

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：27401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651085

研究課題名（和文） 二酸化炭素を原料とした共重合ポリエステル微生物合成

研究課題名（英文） Microbial synthesis of copolymers 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

研究成果の概要（和文）：*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性の PHA 重合酵素 (PhaC1)、PHA 重合酵素の基質となる炭素数 6 以上の 3-ヒドロキシアシル CoA (3HA-CoA) を脂肪酸合成経路から供給する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ (PhaG)、さらには、*Ralstonia eutropha* 由来の β -ケトチオラーゼ (PhbA) およびアセトアセチル CoA リダクターゼ (PhbB) の各遺伝子を導入した *R. eutropha* の組換え株を作製した。その組換え株を糖あるいは二酸化炭素を唯一の炭素源として培養した結果、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (P(3HB))、あるいは、炭素数 5~8 の 3HA ユニットが 2.4 mol% 取り込まれた P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルを合成した。

研究成果の概要（英文）：Introduction of PHA synthase (PhaC1) and 3-hydroxyacyl-ACP:CoA transferase (PhaG) genes from *Pseudomonas* sp. 61-3, and beta-ketothiolase (PhbA) and acetoacetyl-CoA reductase (PhbB) genes from *Ralstonia eutropha* into PHA-negative *R. eutropha* strains resulted in the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] or poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) [P(3HB-co-3HA)] consisting of 3HA units of 5 to 8 carbon atoms from sugar or carbon dioxide as the sole carbon source. The 3HA mole fractions in the copolymers were less than 2.4 mol%.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2022年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：環境技術、環境材料、バイオテクノロジー、応用微生物

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、様々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 (例えば、ポリプロラクタムやポリエチレンサクシネート) 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。さらにその上を目指し、独立栄養細菌を PHA 合成における宿主とし、石油由来の汎用性プラスチックと同等な物性の優れた実用的な PHA を二酸化炭素から合成することができれば、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もある。

水素細菌 *Ralstonia eutropha* は PHA 合成細菌としてよく知られており、従属培養においては、フルクトースや炭素数が偶数の脂肪酸を炭素源として炭素数 4 の 3-ヒドロキシ酪酸 (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。これは、耐衝撃性の弱いポリエステルであり、硬くて脆い材料である。炭素数が奇数の脂肪酸を炭素源に用いると、炭素数 5 の 3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) を第 2 モノマー成分として含む P (3HB-co-3HV) 共重合ポリエステルを合成する。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ポリエステルは P (3HB) と比較して耐衝撃性が向上する。しかしながら、野生株では炭素数 6 以上の 3HA ユニートをポリエステル鎖中に取り込めない。これは PHA 重合酵素の基質特異性に起因する。そこで、申請者らはこれまでに、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 生合成遺伝子を同定し、本菌の低基質特異性 PHA 重合酵素 (PhaC1) の遺伝子を導入した異種および同種の組換え菌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) 共重合ポリエステル (3HB と炭素数 6~12 の 3HA からなるランダム共重合体) の合成に成功している。一方、*R. eutropha* を宿主とした場合、*phaC1* 遺伝子を導入した組換え株は、脂肪酸からは P (3HB-co-3HA) を合成するが、フルクトースや二酸化炭素からは P (3HB) が合成されるだけである。これは、*R. eutropha* が脂肪酸合成経路から第 2 成分モノマーの 3HA-CoA (炭素数 6 以上) を供給する系を有していないからである。そのため、3HA-CoA を供給する代謝経路を構築してやる必要がある。

2. 研究の目的

Ralstonia 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 は耐衝撃性が弱いポリ (3-ヒドロキシブタン酸)、P (3HB)、である。そこで、*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 3-ヒドロキシアシル CoA (3HA-CoA) を脂肪酸合成経路から供給する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*phaG*)、さらには、*R. eutropha* 由来の β -ケトチオラーゼ遺伝子 (*phbA*) およびアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子 (*phbB*) を導入した組換え株を作製し、糖や二酸化炭素から耐衝撃性に優れた P (3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルを代謝制御工学的に生合成させることを目的とした (図 1)。

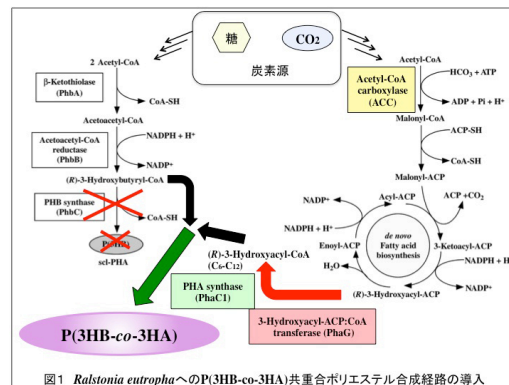


図 1 *Ralstonia eutropha* への P (3HB-co-3HA) 共重合ポリエステル合成経路の導入

3. 研究の方法

(1) 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*phaG*) 導入株の作製

Pseudomonas sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*) と脂肪酸合成経路の代謝中間体から PHA 重合酵素の基質を生成する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*phaG*) を広宿主域プラスミド pBBR1MCS-2 の *lac* プロモーターの下流に連結したプラスミド pRkMkSc-C1G を構築した。また、これに、*R. eutropha* 由来の 3HB-CoA 供給系酵素 (β -ケトチオラーゼ、アセトアセチル CoA リダクターゼ) 遺伝子 *phbAB* を挿入したプラスミド pRkMkSc-C1GAB を構築した。さらには、*R. eutropha* の P (3HB) 生合成遺伝子の *phbCAB* オペロンの native プロモーター支配下で同様に遺伝子を発現させるように設計したプラスミド pRkMkScK-C1GAB を構築した。これらのプラスミドを *R. eutropha* の PHA 合成能欠損株である PHB⁻4 株および C-TnGmHX8

株 (*phbC::gen*) にそれぞれ導入した組換え株を作製した。これらの組換え株をフルクトース、あるいは二酸化炭素を唯一の炭素源とし、窒素源を制限したミネラル培地で培養した。培養後、菌体内に合成・蓄積された PHA のモノマー組成比と菌体内蓄積率をガスクロマトグラフィー (GC)、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)、核磁気共鳴解析 (NMR) により決定した。

(2) アセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子を導入した組換え株の作製

アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) は脂肪酸合成経路における第 1 段階の反応を触媒し、脂肪酸合成経路の律速酵素であることが知られている。そこで、ACC 遺伝子 (*accADBC*) を *Pseudomonas aeruginosa* PAO のゲノム DNA からクローニングし、これを *phaC1* 遺伝子および *phaG* 遺伝子とともに導入した組換え *R. eutropha* を作製した。(1)と同様に、組換え株を培養し、合成された PHA の菌体内蓄積率とモノマー組成を分析した。

(3) *phaG* 遺伝子の発現確認

phaG 遺伝子を導入した大腸菌、*Pseudomonas* sp. 61-3、*R. eutropha* において、菌体破砕物のウェスタン解析によって PhaG 酵素の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*phaG*) 導入株が合成する PHA について

① *Ralstonia eutropha* PHB4 を宿主とした場合

lac プロモーター支配下で導入遺伝子を発現させた場合、フルクトースを炭素源として培養すると、*phaG* 遺伝子の導入により生育の抑制がみられた。pRKmKSc-C1G 導入株は 0.4 wt% の P(3HB) しか合成されなかった。pRKmKSc-C1GAB 導入株は 25 wt% の P(3HB-co-3HA) 共重合体を合成したが、3HA 分率 (炭素数 6~12) はわずか 3.3 mol% であった。一方、pRKmScK-C1GAB 導入株 (native プロモーター支配下で導入遺伝子を発現) は 21 wt% の P(3HB) を合成した。

② *Ralstonia eutropha* C-TnGmHX8 を宿主とした場合

PHB4 組換え株の培養結果とは異なり、*phaG* 遺伝子を導入しても生育は抑制されず、pRKmKSc-C1G 導入株および pRKmKSc-C1GAB 導入株ともフルクトースを炭素源として約 25 wt% の P(3HB-co-3HA) を合成し、そのポリエステル中の 3HA 分率は約 5 mol% であった。

しかしながら、pRKmScK-C1GAB 導入株は PHA を合成しなかった。続いて、P(3HB-co-3HA) を合成した pRKmKSc-C1G および pRKmKSc-C1GAB を導入した 2 株を独立栄養条件下で二酸化炭素を唯一の炭素源として培養した結果、20~60 wt% の PHA を合成した。しかしながら、どちらの組換え株とも合成された PHA への中鎖長 3HA ユニットの取り込みはほとんどなかった。

次に、pRKmKSc-C1GAB を導入した組換え株の乾燥菌体からポリエステルを抽出し、GC-MS および NMR 解析を行い、ポリエステル鎖中の詳細なモノマー組成を調べた。その結果、P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステル鎖中の 3HB 分率は 97.6 mol%、3HA 分率は 2.4 mol% であった (表 1)。また、このポリエステルの物性について調べたところ、破壊伸びが 23% であり、P(3HB) の 5% に比べて若干ではあるが、丈夫でしなやかな素材であると考えられた (表 2)。しかしながら、ポリエステル鎖への中鎖長 3HA ユニットの取り込みは極わずかであり、炭素数が 10 以上の 3HA ユニットがポリエステル鎖に取り込まれていないことから、PhaG 酵素がほとんど機能していないと考えられた。

表1 *Ralstonia eutropha* C-TnGmHX8の組換え株が合成したPHAのモノマー組成

Plasmids	PHA composition (mol%)			
	3HB (C4)	3HV (C5)	3HAMV (C6)	3HHx (C8)
pRKmKSc-C1GAB (P _{lac} - <i>phaC1</i> , <i>phaG</i> , <i>phbA</i>)	97.6	1.0	0.3	0.8

PHA composition was determined by GC/MS, and was confirmed by 500 MHz ¹H-NMR and 125 MHz ¹³C-NMR. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HV, 3-hydroxyvalerate; 3HAMV, 3-hydroxy-4-methylvalerate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate

表2 合成された共重合ポリエステルの物性と他のポリエステルとの比較

Sample	Melting temperature (°C)	Glass-transition temperature (°C)	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)	Extension to break (%)
P(3HB)	176	4	3.5	40	5
P(97.6% 3HB-co-3HA) (This study)	151	8	1.1	27	23
P(80% 3HB-co-3HV)	145	-1	0.8	20	50
P(94% 3HB-co-3HA)	133	-8	0.2	17	680
PP	176	-10	1.7	38	400
LDPE	130	-30	0.2	10	620

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HV, 3-hydroxyvalerate; 3HA, 3-hydroxyalkanoate (C_n-C₁₀); PP, polypropylene; LDPE, low-density polyethylene

(2) アセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子導入株が合成する PHA について

PHA を合成する *Pseudomonas* 属細菌は糖を炭素源として培養すると炭素数 10 の 3-ヒドロキシデカン酸を主成分とする PHA を合成するため、*R. eutropha* 組換え株における上記の (1) の結果の原因として以下のことを予想した。i) *R. eutropha* の脂肪酸合成における代謝回転が *Pseudomonas* 属細菌に比べて非常に速い。ii) PhaG 酵素の十分な活性発現にはコファクターが必要である。iii) アセチル CoA からマロニル CoA への変換量が *R. eutropha* では少ない。そこで、まず脂肪酸合成阻害剤のトリクロサン

を培地に添加して i) について検討したところ、PHA の蓄積率とモノマー組成に変化はみられなかった。

次に、ii) に関して *phaG* 遺伝子の発現について検討した。*phaG* 遺伝子を PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*) とともに大腸菌で発現させた場合、中鎖長 (炭素数 6 以上) の 3HA ユニットの取り込みは極僅かであることが知られている。大腸菌で発現させた PhaG 酵素は、SDS-PAGE およびウェスタンブロットにおいて推定分子量と同じ 33 kDa に検出されるが、*Pseudomonas* sp. 61-3 では 45 kDa に、そして、*phaG* 遺伝子を導入した *R. eutropha* では 33 kDa と 45 kDa に検出された。その分子量の差が約 12 kDa であることから、*Pseudomonas* sp. 61-3 菌体内では PhaG が 3HA-ACP と強く結合している (抱え込んでいる) が、*R. eutropha* ではその結合が弱いか、あるいは、菌体内の 3HA-ACP 存在量が単に少ないことも考えられた。そこで、iii) について検討するため、アセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子 (*accADBC*) を大腸菌からクローニングし、それらの遺伝子を *phaC1*、*phaG*、および、*phbAB* 遺伝子とともに、*lac* プロモーターあるいは *R. eutropha* の native プロモーターで発現するように設計したプラスミド pRkmKSc-*accC1GAB* と pRkmKSc-*accC1GAB* をそれぞれ構築した。そして、これらのプラスミドを *R. eutropha* PHB⁻4 および *R. eutropha* C-TnGmHX8 に導入して組換え株を作製し、フルクトースを炭素源として培養した。その結果、いずれの組換え株も生育が抑制され、PHA 蓄積率は 7 wt% 以下であり、3HA ユニットは検出されず、P(3HB)のみが合成された。

Pseudomonas sp. 61-3 に *phaG* 遺伝子を導入すると炭素数 6~12 の中鎖長 3HA 分率が高まった P(3HB-co-3HA) が合成されるが、*R. eutropha* に *phaG* 遺伝子を導入しても合成された PHA に 3HA ユニットがほとんど取り込まれないことから、PhaG 酵素の十分な活性発現には何らかのコファクターが必要かもしれない。あるいは、脂肪酸合成経路からの 3HA ユニット供給のためには、PhaG 酵素以外の酵素がさらに必要である可能性もある。最近、PhaG 酵素はトランスアシラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性の方が高いと報告されたことから、*R. eutropha* を宿主として糖あるいは二酸化炭素から P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルを合成するためには、3-ヒドロキシアルカン酸を CoA 化する新たな酵素遺伝子をクローニングして宿主に導入することや *R. eutropha* における代謝フラックスをさらに検討することが必要であると考えられた。

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)

[学会発表] (計 7 件)

- ①岩崎美佳、外村彩夏、坂本日名子、田中賢二、柘植丈治、松崎弘美、組換え *Ralstonia eutropha* における脂肪酸合成経路を介した共重合ポリエステルの生合成、日本農芸化学会 2013 年度 (平成 25 年度) 大会、3 月 26 日、仙台市
- ②外村彩夏、岩崎美佳、坂本日名子、松崎弘美、大腸菌を宿主とした生分解性共重合ポリエステルの生合成、日本農芸化学会 2013 年度 (平成 25 年度) 大会、3 月 26 日、仙台市
- ③坂本日名子、外村彩夏、岩崎美佳、田中賢二、松崎弘美、脂肪酸合計経路を介したポリヒドロキシアルカン酸の生合成、日本生物工学会九州支部大分大会 (2012) (第 19 回)、12 月 1 日、別府市
- ④岩崎美佳、外村彩夏、田中賢二、柘植丈治、松崎弘美、組換え *Ralstonia eutropha* における脂肪酸合成経路を介した共重合ポリエステルの生合成、日本生物工学会 2012 年度 (平成 24 年度) 大会 (第 64 回)、10 月 24 日、神戸市
- ⑤岩崎美佳、外村彩夏、田中賢二、柘植丈治、元村あかね、松崎弘美、*Ralstonia eutropha* における脂肪酸合成経路からの共重合ポリエステル生合成に関する研究、日本生物工学会九州支部福岡大会 (2011) (第 18 回)、12 月 10 日、福岡市
- ⑥外村彩夏、岩崎美佳、田中賢二、柘植丈治、元村あかね、松崎弘美、脂肪酸合成経路を介した組換え *Ralstonia eutropha* による共重合ポリエステルの生合成、日本生物工学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会 (第 63 回)、9 月 27 日、東京
- ⑦宮脇賢大、田中賢二、外村彩夏、岩崎美佳、松崎弘美、共重合 PHA 生合成遺伝子を導入した *R. eutropha* 組換え株の独立培養条件下での菌体合成、日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会 (2011)、9 月 17 日、宮崎市

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) 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