

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310050

研究課題名 (和文) 酵素進化学が先導する新規モノマー導入型バイオポリマーの完全生合成システムの創成

研究課題名 (英文) Establishment of the all biosynthetic system for new monomers-contained biopolymers as a basis for enzyme evolutionary engineering

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

研究成果の概要 (和文) : 再生可能バイオマス原料から高性能バイオポリマーを微生物生産させるシステム (微生物工場) の開発を行った。最も大きなブレイクスルーは、「乳酸重合酵素 = LPE」の発見である。従来の微生物ポリマー-PHA (ポリヒドロキシアルカン酸) の重合酵素の改変研究を積み重ねてきた過程で見出された。この酵素を大腸菌に遺伝子導入することにより、バイオマス由来グルコースから乳酸を取り込んだポリマーが“一気通貫”に細胞内に合成された。また、代謝と酵素の複合改変を試みたところ、ポリマー中の乳酸分率が6%から47%に上昇した。さらに、合成ポリマーの基礎物性を調べ、従来のポリ乳酸 (PLA) と微生物ポリマー-PHB (ポリヒドロキシブタン酸) との比較において、ユニーク性を見出した。

研究成果の概要 (英文) : Microbial production system for lactate (LA) polymers with high performances has been established. This new microbial factory can be driven by renewable biomass resources. A break-through of this system was a discovery of “LA-Polymerizing Enzyme (LPE)”. LPE was created through the study on the engineering of microbial polymer PHA synthase. LA-based polymer was synthesized as an one-pot manner in *Escherichia coli* by introduction of the LPE gene from glucose. Also, LA fraction in the polymer has been enriched up to 47% from 6% by combination of metabolic and enzyme engineering. Furthermore, LA-based polymers exhibited distinguishable properties from the counterpart homopolymers, PLA and PHB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：循環材料生産システム、生分解性プラスチック、バイオプロセス、進化学、ポリヒドロキシアルカン酸、バイオベースポリマー、乳酸ポリマー、微生物工場

1. 研究開始当初の背景

バイオベースポリマーの一つ、微生物ポリマー-PHA 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。また、再生可能バイオマス原料から合成できる点も、環境・生体調和型のバイオプロセスとして魅力的である。一方、先行して市場に出回っているポリ

乳酸 PLA は、微生物発酵で得られた乳酸を重金属触媒を使用して重合するバイオ・化学のハイブリッド合成プロセスである。基本的なポリマー合成に関わる代謝経路については明らかになって来ているので、ゲノム情報に基づいた理論的な代謝改変が実施できる状況にある。また、ポリマー合成の鍵となる PHA 重合酵素に関しては、未だその立体構造は不明のままなので、我々は遺伝子ランダム変異と独自のスクリーニング系とを組み合わせた進化工学研究を展開してきた。その結果、千個以上に及ぶ変異体のライブラリーを構築でき、その中から今回の乳酸重合酵素 (LPE) が発見されたという経緯である。また、ポリマー物性の観点からは、対象となる PHB および PLA とも、結晶性の高い硬質材料であることから、PLA の透明性を維持しつつ、共重合化することで軟質性を付与するという課題を設定した。

2. 研究の目的

乳酸ポリマー中の乳酸分率を向上させることを目的として、代謝と重合酵素の複合改変に取り組んだ。また、生合成によって得られるポリマーの物性を、従来の PHB および PLA との比較において、その物性の特徴を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

微生物工場として、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目的に応じた発現ベクターに搭載して使用した。遺伝子操作過程あるいは変異体作成は、DNA 配列分析を逐次チェックしながら進めた。微生物培養は、乳酸の生成メカニズムを考慮して、特に通気性と pH をモニタリングしながら行った。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。

4. 研究成果

微生物細胞内で乳酸ポリマーを合成するためには、モノマー供給酵素およびモノマー重合酵素遺伝子を導入する必要がある。そこで、まずモノマーである 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した。これまでに、乳酸重合酵素の存在は報告されていなかったが、乳酸と類似の化学構造ユニットを有する polyhydroxyalkanoate (PHA) を合成する PHA 重合酵素については、詳細な研究がなされている。そこで、本研究では PHA 重合酵素に着目し、多種の PHA 重合酵素について LA-CoA 重合能力を評価した。結果、*in vitro* ポリマー合成系において、LA-CoA と 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA: 基本的な PHA のモノマー) が共存する場合にのみ、LA-CoA 重合能を示す PHA 重合酵素変異体 [*Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PhaC1(S325T/Q481K)変異体]を見出した。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ブレイクスルーであった。モノマー供給遺伝子および乳酸重合酵素遺伝子を大腸菌に導入した結果、LA-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、PLA は検出されなかったが、LA-CoA および 3HB-CoA 供給遺伝子を導入した場合には、乳酸ユニットが 6 mol% 導入された P(LA-co-3HB) を微生物生産することができた。

次に、乳酸ベースポリマー生合成システム中の LA モノマー(LA-CoA)供給量の増強に取り組んだ。方法としては、P(LA-co-3HB)中の LA 分率を向上させるために、*in vivo* における LA モノマー供給の増強を検討した。第 2 章で述べた *in vitro* ポリマー合成系では、LA-CoA と 3HB-CoA を等量加えた際、P(36 mol% LA-co-3HB)が合成された。一方で、微生物合成したポリマーは、わずか P(6 mol% LA-co-3HB)であった。これらの結果は、構築した微生物生産システム内において、LA-CoA モノマー量が不足しているということを示唆している。一般的に、嫌気条件下では、乳酸を合成する乳酸脱水素酵素が活性化し、乳酸生産量が向上することが知られている。そこで、菌体内の乳酸量を増加させることによって、LA-CoA モノマー供給量が増加することを期待した。嫌気培養を行ったところ、コポリマー中の LA 分率が、47 mol%へと飛躍的に向上した。また、合成されたポリマーの光学異性組成を HPLC によって分析した。結果、本ポリマーは、非常に高い光学純度を持った P[(R)-LA-co-(R)-3HB]であるということがわかった。また、構造的性質であるモノマー配列を NMR によって詳細に分析し、本ポリマーは、ランダム配列をもつコポリマーであるということを明らかにした。熱的性質については、ガラス転移温度の上昇および融点の低下という乳酸ユニットが導入された特徴が見られた。

さらに、新規乳酸重合酵素の創製に取り組んだ。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。

種々の乳酸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) 乳酸ポリマーの微生物工場のプロトタイプを構築できた。(2) 乳酸分率の向上に代謝と酵素の複合改変が有効であった。(3) 合成された新ポリマーは、従来のホモポリマーよりも優れた物性を発現した。

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 22 件)

全て査読有 (代表的な論文を掲載)

- (1) F. Shozui, K. Matsumoto, R. Motohashi, J. Sun, T. Satoh, T. Kakuchi, S. Taguchi: Biosynthesis of lactate(LA)-based polyester with a 96 mol% LA fraction and its application to stereocomplex formation, *Polymer Degradation and Stability*, **96**, 499-504, (2011).
- (2) K. Buhalan, J.-A. Chuah, F. Shozui, S.

Taguchi, C. J. Brigham, A. J. Sinskey, K. K. Sudesh: Characterization of the highly active PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2, *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2926-2933, (2011)

- (3) K. Makiguchi, T. Satoh, T. Kakuchi: Diphenyl Phosphate as an Efficient Cationic Organocatalyst for Controlled/Living Ring-Opening Polymerization of δ -Valerolactone and ϵ -Caprolactone. *Macromolecules*, **44** (7), 1999-2005, (2011).
- (4) N.T. Hoai, A. Sasaki, M. Sasaki, H. Kaga, T. Kakuchi, T. Satoh: Synthesis, characterization, and lectin recognition of hyperbranched polysaccharide obtained from 1,6-anhydro-D-hexofuranose. *Biomacromolecules*, **12**(5), 1891-1899 (2011).
- (5) K. Matsumoto, H. Kobayashi, K. Ikeda, T. Komanoya, A. Fukuoka, S. Taguchi: Chemo-microbial conversion of cellulose into polyhydroxybutyrate through ruthenium-catalyzed hydrolysis of cellulose into glucose. *Bioresource Technol.*, **102**, 3564-3567, (2011).
- (6) M. Yamada, K. Matsumoto, K. Shimizu, S. Uramoto, T. Nakai, F. Shozui, S. Taguchi: Adjustable mutations in lactate (LA)-polymerizing enzyme for the microbial production of LA-based polyesters with tailor-made monomer composition. *Biomacromolecules*, **11**, 815-819 (2010).
- (7) F. Shozui, K. Matsumoto, R. Motohashi, M. Yamada, S. Taguchi: Establishment of a metabolic pathway to introduce the 3-hydroxyhexanoate unit into LA-based polyesters via a reverse reaction of β -oxidation in *Escherichia coli* LS5218. *Polymer Degradation and Stability*, **95**, 1340-1344 (2010).
- (8) F. Shozui, J. Sun, Y. Song, M. Yamada, K. Sakai, K. Matsumoto, K. Takase, S. Taguchi: A new beneficial mutation in *Pseudomonas*

- sp. 61-3 polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase for enhanced cellular content of 3-hydroxybutyrate-based PHA explored using its enzyme homolog as a mutation template., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1710-1712 (2010).
- (9) J. Sun, F. Shozui, M. Yamada, K. Matsumoto, S. Taguchi: Production of P(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate) terpolymers using a chimeric PHA synthase in recombinant *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas putida*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1716-1718 (2010).
- (10) F. Shozui, K. Matsumoto, T. Nakai, M. Yamada, S. Taguchi: Biosynthesis of novel terpolymers Poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in lactate-overproducing mutant *Escherichia coli* JW0885 by feeding propionate as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 949-954 (2010).
- (11) F. Shozui, K. Matsumoto, T. Sasaki, S. Taguchi: Engineering of polyhydroxyalkanoate synthase by Ser477X/Gln481X saturation mutagenesis for efficient production of 3-hydroxybutyrate-based copolyesters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1117-1124 (2009).
- (12) K. Matsumoto, T. Murata, R. Nagao, C. Nomura, S. Arai, K. Takase, H. Nakashita, S. Taguchi, H. Shimada: Production of short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer in the plastid of *Arabidopsis thaliana* using the evolved 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *Biomacromolecules*, **10**, 686-690, (2009).
- (13) K. Matsumoto, K. Takase, Y. Yamamoto, Y. Doi, S. Taguchi: Chimeric enzyme composed of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas caviae* enhances production of PHAs in recombinant *Escherichia coli*. *Biomacromolecules*, **10**, 682-685 (2009).
- (14) M. Yamada, K. Matsumoto, T. Nakai, S. Taguchi: Microbial production of lactate-enriched poly[(R)-lactate-co-(R)-3-hydroxybutyrate] with novel thermal properties. *Biomacromolecules*, **10**, 677-681 (2009).
- (15) K. Tajima, Y. Satoh, T. Satoh, R. Itoh, X. Han, S. Taguchi, T. Kakuchi, M. Munekata: Chemo-enzymatic synthesis of poly(lactate-co-(3-hydroxybutyrate)) by a lactate-polymerizing enzyme., *Macromolecules*, **42**, 1985-1989 (2009).
- (16) T. Satoh: Unimolecular Micelles Based on Hyperbranched Polycarbohydrate Cores, *Soft Matter*, 5(10), 1972-1982 (2009)
- (17) S. Taguchi, M. Yamada, K. Matsumoto, K. Tajima, Y. Sato, M. Munekata, K. Ohono, K. Kohda, T. Shimamura, H. Kambe, S. Obata: A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17323-17327 (2008).
- [学会発表等] (計 83 件)
(代表的な発表を掲載、無記名は田口単独)
- (1) Biological lactate-polymers synthesized by one-pot microbial factory: Enzyme and metabolic engineering, 241st ACS National Meeting & Exposition, Division of Polymer Chemistry, Biobased Monomers, Polymers, and Materials, Anaheim Convention Center & Area Hotels, Anaheim, California, USA, 2011. 3.30 (招待講演)
- (2) Microbial Plastic Factory: from enzyme-metabolic engineering to polymer properties, Technical Seminar on Bio-Technology in Japan and the Netherlands, Kobe University, 2011.2.1 (招待講演)

- (3) M. Yamada, K. Matsumoto, T. Nakai, K. Shimizu, S. Uramoto, F. Shozui, S. Taguchi: Microbial production of lactate (LA)-based polyesters with tailor-made monomer composition using engineered LA-polymerizing enzymes. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basic Societies, Honolulu, 2010.12.19.
- (4) Current advances in microbial cell factories for lactate-based polyesters driven by lactate-polymerizing enzymes, Pacificchem 2010, Biodegradable and Biomass Plastics, Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 2010.12.17 (招待講演)
- (5) M. Yamada, T. Nakai, K. Shimizu, S. Uramoto, F. Shozui, K. Matsumoto, S. Taguchi: New mutations in lactate (LA)-polymerizing enzyme for the microbial production of LA-based polyesters with tailor-made monomer composition, ISBP 2010 - International Symposium on Biopolymers, Haus der Wirtschaft, Stuttgart, Germany (Oral Lecture), 2010.10.7 (招待講演)
- (6) Advanced studies on microbial lactate-based polymers: enzyme-metabolic engineering and polymer properties, ISBP 2010 - International Symposium on Biopolymers, Haus der Wirtschaft, Stuttgart, Germany (Plenary Lecture), 2010.10.7 (招待講演)
- (7) The microbial factory for synthesis of lactate-based polyester by using lactate-polymerizing enzyme, Finland-Japan Biotechnology Symposium 2010, Turku, Finland, 2010.6.9 (招待講演)
- (8) K. Matsumoto, M. Yamada, F. Shozui, S. Uramoto, R. Motohashi T. Nakai, K. Shimizu, S. Taguchi : Microbial Production of Lactate-based Polyesters. 第 59 回高分子学会年次大会(English section)、横浜、2010.5.26
- (9) F. Shozui, K. Matsumoto, T. Nakai , M. Yamada, S. Taguchi: Biosynthesis of novel terpolymers poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s in lactate-overproducing mutant *Escherichia coli* JW0885 by feeding propionate as a precursor of 3-hydroxyvalerate. International Conference on Bio-based Polymers 2009, Penang, Malaysia, 2009.11.12
- (10) Advanced microbial factory for lactate-based polymers driven by lactate-polymerizing enzyme、International Conference on Bio-based Polymers 2009, Penang, Malaysia, 2009.11.11 (招待講演)
- (11) An Innovative Microbial Factory for Lactate-based Biopolymer”: Conference on Innovative Polymers, Netherlands Science and Technology Officers Network, World Forum Convention Centre The Hague, The Netherlands, 2009.4.22 (招待講演)
- (12) M. Yamada, K. Matsumoto, K. Tajima, Y. Sato, M. Munekata, S. Taguchi: Alteration in the composition of PHA copolymer by the multiple combinations of beneficial amino acid substitution in PHA synthase from *Pseudomonas* sp. 61-3. International Symposium on Biological Polyesters 2008, Auckland, New Zealand, 2008.11.25
- (13) F. Shozui, K. Shimizu, K. Matsumoto, Y. Orikasa, S. Taguchi: Alteration of molecular weight in PHAs using in vitro engineered PHA synthases isolated from *Pseudomonas* sp.61-3. International Symposium on Biological Polyesters 2008, Auckland, New Zealand, 2008.11.25
- (14) In Vitro Engineering of PHA Synthase for New Biopolyester Synthetic System: International Symposium on Biological Polyesters 2008, Auckland, New Zealand, 2008.11.24 (招待講演)
- (15) Systematic Evolution of PHA Synthase for Tailor-made Biopolymer: International Symposium on Biological Polyesters 2008, Auckland, New Zealand, 2008.11.24 (招待講演)

演)

- (16) The Complete Bioprocess of Polymers Based on Enzyme Evolution: CRC International Symposium on Bio-interface and Biomass Conversion, Hokkaido, 2008.10.30 (招待講演)

[図書] (計 5 件) (代表的な図書を掲載)

- (1) S. Taguchi, T. Iwata, H. Abe, Y. DOI: "Poly(hydroxyalkanoate)s", Comprehensive Polymer Science - Submission update 9.7, Elsevier's Science Direct platform in press
- (2) T. Satoh, T. Kakuchi: "Hyperbranched Glyco-Conjugated Polymers" in Complex Macromolecular Architectures: Synthesis, Characterization, and Self-Assembly (eds. Hadjichristidis N., Hirao, A., Tezuka, Y., Prez, F. D.): 195-227 (John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd, Singapore, 2011).
- (3) 田口精一: 乳酸ポリマーのワンポット微生物合成 (バイオプロダクトと新プラットフォーム形成)「エコバイオリファイナー ―脱石油社会へ移行するための環境ものづくり戦略―」(シーエムシー出版)、pp.237-245、平成 22 年 12 月 ISBN-13: 978-4-7813-0283-6
- (4) 田口精一: バイオポリマーPHA と酵素分子進化学"、第 7 編 酵素を使う II-産業応用、第 6 章 環境「酵素 利用技術大系」(エヌ・ティ・エス)、pp. 920-925、平成 22 年 4 月 ISBN-13: 978-4-86043-271-3
- (5) 田口精一: バイオプラスチックの合成・調節・分解に関わる酵素群の科学と工学"、「産業酵素の応用技術と最新動向(バイオテクノロジーシリーズ)」(シーエムシー出版)、pp.257-271、平成 21 年 3 月 ISBN-13: 978-4781301082

[その他]

ホームページ等

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/index.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: 7 0 2 1 6 8 2 8

(2) 研究分担者

佐藤 敏文 (SATO TOSHIFUMI)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 8 0 2 9 1 2 3 5
松本 謙一郎 (MATSUMOTO KEN' ICHIRO)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号: 8 0 3 6 0 6 4 2

(3) 連携研究者

なし