度大会、平成 28 年 3 月 27 日~30 日、札幌

8) M. Zhang, C. Insomphun, 折田和泉、福居俊昭

「*Ralstonia eutropha* 代謝改変株による糖質およびグリセロールからのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成」

環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会、平成 28 年 6 月 13 日~14 日、広島

9) 福居俊昭

「バイオポリエステル生産菌の代謝工学」

第 36 回バイオマスイノベーション研究会、平

成 28 年 6 月 22 日、大阪（依頼講演）

10) M. Zhang, 折田和泉、中村 聡、福居俊昭
「*Ralstonia eutropha* 代謝改変株による糖質およびグリセロールからのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成」
第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、平成 28 年 9 月 7 日～9 日、金沢

11) M. Zhang, 折田和泉、中村 聡、福居俊昭
「*Ralstonia eutropha* 代謝改変株による糖質およびグリセロールからのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成」
第 68 回日本生物工学会大会、平成 28 年 9 月 28 日～30 日、富山

12) T. Fukui, M. Zhang, S. Saito, I. Orita
“Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from glucose by artificial biosynthesis pathway in *Ralstonia eutropha* and *Escherichia coli*”
The 6th International Conference on Bio-based Polymers (ICBP2017), May 14-17, Yuan Ze University, Taiwan

13) 福居俊昭
「人工生合成経路による共重合ポリエステル
の微生物合成」
BioJapan2017、平成 28 年 10 月 12 日、横浜

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

名称：脂肪酸β-酸化経路改変株による共重合体ポリヒドロキシアルカン酸の製造法
発明者：福居俊昭、折田和泉
権利者：東京工業大学、株式会社カネカ
種類：特許
番号：PCT/JP2014/054905
出願年月日：2014 年 2 月 27 日
国内外の別： 国外

名称：糖質原料からの共重合ポリヒドロキシアルカン酸の製造法
発明者：福居俊昭、折田和泉
権利者：東京工業大学、株式会社カネカ
種類：特許
番号：特願 2014-158398
出願年月日：2014 年 8 月 4 日
国内外の別： 国内

名称：糖質原料からの共重合ポリヒドロキシアルカン酸の製造法
発明者：福居俊昭、折田和泉
権利者：東京工業大学、株式会社カネカ
種類：特許

番号：PCT/JP2015/072107
出願年月日：2015 年 8 月 4 日
国内外の別： 国外

○取得状況（計 1 件）

名称：エノイル-CoA ヒドラターゼ遺伝子を導入した組換え微生物によるポリヒドロキシアルカン酸の製造法
発明者：福居俊昭、折田和泉、御船 淳、川島由依
権利者：東京工業大学、株式会社カネカ
種類：特許
番号：5807878
取得年月日：2015 年 9 月 18 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
福居 俊昭 (FUKUI TOSHIAKI)
東京工業大学・生命理工学院・教授
研究者番号：80271542

(2)研究分担者
折田 和泉 (ORITA IZUMI)
東京工業大学・生命理工学院・助教
研究者番号：70525964

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
Chayatip Insomphun

川島由依 (KAWASHIMA YUI)

Mengxiao Zhang