

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号： 10101
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23710102
 研究課題名（和文） バイオポリマーの合成増強を目指したモノマー供給酵素の進化工学

研究課題名（英文） Engineering of monomer supplying enzyme for enhanced biopolymer production

研究代表者

渡辺 剛志 (Watanabe Tsuyoshi)

北海道大学・大学院工学研究院・博士研究員

研究者番号： 40599601

研究成果の概要（和文）：アセトアセチル CoA レダクターゼ(PhaB)は、アセトアセチル CoA と NADPH の 2 基質から 3-ヒドロキシブチリル CoA を生成する酵素であり、ポリヒドロキシブタン酸の生合成系におけるモノマー供給酵素である。本研究では、進化工学的手法により PhaB の高活性変異体を 2 つ取得した。本変異体は最大で野生型酵素の約 3 倍の活性を示し、コリネ菌を宿主としたポリヒドロキシブタン酸の合成に適応したところ、最大で 3 倍程度の生産性の向上が見られた。

研究成果の概要（英文）：Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) catalyzes the reduction of acetoacetyl-CoA into 3-hydroxybutyryl-CoA using NADPH as a reducing power. 3-Hydroxybutyryl-CoA serves as a monomer substrate for the microbial polyester, polyhydroxybutyrate. The aim of this study is to engineer PhaB for enhancing the enzymatic activity. The kinetic analysis of the selected mutants revealed that they possess enhanced turnover rate. The effectiveness of the obtained mutants of PhaB on polyhydroxybutyrate production was evaluated using *Corynebacterium glutamicum*, indicating that the content of polyhydroxybutyrate was increased up to 3-fold compared to the wild-type PhaB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：アセトアセチル CoA レダクターゼ

1. 研究開始当初の背景

プラスチックは、便利な生活に欠かせない有用な物質である。しかし近年、プラスチックの原料となる石油資源の枯渇や、大気中の二酸化炭素の増加が原因と考えられる気候変動が大きな社会問題となり、その解決策として、石油に依存しないバイオマスを原料としたプラスチック開発が模索されている。微生物が合成するポリヒドロキシブタン酸と

呼ばれるポリエステルは、炭素源の貯蔵物質として合成されていると考えられているが、細胞内から単離生成すると、熱可塑性を有するプラスチックとしての物性を示すことから、バイオマス由来プラスチックの候補として期待される。加えて、ポリヒドロキシブタン酸は環境中の微生物によって分解されることから、自然界にゴミが蓄積しない環境低負荷型の材料であるという性質も有する。すでに、国内外のいくつかの化学メーカーによ

り、ポリヒドロキシブタン酸をベースとしたポリマーが商業生産されている。しかしながら、ポリヒドロキシブタン酸をベースとするプラスチックは、他のプラスチックに比べて生産コストが高く、製品価格が高くなっていることが問題視されている。価格競争力を得るために、安価な原料の利用、加工プロセスの効率化など多くの努力がなされており、中でも、微生物そのものの能力を向上させることにより、ポリヒドロキシブタン酸の合成効率を向上させる事は、非常に重要な研究課題である。

ポリヒドロキシアルカン酸は、アセチル CoA を出発物質として、 β ケトチオラーゼ (PhaA) によるアセトアセチル CoA への二量化、アセトアセチル CoA レダクターゼ (PhaB) による、NADPH 依存的なアセトアセチル CoA の 3-ヒドロキシブチリル CoA への還元、次いで、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素 (重合酵素) による重合を経て合成される。PhaA および PhaB はポリヒドロキシブタン酸のモノマー供給系酵素と呼ばれる。これらの酵素群をコードする遺伝子群を遺伝子組換え技術により微生物に導入すると、天然ではポリヒドロキシブタン酸の合成能を持たない微生物にも、ポリヒドロキシブタン酸を合成させることが出来る。例えば、ポリヒドロキシブタン酸合成系遺伝子群を導入した大腸菌は、グルコースなどの炭素源を利用してポリヒドロキシブタン酸を合成する。この系は、ポリヒドロキシブタン酸合成のモデルシステムとして多くの研究で利用されてきた。

ある代謝産物の生産性を向上させることを考えた場合、合成経路の中で、最も非効率になっているステップを強化することが基本的な戦略である。連続する一連の反応の中で、最も遅いものを律速段階と呼ぶ。多くのポリヒドロキシブタン酸の合成系において、PhaB の発現量を増加させると、ポリマー合成量が増加することが知られており、一方で、重合酵素の発現量を向上させても合成されるポリマー量に大きな変化がないことが報告されている。これらの結果から、典型的なポリヒドロキシブタン酸の合成系においては、PhaB がポリヒドロキシブタン酸合成の律速段階であることが示唆されていた。しかしながら、PhaB の発現量を増加させる研究は数多くの報告例があるのに対して、PhaB の比活性を向上させた研究例は現在までに報告されていない。細菌は、酵素を作り出すために多くのエネルギーを消費するため、1分子当たりの酵素活性が高まれば、生合成系全体の効率を大幅に改善できることが期待される。そこで、本研究では、PhaB に進化工学的改変を施し、高活性変異体を取得することを目的とした。

2. 研究の目的

酵素の改変には、タンパク質の立体構造に基づいて活性に影響を与えると予想される部位に変異を導入する部位指定変異法と、ランダムに変異を導入したライブラリーの中から、有用な変化をしたものを選抜するスクリーニング法の、大きく2つのアプローチがある。本研究では、研究開始時に立体構造が明らかになっていなかったため、ランダムスクリーニング法による改変を検討した。第一段階として、PhaB 遺伝子にランダム変異を導入してライブラリーを作成し、その中から、高活性を示す優良変異体を取得することを目的とした。次いで、得られた変異が酵素のターンオーバーおよび基質親和性に与える影響を明らかにするために、反応速度論解析を行った。さらに、PhaB およびその変異体の立体構造を解析し、構造・機能相関を明らかにすることを目指した。最終的に、取得した変異体がポリヒドロキシブタン酸の合成を促進する事を証明するため、コリネ菌を宿主としたプラットフォームを用いてポリマー生産を行った。

3. 研究の方法

核酸の manipulation は定法により行った。エラープローン PCR は文献の方法を参考とした。宿主は、大腸菌 JM109 株を用い、ポリマー生産のための培養を行う際には、LB 培地に所定の濃度の抗生物質と 2%グルコースを加えた培地を用い、30°Cで 48 時間振盪培養した。

ポリマー分析のため、培養後の菌体を遠心分離して、洗浄・凍結乾燥したのち、濃硫酸中で加熱することにより、細胞を溶解させるとともに、細胞中のポリヒドロキシブタン酸をクロトン酸に変換した。溶液中のクロトン酸を、HPLC を用いたイオン排除クロマトグラフィーにより分離し、示差屈折率計により定量した。

PhaB の酵素活性を測定するために、*phaB* 遺伝子と His-tag をコードする遺伝子配列を結合し、融合タンパク質の発現ベクターを構築した。これを大腸菌 BL21 株に導入し、所定の濃度の抗生物質を含む LB 培地を用い、30°Cで振とう培養を行い、培養途中で IPTG を添加することにより、PhaB タンパク質の発現を誘導した。得られた菌体を超音波処理して調整した菌体粗抽出液を、Ni を配位させたレジンに通すことにより、His-tag-PhaB を特異的に吸着させた。次いでイミダゾールを含むバッファーを用いて目的タンパク質を溶出し、この溶出液をゲルろ過カラムに通すことにより、イミダゾールを除去した。こ

の一連のアフィニティー精製により得られた精製酵素を用いて、酵素活性測定を行った。所定の濃度の酵素に、SIGMA より購入したアセトアセチル CoA および、NADPH を加え、キュベット中にて 30℃ で反応させ、NADPH の消費に伴う吸光度変化を測定して、酵素活性とした。

コリネ菌の形質転換は、エレクトロポレーション法により行った。所定の濃度の抗生物質およびグルコースを 6% 含む MMTG 培地で組換えコリネ菌を培養し、得られた菌体から、大腸菌と同様の手法を用いて、乾燥菌体を調製した。乾燥菌体を硫酸メタノール中で加熱することにより、菌体を溶解させるとともに、細胞内のポリヒドロキシブタン酸を 3-ヒドロキシブタン酸のメチルエステルに変換した。得られた低分子エステルをガスクロマトグラフィーにより定量した。

4. 研究成果

Ralstonia eutropha から単離した *phaB* 遺伝子に、エラープライム PCR によりランダム変異を導入した。得られた遺伝子断片を他のモノマー供給系酵素遺伝子および重合酵素遺伝子と組み合わせることにより、ポリヒドロキシブタン酸を合成できるプラスミドを構築した。作成したプラスミドを、大腸菌の JM109 株に導入し、組換え株を得た。この組換え株を、グルコースを含む LB 培地で培養することにより、ポリヒドロキシブタン酸を合成させた。合成されたポリマー量がコントロールよりも多い株を優良変異体候補としてプールし、最終的に再現性よく高蓄積を示した 2 株を優良変異体とした。単離した大腸菌からプラスミドを抽出し、*phaB* 遺伝子の塩基配列を確認した結果、それぞれ 1 つの塩基置換が起こっていることが分かった。

得られた変異体 *phaB* 遺伝子および野生型の遺伝子から作成した His-tag ベクターを用いて、野生型および変異型の PhaB タンパク質を精製した。PhaB タンパク質は、1 段階のアフィニティークロマトにより、SDS-PAGE でシングルバンドになるまで精製した。この精製酵素を用いて、基質濃度を変えて反応速度を測定し、測定値を Lineweaver-Burk プロットすることにより、酵素動学的パラメーターを決定した。その結果、得られた変異体はいずれも最大反応速度を示す k_{cat} の値が上昇していることが分かった。一方で、2 つの変異体は、アセトアセチル CoA および NADPH に対する親和性がそれぞれ低下していることが分かった。また、Lineweaver-Burk プロットの形状から、アセトアセチル CoA と NADPH が同時に酵素に結合している 3 者複合体を形成している事

が示唆された。

北海道大学理学部田中博士らとの共同研究により、これらの変異体の立体構造を解析した。その結果、PhaB は、脂肪酸合成酵素の一つであり、類似の反応を触媒する 3-ケトアシル ACP レダクターゼと類似した構造を有していることが分かった。また、今回導入した変異は PhaB の構造をほとんど変えていないことが確認された。さらに、酵素動学的解析から予想されたように、PhaB タンパク質は、アセトアセチル CoA と NADPH との 3 者複合体を形成することがわかった。単離した変異点は、基質の結合部位の近傍でありながら、直接的な相互作用をしない部位であることが分かった。しかし、得られた変異点のタンパク質内の位置は、酵素動学的パラメーターの変化から示唆される傾向と矛盾のない位置に見出された。これらの事実から、新たに単離した優良変異により、酵素の基質認識に違いが生じ、その結果酵素活性が高まったことがわかった。

得られた *phaB* 遺伝子変異体のポリヒドロキシブタン酸生産への有用性を確認するため、*phaB* 遺伝子をその他のモノマー供給系酵素および重合酵素遺伝子とともに、コリネ菌の一種、*Corynebacterium glutamicum* に導入した。得られた組換え株を、グルコースを含む培地で培養し、菌体量とポリマー蓄積率の変化を測定した。コリネ菌は、アミノ酸生産に用いられている産業微生物であり、安全性が確立されている事に加え、菌の生育が非常に旺盛であることが特徴である。そのため、細胞内に蓄積されるポリヒドロキシブタン酸の生合成において、ポリマーを蓄積する要領が大きく、生産性の向上を評価しやすいと言うメリットがある。実験の結果、今回取得した変異体を導入したコリネ菌株は、培養後期からポリマー蓄積率が大きく向上し、野生型 PhaB を発現するコリネ菌と比較して約 3 倍のポリマーを合成した。このことから、本研究で取得した変異体は、ポリヒドロキシブタン酸の合成の促進に効果的であることが示された。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

① 渡辺剛志、松本謙一郎、本橋廉、池田弘二、田中良和、姚閑、田中勲、田口精一:”動学的解析および立体構造に基づいた進化形アセトアセチル-CoA レダクターゼの高活性化メカニズムの解明”、日本農芸化学会大会、25. 3. 2013, 東北大学、仙台

()

研究者番号：

② 渡辺剛志、宋育陽、松本謙一郎、大井俊彦、田口精一：“進化工学的改変によるPhaBの速度論的解析とPHB生産性の向上”日本農芸化学会北海道支部学術講演会、03. 11. 2012, 北海道大学、札幌

③ T. Watanabe, Y. Song, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: “Improvement of polyhydroxybutyrate production by the engineered acetyl-CoA reductase in *Corynebacterium glutamicum*”, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 17. 9. 2012. Daegu, Korea, EXCO.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0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0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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 剛志 (Watanabe Tsuyoshi)
北海道大学・大学院工学研究院・博士研究員
研究者番号：40599601

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし