

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19710076
 研究課題名（和文） ポリエステル生産の効率化のための組換え植物の生育阻害機構の解明とその改善
 研究課題名（英文） Analysis of growth inhibition of polyester-producing transgenic plants for efficient polyester production
 研究代表者
 松本 謙一郎（MATSUMOTO KENICHIRO）
 北海道大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：80360642

研究成果の概要：バイオプラスチック（PHA）の合成遺伝子を導入した遺伝子組換えイネは、細胞内にPHAを作ることができる。しかしPHAを蓄積することにより、植物の生育が悪くなることが知られていた。そこで、その原因を解明するため、組換え株と野生株の遺伝子の働きを網羅的に解析し、組換え株の中で遺伝子の働きにどのような変化が起こったのかを調べた。その結果、組換え株で影響を受けていると考えられる遺伝子を数個見つけることができた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,100,000 | 0 | 2,100,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 390,000 | 3,790,000 |

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：PHA、遺伝子組換え植物、イネ、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

微生物が貯蔵物質として合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、再生可能なバイオマスを原料に合成できるバイオプラスチックであり、石油由来のプラスチックの代替材料としての利用が期待されており、実用化のためには生産コストの削減が大きな課題である。我々は、PHAをより低コストで生産するために、PHAの生合成系遺伝子群を導入した組換え植物におけるPHA生産を検討してきた。しかし、PHAを蓄

積した植物は生育が阻害され、生産性が低下する事が問題であった。生育阻害は低いPHA蓄積率でも起こることから、ポリマーの蓄積が植物の遺伝子発現を攪乱することで、生理毒性を示している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本プロジェクトでは、PHA蓄積が植物の遺伝子発現にどのような影響をおよぼすのかを解析することを目的とした。この知見が得られれば、分子生物学的手法により、生育阻

害を回避することも可能になると考えられた。

3. 研究の方法

PHAの蓄積による生育阻害がはっきり現れる系としてイネを用い、PHA合成系遺伝子群を導入したイネの培養細胞を作成した。PHAの生産菌として解析が進んでいる水素細菌由来のPHA生合成系遺伝子群を、植物細胞内で発現できるように制御遺伝子と結合した発現用ベクターを構築し、アグロバクテリウム法を用いて、植物細胞に導入、選抜を行い、組換え培養細胞を得た。この細胞系を用いてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子導入により発現量の変化した遺伝子のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

この培養細胞はPHAを蓄積し、それに伴って茶色く褐変化して生育阻害を示したことから、生育阻害のモデル系として使用できることが分かった。このPHA蓄積細胞と、対照サンプルの細胞での遺伝子の発現量の差を、マイクロアレイを用いた分析により解析した。その結果、ポリマーを蓄積したイネ培養細胞で、有意に発現量が上昇した、または減少した遺伝子を十数個特定することができた。この結果から、PHA蓄積による生育阻害の原因の一つになっている遺伝子の候補を特定することができた。類似の研究はこれまでに報告例がなく、植物によるPHA生産手法の開発に新しい手法を加えると期待できる。

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9件)

<全て査読有り>

1. 正瑞文、松本謙一郎、Takahiro SASAKI, 田口精一: "Engineering of polyhydroxyalkanoate synthase by Ser477X/ Gln481X saturation mutagenesis for efficient production of 3-hydroxybutyrate-based copolyesters". Appl. Microbial. Biotechnol. (2009). web release.
2. 松本謙一郎、高瀬和真、山本陽子、土肥義治: "Chimeric enzyme composed of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas caviae* enhances production of PHAs in recombinant *Escherichia coli*" Biomacromolecules, Vol. 10(4), pp. 682-685, (2009).
3. 山田美和、松本謙一郎、中井孝憲、田口精一: "Microbial production of lactate-enriched poly[(R)-lactate-co-(R)-3-hydroxybutyrate] with novel thermal properties" Biomacromolecules, Vol. 10(4), pp. 677-681, (2009).
4. 松本謙一郎、村田隆明、長尾里奈、Christopher NOMURA, 新井聡、高瀬和真、仲下英雄、田口精一、島田浩章: "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, Vol. 10(4), pp. 686-690, (2009).
5. Sung-Jin JO, Chean Ring LEONG, 松本謙一郎、田口精一: "Dual production of poly(3-hydroxybutyrate) with glutamate using *Corynebacterium glutamicum* by regulation of biotin concentration", J. Biosci. Bioeng., Vol. 107(4), pp. 409-411, (2009).
6. 松本謙一郎、正瑞文、佐藤康治、田島健次、棟方正信、田口精一: "Kinetic Analysis of Engineered Polyhydroxyalkanoates Synthases with Broad Substrate Specificity", Polymer Journal, Vol. 41(3), pp. 237-240, (2009).
7. 田口精一、山田美和、松本謙一郎、田島健次、佐藤康治、棟方正信、Katsuhiro OHONO, Katsunori KOHDA, Takashi SHIMAMURA, Hiromi KAMBE, Shusei OBATA: "A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 105 (45), pp. 17323-17327, (2008).
8. Christopher T. NOMURA, 田中朋代、T. E. EGUEN, A. S. APPAH, 松本謙一郎、田口精一、Ortiz CL, 土肥義治: "FabG mediates polyhydroxyalkanoate production from both related and non-related carbon sources in recombinant *Escherichia coli* LS5218", Biotechnol. Prog., Vol. 24(2), pp. 342-351, (2008).
9. Sung-Jin JO, 松本謙一郎, Chean Ring LEONG, 大井俊彦、田口精一: "Improvement of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] production in *Corynebacterium glutamicum* by codon optimization, point mutation and gene dosage of P(3HB) biosynthetic genes", J. Biosci. Bioeng., Vol. 104(6), pp. 457-463, (2007).

[学会発表] (計 28 件)

<招待講演>

1. “バイオプラスチック生産のための微生物工場と植物工場”: 日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム、北海道大学百年記念会館、札幌、2008.12.3
2. “In Vitro Engineering of PHA Synthase for New Biopolyester Synthetic System”: International Symposium on Biological Polyesters 2008, SKYCITY, Auckland, New Zealand, 2008.11.28
3. “ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素の分子改変と植物生産への応用”, 第 57 回高分子討論会、大阪市立大学、大阪、2008.9.25
4. “酵素進化学によるバイオプラスチック生産: 微生物から植物へ”, 日本生物工学会大会、東北学院大学、仙台、2008.8.28
5. “The engineering of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase and application for in plante PHA production”, THE GCOE INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY AND MACROMOLECULAR CHEMISTRY, Hokkaido Univ., Sapporo, 2008.7.7
6. K. Matsumoto, S. Arai, C.T. Nomura, T. Murata, R. Nagao, H. Shimada; “Production of polyhydroxyalkanoate copolymer in plastids of *Arabidopsis thaliana*” ICPMB2007, International Congress on Plant Mitochondrial Biology, Nara Women’s University, June 25-29, 2007, Nara

<一般講演>

7. 中井孝憲、山田美和、松本謙一郎、田口精一: “嫌気条件下における乳酸ベースポリエステルの微生物発酵生産”, 日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡ドーム、福岡、2009.3.26
8. 清水康多郎、浦本周、山田美和、松本謙一郎、田口精一: “乳酸ベースポリエステルの生合成における培養条件の検討”, 日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡ドーム、福岡、2009.3.26
9. 森本健二郎、合田葵、松本謙一郎、島田浩章、田口精一: “PHB 生合成系酵素群の発現効率化の組換え体タバコにおける PHB 生産性への影響”, 日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡ドーム、福岡、2009.3.26
10. 山田美和、松本謙一郎、佐藤康治、棟方正信、幸田勝典、島村隆、神戸浩美、小畑充生、田口精一: “乳酸ベースポリエステルの微生物発酵生産”, 日本農芸化学

会 2009 年度大会、福岡ドーム、福岡、2009.3.26

11. Fumi Shozui, Takahiro Sasaki, Ken'ichiro Matsumoto, and Seiichi Taguchi: “Mutation scrambling in polyhydroxyalkanoate(PHA) synthase of *Pseudomonas* sp. 61-3 alter 3-hydroxybutyrate(3HB) fraction in P(3HB-co-3-hydroxyalkanoate)”, 北海道大学 グローバル COE プログラム「触媒が先導する物質科学イノベーション」平成 20 年度 若手研究成果発表会、北海道大学、札幌、2009.3.2
12. 松本謙一郎、山田美和、中井孝憲、清水康多郎、浦本周、田口精一: “酵素の進化工学を応用した新規バイオポリマー生産系の開発”, 第 43 回高分子学会北海道支部研究発表会、北海道大学、札幌、2009.2.3
13. 山田美和、中井孝憲、清水康多郎、浦本周、松本謙一郎、田口精一: “組換え微生物を用いた乳酸ベースポリマーの発酵生産”, 第 43 回高分子学会北海道支部研究発表会、北海道大学、札幌、2009.2.3
14. 池田明夏里、松本謙一郎、Normi Yahara M.、田口精一、島田浩章、”変異型 PHA 重合酵素を利用した PHA 生産の効率化およびトマト果実特異的な PHA 生産” 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸、2008.12.9
15. 小笠原実紀、吉田美穂、川村温夫、佐々木忠将、松本謙一郎、島田浩章、”組換え体ジャガイモによるバイオプラスチックの生産 ” 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸、2008.12.9
16. 玉置亜弥、川村温夫、小笠原実紀、松本謙一郎、島田浩章 “組換え体イネにおけるポリヒドロキシブタン酸の生産” 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸、2008.12.9
17. 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, SKYCITY, Auckland, New Zealand, 2008.11.28
18. 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, SKYCITY,

- Auckland, New Zealand, 2008.11.28
19. C.R. Leong, S.J. Jo, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: "Metabolic engineering for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Corynebacterium glutamicum*"、International Symposium on Biological Polyesters 2008, SKYCITY, Auckland, New Zealand, 2008.11.28
 20. Fumi Shozui, Kotaro Shimizu, Ken'ichiro Matsumoto, Yoshitake Orikasa and Seiichi Taguchi: "SYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATES WITH VARIOUS MOLECULAR WEIGHT USING IN VITRO ENGINEERED PHA SYNTHASES ISOLATED FROM *PSEUDOMONAS* SP. 61-3"、Japan-Korea-China Mini-symposium on Nanotechnology, Biotechnology and Catalysis, Hokkaido Univ., Sapporo, 2008.11.7
 21. Chean-Ring Leong, Sung-Jin Jo, Ken'ichiro Matsumoto, Toshihiko Ooi, Seiichi Taguchi: "Biosynthesis of biodegradable polyester from renewable carbon sources by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum*", CRC International Symposium on Bio-interface and Biomass Conversion, Hokkaido Univ., Sapporo, 2008.10.29
 22. Chean Ring Leong, Ken'ichiro Matsumoto, Toshihiko Ooi, Tomohisa Kuzuyama, Seiichi Taguchi: Production of poly(3-hydroxybutyrate) through a new biosynthetic pathway utilizing malonyl-CoA as an intermediate、日本生物工学会大会、東北学院大学、仙台、2008.8.28
 23. C.R. Leong, S.J. Jo, K. Kitagawa, Q. Wang, K. Matsumoto, C.T. Nomura, T. Ooi, S. Taguchi: Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy valerate) by *Corynebacterium glutamicum*、平成 20 年度 第一回合同学術講演会、北海道大学、札幌、2008.8.8
 24. Fumi Shozui, Ken'ichiro Matsumoto, Yoshitake Orikasa, and Seiichi Taguchi "Wide-ranging alteration of monomeric composition in biopolyester through enzyme evolution", Taiwan-Japan International Symposium on Organic Chemistry and molecular Science, National Taipei Univ. of Technology, Taipei, Taiwan, 2008.4.18
 25. M. Yamada, K. Matsumoto, F. Shozui, Y. Orikasa, and S. Taguchi: "PHA synthase engineering toward biocatalysts for tailor-made biopolymers" The 10th SNU and Hokkaido University Joint Symposium On Nano Technology, Bio Technology and Catalysis, Seoul National University, Seoul, Korea, 2008.1.25
 26. 池田明夏里、松本謙一郎、Yahara M. Normi、田口精一、島田浩章「変異型 PHA 重合酵素を利用した PHA 生産性向上の試み」第 30 回日本分子生物学会年会 (BMB2007) パシフィコ横浜、横浜 2007.12.13
 27. 新井聡、村田隆明、松本謙一郎、野村クリストファー、高瀬和真、田口精一、島田浩章「形質転換アラビドプシスによる共重合ポリヒドロキシアルカン酸の生産」第 30 回日本分子生物学会年会 (BMB2007) パシフィコ横浜、横浜 2007.12.13
 28. 正瑞文、清水康多郎、佐々木雄大、松本謙一郎、田口精一「*Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素の推定基質ポケット近傍のアミノ酸残基群の配列と PHA 分子量の相関」日本生物工学会大会、広島大学、広島、2007.9.25
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 松本謙一郎、田口精一 バイオサイエンスとインダストリー Vol. 65 No.7 2007 「酵素進化学に基づくバイオポリマー生物生産システムの開発研究」(バイオインダストリー協会)
 2. 島田浩章、松本謙一郎「組換え体植物による生分解性プラスチックの生産」バイオプロセス・ハンドブック：バイオケミカルエンジニアリングの基礎から有用物質生産・環境調和技術まで(分担執筆)(エヌ・ティー・エヌ) 2007 年、pp.504-511
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
松本 謙一郎 (MATSUMOTO KENICHIRO)
北海道大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：80360642
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし