

平成21年 6月25日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19510102  
 研究課題名(和文) 環境調和型バイオポリエステルの生合成遺伝子の分子解析とその生産システムの開発  
 研究課題名(英文) Molecular analysis of sustainable biopolyester biosynthesis gene and development of the production system  
 研究代表者  
 松崎 弘美 (MATSUSAKI HIROMI)  
 熊本県立大学・環境共生学部・准教授  
 研究者番号：30326491

研究成果の概要： *Pseudomonas* sp. 61-3 におけるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 生合成遺伝子クラスター上の機能不明遺伝子 (ORF) が転写されることを確認した。次に、PHA 合成能欠損変異株との相補性試験を行ったところ、この ORF に PHA 重合酵素活性はなかった。一方、広宿主域ベクター pJRD215 を用いた *Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株は低密度ポリエチレンと同等の物性の優れた PHA を合成するが、多コピーベクター pBBR1MCS-2 に替えた組換え株を作製したところ、ゴム弾性を示すと思われる PHA が合成された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	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：生分解性プラスチック、ポリヒドロキシアルカン酸、PHA

## 1. 研究開始当初の背景

ある種の微生物がエネルギー貯蔵物質として体内に蓄積するバイオポリエステル、ポリヒドロキシアルカン酸 (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るため、環境に負荷を与えない高分子材料、すなわち、環境調和型バイオポリエステルとして地球環境保護の視点からも有効である。さらに、PHA は微量ながらヒトの組織・細胞内にも存在し生

体適合性を有すことから、生体機能材料として生物・医薬領域への展開も期待されている。したがって、PHA 生合成機構を分子レベルで詳細に明らかにすることで、物性の優れた PHA の創製と低コスト生産が可能になると考えられる。PHA はその構成単位 (モノマー単位) の構造により大きく2つに大別できる。一つは、炭素数3～5の短鎖長 (short-chain-length) のヒドロキシアルカン酸 (HA) をモノマー単位とする scl-PHA であり、

最も一般的なものは炭素数4の3-ヒドロキシブタン酸(3HB)からなるポリ(3-ヒドロキシブタン酸)、P(3HB)ホモポリマーである。もう一つは、炭素数6~14の中鎖長(medium-chain-length)のHAからなるmcl-PHAである。これらのモノマー単位の相違はPHA重合酵素の基質特異性に大きく依存する。物性面では、P(3HB)は汎用性プラスチックのポリプロピレンと比べて似た性質を示すものの耐衝撃性が弱く、いわゆる硬くて脆い物質である。一方、mcl-PHAは結晶化せずにゴム弾性を示す。したがって、一般的には、野生株が合成するPHAは生分解性を有するもの的高分子材料(プラスチック)として実用性に乏しいことが問題であった。そこで、ポリエステルモノマー単位が3HBの他に第2成分として鎖長の長い3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)が取り込まれた共重合ポリエステルを合成することができれば耐衝撃性が増した丈夫かつしなやかな高分子材料を創製することができると考えられる。これらポリエステルのモノマー組成はPHA重合酵素の基質特異性に依存する。例えば、P(3HB)合成細菌としてよく知られている*Ralstonia eutropha*のPHA重合酵素は炭素数5の3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)までしかポリエステル鎖中に取り込めない。また、mcl-PHA合成細菌の*Pseudomonas oleovorans*や*P. aeruginosa*は炭素数6~14の3HAからなるPHAを合成するが、これらのPHA重合酵素は炭素数5以下の3HAをポリエステル鎖中に取り込むことはほとんどできない。そのため、幅広い基質を利用できるPHA重合酵素を有する微生物を自然界から分離することが試みられ、申請者らは、非常に珍しいPHA合成細菌*Pseudomonas* sp. 61-3を土壌より分離した。*Pseudomonas* sp. 61-3はscl-PHAとmcl-PHAの2種類のPHA生合成遺伝子クラスター(*phb*および*pha*遺伝子クラスター)を有し、同一菌体内にP(3HB)ホモポリマーと炭素数4~12の3HAからなるランダム共重合体P(3HB-co-3HA)を合成する。本菌からP(3HB-co-3HA)を抽出したところ、mcl-PHAと同様に非晶質であったが、P(3HB-co-3HA)を合成する微生物はほとんど知られておらず、この菌の幅広い基質を利用できるPHA重合酵素の遺伝子(*phaC1*)を用いて代謝制御工学的にポリエステル鎖中の3HB分率を高めてやれば丈夫な高分子材料を作製できると考えられた。そこで、*phaC1*遺伝子と*R. eutropha*由来の3HB-CoAを供給する酵素遺伝子(*phbAB*)を*P. putida*と*R. eutropha*のPHA合成能欠損変異株に導入した。その結果、これらの組換え株は糖や脂肪酸、植物油などのバイオマスからいずれもP(3HB-co-3HA)を合成し、使用する炭素源によっては3HB分率を50mol%まで高めること

ができた。しかしながら、そのポリエステルはまだ非晶質であり、蓄積率も25%程度であった。そこで、セルフクロニング系を検討し、*Pseudomonas* sp. 61-3のscl-PHA重合酵素遺伝子(*phbC*)を相対的組換えにより破壊した株(*Pseudomonas* sp. 61-3(*phbC::tet*))を宿主に同様な組換え株を作製したところ、グルコースから3HB分率が94mol%からなるP(3HB-co-3HA)を合成することに成功した。このような3HB分率が非常に高いP(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルがつけられたことはなく、その物性を調べたところ、引っ張り強度が680%で汎用性プラスチックの低密度ポリエチレンとほぼ同じ性質を示した。すなわち、一般的な微生物ポリエステルが硬くて脆いのにに対して、この組換え株で作製されたポリエステルは丈夫な生分解性プラスチック材料といえ画期的なものであった。この研究により、*Pseudomonas* sp. 61-3のPHA重合酵素遺伝子(*phaC1*)を用い、重合酵素の基質となるポリエステルモノマー供給系を代謝制御工学的に調節することによって、硬いものから柔らかいものまで自由に物性をコントロールすることができる生分解性プラスチックの創製が可能になり、PHA実用化への問題の一つである物性面を解決することができた。

実用化へのもう一つの最大の問題はコスト面である。そのため、廃棄物など安価なバイオマス資源からのPHA生産、培養工学的的手法による生産性の向上、菌体内に蓄積されているPHAの回収などを低コストで行う必要がある。それゆえ、まずはPHAの菌体内蓄積率の向上が望まれ、PHA重合酵素だけでなくPHA生合成に関連する遺伝子全ての詳細な解析が重要と考えられた。セルフクロニング系の組換え微生物が合成するP(3HB-co-3HA)はこれまでにない優れた物性を有しているものの菌体内蓄積率は50%程度であり、さらなる蓄積率の向上を目指し、改良の余地があると考えられた。

## 2. 研究の目的

### (1) PHA顆粒結合タンパク質の役割

*Pseudomonas* sp. 61-3はP(3HB)ホモポリマーとP(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの2種類のPHAを同一菌体内に蓄積するが、これらのPHA顆粒には、それぞれに特異的な顆粒結合タンパク質(GAP; Granule-associated protein)が結合している。GAPは主にPHA顆粒の菌体内での安定性に寄与していると考えられているが、PHA生合成遺伝子群の転写調節にも関与しているものも報告されている。また、GAPがポリエステル鎖をどのように認識し特異的に結合しているかについては不明である。これらを明らかにするには、性質の異なる2種類のPHAを合成・蓄積し、

加えてモノマー組成比が異なる共重合ポリエステル<sup>1</sup>の作製が可能な *Pseudomonas* sp. 61-3 を用いてのみ可能である。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株を何種類も作製し、3HB 分率と 3HA 分率の異なる共重合ポリエステルを菌体内にただ 1 種類のみ合成・蓄積させた際の GAP の結合性についてタンパク質レベルで検討した。その結果、各 GAP は PHA 重合酵素との相互作用ではなく PHA のモノマー鎖を認識していることが強く示唆された。さらに、GAP 遺伝子をそれぞれクローニングしたところ、*scl*-PHA-GAP 遺伝子 (*phbP*) は P(3HB)合成の *phb* 遺伝子クラスターに、*mcl*-PHA-GAP 遺伝子 (*phaF* および *phaI*) は P(3HB-*co*-3HA)合成に必要な PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*) と同じ *pha* 遺伝子クラスターに位置していることが明らかとなった。P(3HB-*co*-3HA)の生合成において、3HB 分率が低い場合 (*mcl*-PHA と同等な性質) は *PhaF* および *PhaI* がポリエステル顆粒に結合しているが、3HB 分率が 90mol% 程度以上になると *scl*-PHA に特異的な *PhbP* が結合し、*PhaF* や *PhaI* の結合はほとんどみられなかった。このことは GAP が PHA 重合酵素との相互作用ではなく、PHA のモノマー鎖を認識していることを強く示唆するものであるが、加えて、ポリエステルのモノマー組成に相応しい GAP を選択することによって高蓄積率で PHA を合成させることができるのではないかと考えた。そこで、GAP 遺伝子の高発現が 3HB 分率の高い実用的なポリエステル P(3HB-*co*-3HA)合成において、そのモノマー組成、蓄積率、分子量に及ぼす影響について調べた。

### (2) PHA 生合成関連遺伝子の同定および機能解析

*Pseudomonas* sp. 61-3 における *scl*-PHA-GAP 遺伝子 (*phbP*) は *phb* 遺伝子クラスターの推定転写アクチベーター遺伝子 (*phbR*) の約 3 kb 下流に位置していた。さらに、*phbP* 遺伝子のすぐ下流には、相同性検索から *phbP* 遺伝子の転写を抑制すると推定された *phbF* 遺伝子が *phbP* 遺伝子と逆向きに位置していた。また、コンピューター解析および相同性検索により検討した結果、*phbR* 遺伝子と *phbP* 遺伝子の間に機能不明の ORF (オープンリーディングフレーム) を発見した。これは、*phb* 遺伝子クラスター上に位置することから、PHA 生合成 (特に、*scl*-PHA の生合成) に何らかの役割を担っている可能性がある。したがって、これら PHA 生合成関連遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。

### (3) 効率的な PHA 生合成を目的とした分子設計および宿主微生物の改変

*Pseudomonas* sp. 61-3 における PHA 生合成

遺伝子の機能解析で得られた知見を基に、ベクターやプロモーターを組み合わせ、物性の優れた PHA を効率よく合成する遺伝子組換え株の分子育種を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) PHA 顆粒結合タンパク質高発現株の作製

PHA のモノマー組成に相応しい GAP を選択することによって高蓄積率で PHA を合成できるのではないかと考えた。また一方で、*Pseudomonas oleovorans* において、*mcl*-PHA に特異的に結合する *PhaF* タンパク質が GAP であるとともに、PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*) の転写を抑制する調節タンパク質でもあることから、GAP の高発現が PHA 蓄積率の低下を招くことも考えられた。そこで、*mcl*-PHA-GAP の *PhaI*、*PhaF*、および、*PhaIF*、*scl*-PHA-GAP の *PhbP* の高発現株を作製することにした。

*Pseudomonas* sp. 61-3 の *scl*-PHA 重合酵素遺伝子 (*phbC*) を破壊した株を宿主とし、これに、それぞれの GAP 遺伝子を多コピー広宿主域ベクター pBBR1MCS-5 の *lac* プロモーター下流に挿入して構築したプラスミド、pRGmKX-*phaI*、pRGmKX-*phaF*、pRGmKX-*phaIF*、pRGmKX-*phbP* をそれぞれ導入して、GAP 遺伝子高発現組換え株を作製した。さらに、これらの株に低コピー広宿主域ベクター pJRD215 に *phaC1* 遺伝子および *R. eutropha* 由来の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子 (*phbAB*) を挿入したプラスミド pJKSc54-*phab* を導入し、計 8 種類の *Pseudomonas* sp. 61-3 組換え株を作製した。これらの組換え株については、窒素源を制限したミネラル培地で培養し、合成された 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により決定した。

#### (2) PHA 生合成関連遺伝子の機能解析

##### ① *phbF* 遺伝子の機能解析

*scl*-PHA-GAP である *PhbP* の遺伝子の転写を抑制すると推定された *phbF* 遺伝子の機能を解析するため、*phbP* 遺伝子と機能不明 ORF 間の DNA 領域との結合性をゲルシフトアッセイにて調べるため、大腸菌による *phbF* 遺伝子の高発現と *PhbF* の精製を試みた。pQE30 プラスミドに *phbF* 遺伝子を挿入し、pQE30F を構築した。これを *Escherichia coli* M15[pREP4]に形質転換し、His-tag 融合 *PhbF* タンパク質の発現と精製を試みた。また、*E. coli* M15[pREP4]/pQE30F の菌体破砕物可溶性画分について、*phbP*-ORF 間の 252-bp フラグメントに対するゲルシフトアッセイを行った。

##### ② 機能不明 ORF の分子解析

*Pseudomonas* sp. 61-3における *phb* 遺伝子クラスター上には、PHA (scl-PHA) の生合成に関わる、*phbF*、*phbP*、*phbR*、*phbB*、*phbA*、*phbC*、の各遺伝子が同定されている。また、*phbP* と *phbR* 遺伝子間の約 3 kb 領域の全塩基配列を決定したところ、2439 bp、812 アミノ酸残基からなる推定分子量 90.2 kDa のタンパク質をコードしていると考えられる機能不明 ORF を見出した。そこで、この ORF の破壊株を作製した際の表現型、RT-PCR による転写解析、ドメイン解析などを行って、ORF の機能解析を行った。

(3) ポリヒドロキレートアルカン酸合成細菌の宿主およびベクターの検討

*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc54-*phab* はグルコースを唯一の炭素源として 3HB 分率が 94mol% と高い P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルを合成する。これは低密度ポリエチレンと同等な優れた物性を示すが、その蓄積率は 50% 程度である。そこで、適切な宿主-ベクター系を確立し、物性の優れた PHA を効率的に大量に生産させることを検討した。pJRD215 よりも多コピーの広宿主域ベクター pBBR1MCS-2 に、異なるプロモーターの支配下で *phaC1* 遺伝子および *phbAB* 遺伝子を挿入した組換えプラスミドを作製した。このプラスミドを、*Pseudomonas putida* GPP104、*R. eutropha* PHB<sup>4</sup> および *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) に導入した組換え株を作製し、それらが合成する PHA のモノマー組成と蓄積率を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) PHA 顆粒結合タンパク質高発現株による PHA の合成

*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)、および、合成される PHA の 3HB 分率を高めた

*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc54-*phab* を宿主に用いて、4 種類のプラスミド

(pRGmKX-*phaI*、pRGmKX-*phaF*、pRGmKX-*phaIF*、pRGmKX-*phbP*) をそれぞれ導入した組換え株を、グルコース、あるいは、ドデカン酸を唯一の炭素源として培養し、合成された PHA のモノマー組成と蓄積率について調べた。その結果、導入した GAP 遺伝子の種類には関係なく、いずれの場合も GAP 遺伝子導入前の株とほぼ同様なモノマー組成比と蓄積率からなる PHA を合成した。すなわち、本実験条件では、いずれの GAP も PHA の蓄積率とモノマー組成比に影響を与えなかった。

(2) PHA 生合成関連遺伝子の機能解析

① PhbF タンパク質の高発現、精製、および、機能解析

*E. coli* M15[pREP4]/pQE30F を 37°C にて培

養し、1 mM IPTG で 4 時間誘導発現させた。その結果、可溶性画分に約 20 kDa の His-tag 融合 PhbF を確認した。その後、キレートカラムによるアフィニティクロマトグラフィーでの精製を試みたが、精製することはできなかった。これは PhbF 融合タンパク質における N 末端 His-tag 領域が立体構造上の内部に潜り込んでいるためではないかと予想した。そこで、*E. coli* M15[pREP4]/pQE30F の菌体破砕物の可溶性画分を用いて、標的 DNA とのゲルシフトアッセイを行った。明瞭な結果は得られてはいないが、*phbP*-ORF 間の 252-bp フラグメントと PhbF タンパク質の結合が強く示唆された。

② ORF の機能解析

*phb* 遺伝子クラスター上に見出された ORF が遺伝子として機能しているかを調べるため、*Pseudomonas* sp. 61-3 を栄養源豊富な LB 培地および窒素源を制限した MS 培地 (PHA 蓄積条件) で培養し、それぞれの条件における ORF の転写を RT-PCR により調べた。その結果、LB 培地での培養 8 時間および 24 時間、MS 培地での培養 12 時間において ORF の mRNA への転写が確認された。また、MS 培地での培養 24 時間目では転写は確認されなかった。以上から、ORF が何らかの遺伝子として機能し、その発現は栄養豊富な (窒素源が十分に培地中に存在する) ときに転写されることが明らかとなった。

次に、この ORF をトランスポゾンを利用した相対的組換えにより破壊した株、*Pseudomonas* sp. ORF-TnK、さらには、*Pseudomonas* sp. (ORF::*kan*(Tn10), *phbC::tet*) を作製した。これらの遺伝子破壊株の PHA 生合成について調べたところ、PHA 合成における表現型に違いは見られなかった。

さらに、ORF のドメイン解析を行ったところ、 $\alpha/\beta$  ヒドロラーゼドメインを有することから、ORF の PHA 重合酵素活性について調べることにした。ORF 遺伝子を PHA 合成能欠損変異株の *P. putida* GPP104 および *R. eutropha* PHB<sup>4</sup> に導入したところ、これらの組換え株はいずれも PHA を合成しなかった。さらに、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) へも導入したが、PHA の蓄積率と組成に変化はみられなかった。現在、ORF の分解酵素活性について検討している。

(3) ポリヒドロキレートアルカン酸合成細菌の宿主およびベクターの検討

*P. putida* GPP104、*R. eutropha* PHB<sup>4</sup> および *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) のいずれの宿主を用いても、ベクターを pJRD215 から多コピーの pBBR1MCS-2 に変更した組換え株は、pJRD215 由来のものとは比べ PHA の蓄積率はほとんど変わらないものの、PHA における

3HB 分率が 40~80%程度まで低下し、ゴム弾性を示すと思われる PHA を合成した。これは PHA 重合酵素 (PhaC1) が疎水性が高く、多量に発現させたことにより細胞内に凝集・不溶化してしまい、そのために不活性化してしまったのではないかと推察している。また、培養条件におけるグルコースと窒素源濃度を高めたところ、菌体量の顕著な増加がみられたが、PHA 蓄積率やモノマー組成に変化は見られなかった。以上のように、PHA 合成においては、多コピープラスミドを用いて単に遺伝子を高発現すればよいというものではなく、適切な発現レベルというものがああり、今後もさらなる検討を行う必要があると考えられた。

#### 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 4 件)

- ①近藤夕夏、稲田愛、黒田沙織、松崎弘美、微生物ポリエステル合成細菌の分子育種に関する研究、日本生物工学会九州支部熊本大会 (2008)、12 月 3 日、熊本
- ②清水日佳里、佐志綾乃、永井紗和子、祝迫めぐみ、松崎弘美、*Pseudomonas* sp. 61-3 における PHA 生合成関連遺伝子に関する研究、日本農芸化学会 2008 年度大会、3 月 27 日、名古屋
- ③祝迫めぐみ、佐志綾乃、清水日佳里、永井紗和子、松崎弘美、遺伝子組換え *Pseudomonas* sp. 61-3 による PHA 生産、日本生物工学会九州支部長崎大会 (2007)、12 月 1 日、長崎
- ④佐志綾乃、清水日佳里、福田真利、土肥義治、松崎弘美、*Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸生合成機構、日本農芸化学会 2007 年度大会、3 月 26 日、東京

#### 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・准教授  
研究者番号：30326491