

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：27401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12267

研究課題名(和文) 二酸化炭素を原料にした共重合ポリエステル生合成のための微生物分子育種

研究課題名(英文) Genetic engineering for biosynthesis of copolymer from carbon dioxide

研究代表者

松崎 弘美 (MATSUSAKI, Hiromi)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：30326491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Pseudomonas sp. 61-3の(R)-3HA-CoAリガーゼ遺伝子は560アミノ酸残基からなる推定分子量62 kDaのタンパク質をコードしていた。PHA重合酵素遺伝子および脂肪酸合成経路からの中鎖長3HAユニット供給系酵素遺伝子をRalstonia eutropha H16のPHA重合酵素遺伝子破壊株H16dCに導入した組換え株は、糖を唯一の炭素源として中鎖長3HAが5 mol%程度取り込まれたP(3HB-co-3HA)を約10 wt%の蓄積率で合成した。しかし、二酸化炭素からは2 wt%未満のP(3HB)のみが合成された。

研究成果の概要(英文)： The (R)-3HA-CoA ligase gene in Pseudomonas sp. 61-3 was cloned and identified. The gene was encoded the protein composed of 560 amino acids with a calculated molecular mass of 62 kDa. PHA synthase gene (phaC1) and the genes encoding the enzymes which provide medium-chain-length 3HA unit through fatty acid biosynthesis pathway were introduced into Ralstonia eutropha H16dC (phbC-disruptant of H16). The recombinant strains accumulated 5-10 wt% P(3HB-co-3HA) with 5-6 mol% 3HA fractions from fructose as the sole carbon source. Whereas, the recombinants synthesized less than 2 wt% P(3HB) homopolymer from carbon dioxide and 3HA units were not incorporated the polymer chain.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリヒドロキシアルカン酸 生分解性プラスチック 脂肪酸合成経路 二酸化炭素 共重合ポリエステル コポリマー

1. 研究開始当初の背景

プラスチックで代表される化石燃料由来の合成高分子材料は優れた性能と機能を持つが、その廃棄物の多くは自然環境で分解されないために、環境中に半永久的に蓄積して、さまざまな環境問題を引き起こしている。そこで、ある種の微生物が合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) が注目されている。PHA は自然界に存在する微生物によって分解・代謝される生分解性プラスチックであり、微生物が合成するので再生可能資源のバイオマスを利用できる。すなわち、化石資源の消費量を抑え、温室効果ガスの二酸化炭素の排出量を抑制することができる。そのため、PHA は石油由来の生分解性プラスチック (ポリカプロラクトンやポリエチレンサクシネートなど) と比べてもより地球に優しい環境調和型のプラスチックといえる。しかし、野生株が合成する PHA は硬くて脆いものや非晶質であるなど物性に難があり実用的ではない。そこで、独立栄養細菌や増殖速度が速い大腸菌を PHA 合成の宿主とし、石油由来プラスチックと同等な物性の優れた実用的な PHA を二酸化炭素や糖から合成できれば、環境低負荷のみならず環境保全にも大いに役立つ。その生産システムの確立はプラスチック製造における技術革新を起こす可能性がある。

水素細菌 *Ralstonia eutropha* は糖や二酸化炭素から炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) をモノマー単位とするポリ(3-ヒドロキシブタン酸)、P(3HB) を合成するが、これは硬くて脆い PHA である。鎖長の長い 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) を第 2 モノマー成分とした共重合体 P(3HB-co-3HA) を合成すれば耐衝撃性を向上させることができるが、野生株では炭素数 6 以上の 3HA ユニットの PHA 鎖中に取り込めない。これは、第一に PHA 重合酵素の基質特異性に起因する。そこで申請者らは、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 生合成遺伝子を同定し (Matsusaki *et al.* *J. Bacteriol.*, 1998) 本菌の低基質特異性 PHA 重合酵素 (PhaC1) の遺伝子を導入した組換え株を作製することにより、低密度ポリエチレンと同等な優れた物性を示す P(3HB-co-3HA) 共重合体 (3HB と炭素数 6~12 の 3HA からなるランダム共重合体) の合成に成功した (Matsusaki *et al.* *Biomacromolecules*, 2000)。しかし、*R. eutropha* を宿主とした場合、*phaC1* 遺伝子を導入しても糖や二酸化炭素からは P(3HB) しか合成されない (脂肪酸からは P(3HB-co-3HA) を合成) (Matsusaki *et al.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000)。これは、*R. eutropha* が脂肪酸合成経路からの (R)-3HA-CoA (炭素数 6 以上) 供給系を有していないからである。そのため、P(3HB-co-3HA) を合成させるためには、PHA 重合酵素に加えて脂肪酸合成経路から (R)-3HA-CoA を供給する酵素が必要である。

そのためには、*phaC1* 遺伝子と *Pseudomonas* 属細菌由来の (R)-3HA-ACP チオエステラーゼ遺伝子 (*phaG*) および (R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子が必要であることを明らかにした。それらの遺伝子を導入した大腸菌は糖から P(3HB-co-7% 3HA) 共重合ポリエステルを合成し、P(3HB) よりも物性の改善がみられた (Hokamura *et al.* *J. Biosci. Bioeng.*, 2015)。PHA の実用化と普及のためには、このような物性の優れた PHA を再生可能資源のバイオマスや温暖化の原因物質の二酸化炭素から合成することが望ましい。これにより、環境低負荷型の PHA 生産システムを構築することができる。

2. 研究の目的

R. eutropha は、糖や脂肪酸のみならず二酸化炭素を炭素源として増殖し、生分解性プラスチックのポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を合成する。しかしながら、この細菌が合成する PHA は耐衝撃性が弱く堅くて脆い P(3HB) ホモポリマー (破断伸びは 5%) である。そのため、耐衝撃性に優れた P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルの合成を目指し、幅広い基質を利用できる *Pseudomonas* sp. 61-3 由来の PHA 重合酵素 (PhaC1) 遺伝子を導入した *R. eutropha* の組換え株を作製したが、糖を炭素源とすると P(3HB) しか合成されない。これは、PHA 重合酵素の基質となる炭素数 6~12 の中鎖長 (R)-3-ヒドロキシアルキル CoA ((R)-3HA-CoA) が、*R. eutropha* において脂肪酸合成経路から供給されないからである。そこで、脂肪酸合成経路を経て PHA を合成させるためには、*phaC1* 遺伝子と *Pseudomonas* 属細菌由来の (R)-3HA-ACP チオエステラーゼ遺伝子 (*phaG*) および (R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子が必要であることを明らかにした。それらの遺伝子を導入した大腸菌はグルコースを唯一の炭素源として P(3HB-co-7% 3HA) を合成し、P(3HB) よりも物性の改善がみられた (破断伸びは 186%) (Hokamura *et al.* *J. Biosci. Bioeng.*, 2015)。

一方、これまでの研究で、*R. eutropha* の組換え株が糖を唯一の炭素源として合成した PHA への 3HA ユニットの取り込みは 2.8 mol% 以下であった。そのため、大腸菌を宿主とした共重合 PHA 合成系のさらなる改善を行うとともに、大腸菌で得られた結果を踏まえて *R. eutropha* の分子育種を進め、二酸化炭素から耐衝撃性に優れた実用的な共重合 PHA を合成させることを最終的な目標とし、そのための基礎的知見を得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

二酸化炭素や糖から丈夫で実用的な P(3HB-co-3HA) 共重合体 (生分解性プラスチック) を合成させるため、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性の PHA 重合酵素遺伝

子 (*phaC1*) および PHA 重合酵素の基質となる炭素数 6 以上の (*R*)-3HA-CoA を脂肪酸合成経路から供給する (*R*)-3HA-ACP チオエステルゼ遺伝子 (*phaG*)、3HB ユニット供給する *R. eutropha* 由来の β -ケトチオラゼ遺伝子 (*phbA*) およびアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子 (*phbB*) を大腸菌あるいは *R. eutropha* の PHA 合成能欠損株に導入した組換え株を作製した。また、3HA ユニットの供給のためには、PhaG 酵素の他に (*R*)-3HA-CoA リガーゼが必要であるため (Wang *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012; Hokamura *et al.* *J. Biosci. Bioeng.*, 2015), この遺伝子をさらに導入した組換え株を作製した。これら組換え株によって脂肪酸合成経路を介して P(3HB-co-3HA) を合成するため、以下の研究を実施した。

(1) *Pseudomonas* sp. 61-3 の推定 (*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子のクローニングと該遺伝子導入株が合成する PHA の検討

(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA (*R*)-3HA-CoA) リガーゼ遺伝子として、*Pseudomonas putida* KT2440 の PP0763 遺伝子および我々が明らかにした *Pseudomonas aeruginosa* PAO の PA3924 (Hokamura *et al.* *J. Biosci. Bioeng.*, 2015) が報告されている。大腸菌を宿主とした PA3924 遺伝子導入株は PP0763 遺伝子導入株よりも 3HA 分率が高い P(3HB-co-3HA) を高い菌体内蓄積率で合成した。*phaC1* および *phaG* 遺伝子は *Pseudomonas* sp. 61-3 由来であるため、同じ菌株由来の (*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を用いれば、これまでよりも高い 3HA 分率からなる P(3HB-co-3HA) を効率的に合成する可能性がある。そこで、*P. putida* KT2440 の PP0763 と同一性があるタンパク質の保存領域に基づいてプライマーを設計し、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA の degenerate PCR を行って目的遺伝子の一部をクローニングし、その後 nested PCR を行って、推定 (*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子の全塩基配列を決定した。さらにその遺伝子を大腸菌あるいは *R. eutropha* に導入して、合成される PHA のモノマー組成および蓄積率をこれまでの PA3924 遺伝子導入株の結果と比較した。

(2) 組換え *Ralstonia eutropha* による糖および二酸化炭素からの共重合 PHA の合成

Pseudomonas sp. 61-3 由来の *phaC1* 遺伝子および *phaG* 遺伝子、さらには *P. aeruginosa* 由来の (*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子 (PA3924) を *R. eutropha* の PHA 合成能欠損株に導入したさまざまな組換え株を作製した。それらを糖あるいは二酸化炭素を唯一の炭素源として培養し、合成された PHA のモノマー組成および蓄積率について検討した。また、PHA を菌体内から抽出し、NMR 解析を行ってモノマー鎖の連鎖について調べた。

また、遺伝子を発現させるプロモーターについても構成的なものと誘導的なものを用いてプロモーターの違いが PHA の合成に与える影響についても調べた。

4. 研究成果

(1) *Pseudomonas* sp. 61-3 の推定 (*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子のクローニングとその機能

(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有する *P. putida* PP0763 と同一性が高いタンパク質のアライメント解析を行い、それらの保存領域に基づいて degenerate プライマーを設計して *Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA の PCR と増副産物の塩基配列を決定した。その結果、推定 (*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子の一部が明らかとなり、続いてその上流域および下流域を nested PCR によりクローニングした。最終的に 3.5 kb *SaII-EcoRI* 領域の塩基配列を決定した。その結果、*Pseudomonas* sp. 61-3 の推定 (*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子は、1,683-bp、560 アミノ酸残基からなる推定分子量 62 kDa のタンパク質をコードしていると考えられた。これは、(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有する *P. putida* PP0763 および *P. aeruginosa* PAO の PA3924 とそれぞれ、95% と 97% の同一性を示した。

次に、*Pseudomonas* sp. 61-3 の推定 (*R*)-3HA-CoA リガーゼの機能を明らかにするため、この遺伝子を破壊した株を作製したが、合成された PHA のモノマー組成と菌体内蓄積率は野生株とほとんど変わらなかった。*Pseudomonas* 属細菌には、(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有すると考えられる中鎖および長鎖脂肪酸 CoA リガーゼがいくつも推定されているため、*Pseudomonas* sp. 61-3 において (*R*)-3HA-CoA リガーゼを有する別の酵素の存在が示唆された。そこで、PHA を合成しない大腸菌あるいは脂肪酸合成経路からの中鎖長 3HA ユニット供給系酵素を持たない *R. eutropha* を宿主として、クローニングした遺伝子の機能を調べた。大腸菌 LS5218 株 (*fadR atoC*) を宿主にして培養した結果 (プラスミド pJSck-C1GAB および pRTcAsc-MCL (Ps) 導入株)、PP0763 や PA3924 遺伝子を導入した株と比べて PHA の蓄積率が 0.5 wt% と僅かしか合成しなかった (Table 1)。一方、*R. eutropha* H16 の PHA 重合酵素遺伝子破壊株 H16dC に導入した組換え株 (プラスミド pRTcAsc2-GMCL (Ps) および pJASc22 導入株) は、中鎖長 3HA 分率が 5.4 mol% の P(3HB-co-3HA) を 7.6 wt% の蓄積率で合成した (Table 2)。これは PA3924 遺伝子導入株とほとんど同じであることから、本研究においてクローニングした遺伝子は *Pseudomonas* sp. 61-3 の (*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子であると結論した。

Table 1 Accumulation of PHA by recombinant *Escherichia coli* L55218 harboring *phaC*_{GS}, *phbA*_{Re}, and *(R)*-3HA-CoA ligase genes.

Plasmid (Relevant markers)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA concentration (g/L)	PHA composition (mol%)					
				3HB (C4)	3HHs (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3HSD (C12')
pSK-CIGAB (<i>P</i> _{lac} - <i>phaC</i> _{GS} , <i>phbA</i> _{Re})	3.9	4.6	0.18	100	0	0	0	0	0
pSK-CIGAB and pRTKSc-MCL(Pb) (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , <i>phbA</i> _{Re}) (<i>P</i> _{lac} , P9763)	3.8	3.8	0.14	97.4	0	0	2.6	0	0
pSK-CIGAB and pRTKSc-MCL(Pb) (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , <i>phbA</i> _{Re}) (<i>P</i> _{lac} , PA3924)	5.4	20.3	1.10	92.6	0	2.3	5.1	0	0
pSK-CIGAB and pRTKSc-MCL(Pb) (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , <i>phbA</i> _{Re}) (<i>P</i> _{lac} , PA3924)	5.3	0.5	0.03	47.6	0	6.2	32.0	0	14.2

Cells were cultivated at 25°C for 72 h in LB medium containing 2% (w/v) glucose as the sole carbon source.
 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHs, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate.

Table 2 Accumulation of PHA by recombinant *Ralstonia eutropha* H16dC harboring *phaC*_{GS}, *phbA*_{Re}, and *(R)*-3HA-CoA ligase genes.

Plasmid (Relevant markers)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA concentration (g/L)	PHA composition (mol%)					
				3HB (C4)	3HHs (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3HSD (C12')
pRTcAA-GMCL(Pa) and pJASc22 (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , PA3924) (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS})	1.5	8.6	0.13	93.8	0.0	2.2	2.4	1.6	0.0
pRTcAA-GMCL(Pa) and pJKSc46- <i>pha</i> (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , PA3924) (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , <i>phbA</i> _{Re})	0.9	3.5	0.03	97.2	0.0	1.0	1.5	0.3	0.0
pRTcAA-GMCL(Pa) and pJASc22 (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , PA3924) (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , <i>phbA</i> _{Re})	0.9	15.2	0.13	99.1	0.5	0.1	0.2	0.1	0.0
pRTcAA-GMCL(Pa) and pJKSc54- <i>phab</i> (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , PA3924) (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , <i>phbA</i> _{Re})	0.7	5.6	0.04	90.2	2.1	2.8	2.8	2.0	0.1
pRTcAA-GMCL(Pa) and pJASc22 (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , PA3924) (<i>P</i> _{lac} , <i>phaC</i> _{GS} , <i>phbA</i> _{Re})	0.9	7.6	0.07	94.6	0.5	1.8	1.7	1.2	0.2

Cells were cultivated at 30°C for 72 h in MS medium containing 2% (w/v) fructose as the sole carbon source.
 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHs, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate.

(2) 組換え *Ralstonia eutropha* による糖および二酸化炭素からの共重合 PHA の合成
R. eutropha H16dC のさまざまな組換え株を作製してフルクトースを唯一の炭素源として培養した。その結果、プラスミド pRTcAA-GMCL(Pa) および pJASc22 を導入した株は、3HB 分率が 93.8 mol%、中鎖長の 3HA (C₈-C₁₂) 分率が 6.2 mol% からなる PHA を蓄積率 8.6 wt% で合成した。この PHA を抽出して、¹³C-NMR を行ったところ、3HB と 3HA の連鎖を示すピークが確認できた。すなわち、この PHA は P(3HB) と P(3HA) のブレンドではなく P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルであることが明らかとなった (Table 2)。また、*phaC*_{1ps} 遺伝子を発現させるプロモーターについて検討した結果、*phaC*_{1ps} 遺伝子を構成的に発現 (*P*_{Re}) させると PHA の蓄積率が向上したが、3HA 分率のポリマー鎖への取り込みはわずかであった (pJBB49-*phb* 導入株)。一方、*phaC*_{1ps} 遺伝子を窒素源制限下で誘導発現するプロモーター (*P*_{Ps}) で発現させ、*phbA*_{Re} 遺伝子を *P*_{Re} プロモーターで発現させた組換え株 (pJKSc54-*phab* 導入株) では、pJASc22 導入株と比べて PHA 蓄積率は若干低下したものの、3HA 分率が 9.8 mol% からなる P(3HB-co-3HA) を合成した。

以上のように、PHA 蓄積率を高める検討が今後も必要であるが、*R. eutropha* を宿主として、唯一の炭素源としての糖から脂肪酸合成経路を介して P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルを合成することができた。そこで、最終目的である二酸化炭素からの P(3HB-co-3HA) の合成を試みた。作製した *R. eutropha* の組換え株を二酸化炭素を唯一の炭素源として独立培養した結果、いずれの組換え株も合成された PHA の蓄積率は 2 wt% 未満であり、中鎖長の 3HA ユニットは含まない P(3HB) ホモポリマーであった。今後、培養条件の違いによる遺伝子の発現量を調べるなどして代謝の流れを詳細に検討し、基礎的知見を積み上げ、二酸化炭素からの実用的な共重合 PHA の合成を目指す。

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 1 件)

Kenji Tanaka, Syunya Mori, Mai Hirata, Hiromi Matsusaki (2016) Autotrophic growth of *Paracoccus denitrificans* in aerobic condition and the accumulation of biodegradable plastics from CO₂. *Environment and Ecology Research*, 4(4), 231-236 (査読あり)
 DOI: 10.13189/eer.2016.040407

〔学会発表〕(計 7 件)

倉富優季、脇田和、後藤早希、外村彩夏、田中賢二、松崎弘美 「組換え *R. eutropha* による糖からの P(3HB-co-3HA) の生合成」、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学 (京都府京都市) 森 恵美、倉富優季、後藤早希、脇田和、外村彩夏、田中賢二、松崎弘美 「*Ralstonia eutropha* を宿主とした糖からの P(3HB-co-3HA) の生合成」、第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会 (2016)、2016 年 12 月 3 日、九州工業大学情報工学部 (福岡県飯塚市)
 倉富優季、森 恵美、後藤早希、脇田和、外村彩夏、田中賢二、松崎弘美 「糖から共重合ポリエステルを合成する大腸菌の分子育種」、第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会 (2016)、2016 年 12 月 3 日、九州工業大学情報工学部 (福岡県飯塚市)
 倉富優季、脇田和、後藤早希、外村彩夏、田中賢二、松崎弘美 「糖を唯一の炭素源として共重合ポリエステルを合成する細菌の分子育種」、日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会、2016 年 9 月 16 日、長崎大学文教キャンパス (長崎県長崎市)
Kenji Tanaka, Syunya Mori, May Hirata, and Kenji Tanaka, Syunya Mori, May Hirata, and Hiromi Matsusaki 「Autotrophic Growth of *Paracoccus Denitrificans* in Aerobic Condition and the Accumulation of Biodegradable Plastics from CO₂」、Proceedings of the Global Conference on Life Science and Biological Engineering 2016 (GLSBE 2016)、March 29-31, Kyoto, Japan
 倉富優季、脇田和、外村彩夏、田中賢二、松崎弘美 「組換え *Ralstonia eutropha* による糖からの P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルの生合成」、日本農芸化学会 2016 年度 (平成 28 年度) 大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
 脇田和、倉富優季、外村彩夏、松崎弘美 「*Pseudomonas* sp. 61-3 の (R)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子のクローニングと組換え大腸菌による共重合ポリエステル の生合成」、日本農芸化学会 2016

年度（平成 28 年度）大会、2016 年 3 月 28
日、札幌コンベンションセンター（北海道
札幌市）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 弘美 (MATSUSAKI, Hiromi)
熊本県立大学・環境共生学部・教授
研究者番号：30326491

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田中 賢二 (TANAKA, Kenji)
近畿大学・産業理工学部・教授
研究者番号：20236582

(4) 研究協力者

脇田 和 (WAKIDA, Izumi)
倉富 優季 (KURADOMI, Yuki)