

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5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656521

研究課題名（和文）遺伝子発現制御によるブロック共重合ポリエステル微生物合成への挑戦

研究課題名（英文）Challenge to microbial synthesis of block copolyesters by regulated gene expression

研究代表者

福居 俊昭 (Fukui Toshiaki)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：80271542

研究成果の概要（和文）：

本研究では微生物ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の生合成遺伝子の高度発現制御によって、ブロック性の高いPHA共重合体の微生物合成を目指した。まず発現制御を適用するPHA生合成システムの構築のために大腸菌を宿主としたモノマー供給経路について検討し、次に発現制御を導入した組換え株を作製した。今後、発現制御株によるPHA生合成および蓄積PHAの構造について検討する。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed at microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymers in which two kinds of monomers were highly block-covalently bonded by regulated expression of the biosynthetic genes. Firstly, copolymer biosynthesis pathways suitable for regulatory gene expression were established in *Escherichia coli*. Then, recombinant strains of *E. coli* equipped with a regulatory PHA biosynthesis pathways were constructed, and PHA biosynthesis by the strains and structural analyses of accumulated PHAs are now under progress.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学・生分解性プラスチック・合成生物学

1. 研究開始当初の背景

現代社会の必須素材であるプラスチックは石油を原料として生産され、さらにそのほとんどは難分解性であるために廃棄や環境

流出が大きな問題となっている。現代社会の持続的発展のためにはバイオマスを原料とし、かつ生分解性のプラスチックの開発と実用化が急務である。

微生物が貯蔵物質として合成するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)は生分解性バイオマスプラスチックであり、環境低負荷型高分子材料としての応用が期待されている (Fig. 1)。しかし微生物産生 PHA として代表的なポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]は硬く脆い物性を示すため、その実用化は困難であった。

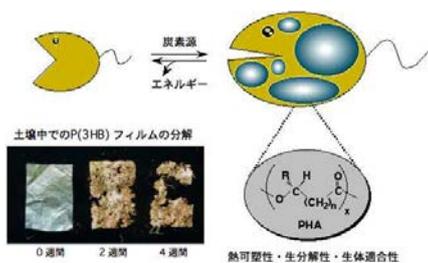


Fig. 1. 微生物による PHA の生合成

一方で、前駆体化合物を含む混合炭素源を与えることで複数のモノマーユニットからなる PHA ランダム共重合体 (Fig. 2) を微生物合成することができる。共重合 PHA ではモノマーユニットの構造や組成に応じて柔軟性などが改善されるが、その生合成に必要な前駆体添加は高生産コストの一因となる。そこで申請者は共重合 PHA 生合成の代謝改変について研究を進め、これまでに 3HB ユニットに加えて側鎖の長いモノマーや側鎖のないモノマーを含む共重合体を、前駆体を添加することなく生合成する微生物を作製してきた。しかし PHA を多様な用途に対応可能な素材とするには、多様な物性を有する PHA 共重合体のラインアップを拡充する必要がある。

高分子科学の分野では、それぞれのモノマーが長い連鎖となったブロック共重合体ではブロック部が独立に凝集したマイクロ相分離構造をとり、ホモポリマーやランダム共重合体とは異なる高次構造や力学的性質を示すことが知られている。そこで、PHA についてもブロック共重合体を微生物合成でき

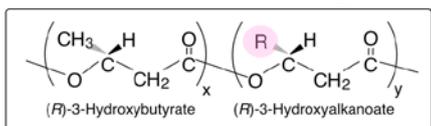


Fig. 2. 適度な柔軟性を示す共重合 PHA の一般構造

れば、既知のランダム共重合体とは異なる構造と物性を示し、新たな用途開発が可能となることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、合成生物学的手法による遺伝子発現回路により PHA 生合成経路を高度に制御することで、従来にない PHA ブロック共重合体を微生物合成することに挑戦する。これは物質生産触媒としての微生物と、生分解性プラスチックとしての PHA の新たな可能性を示しうるものと考えられる。

3. 研究の方法

PHA 生産菌の細胞内で 2 種類のモノマー生合成経路が同時に機能すれば、2 種類のモノマーが同時に供給され、それらを PHA シンターゼ (重合酵素) がランダムに取り込むことでランダム共重合体が生合成される。すなわち、共重合体のブロック性を高めるためには、細胞内でのモノマー供給に偏りが生じるように生合成系を機能させればよい。

近年、新しい生命機能あるいは生命システムをデザインして組み立てる合成生物学が注目されている。その一例として、遺伝子発現の時間的制御を可能とする系が開発されている。そこでこの発現制御系を PHA 生合成に応用することで、ブロック共重合体の生合成を試みることにした。このような PHA 生合成系には、2 種類以上のモノマーを供給するための代謝経路が、化学的には同じ反応が構造・鎖長の異なる基質に起こるのではなく、完全に独立していることが望ましい。そこでまず大腸菌 *Escherichia coli* を宿主としたモノマー供給経路について検討し、次いで発現制御系の適用を試みた。

4. 研究成果

P(3HB)生合成菌 *Ralstonia eutropha* 由来のβ-ケトチオラーゼ PhaA および NADPH-アセトアセチル-CoA レダクターゼ PhaB に

より(R)-3HB-CoAを生成し、PHAシンターゼPhaCにより重合するP(3HB)生合成経路はすでに確立済みである。

第二モノマーとしてまず3-ヒドロキシプロピオニル-CoA(3HP-CoA)に着目した。*Chroloflexus aurantiacus*由来マロニル-CoAレダクターゼMcrおよびプロピオニル-CoA合成酵素中の3HP:CoAリガーゼドメインAcsにより3HP-CoAをマロニル-CoAから生成し、PhaCにより重合させるポリ(3-ヒドロキシプロピオン酸)[P(3HP)]生合成について検討した。アラビノースで誘導可能なBADプロモーター下流にmcrとacsをそれぞれ配置したベクターを構築し、phaC発現ベクターとともに*E. coli*に導入した。この形質転換体をグルコースまたはグリセロール炭素源とした培養を行ったが、P(3HP)の蓄積は見られなかった。Mcrの基質となるマロニル-CoA供給強化のため、*Corynebacterium glutamicum*由来アセチル-CoAカルボキシラーゼの発現ベクターをさらに導入することで微量のP(3HP)の生合成を確認したが、効率的生合成には到らなかった。

そこで、異なる3HP-CoA生合成経路としてグリセロール代謝系を利用した(Fig. 3左側経路)。*Klebsiella pneumoniae*または*Lactobacillus reuteri*由来のジオールデヒドラターゼとその再活性化因子(PduCDEGH)とCoA依存型プロピオンアルデヒドデヒドロ

ゲナーゼ(PduP)、PhaCの各遺伝子をtacプロモーターあるいはT7プロモーター下流に配置した発現ベクターを作製し、*E. coli*を多重形質転換した。得られた形質転換体をグリセロール炭素源で培養したところ、*K. pneumoniae*由来遺伝子を導入した株において4.6wt%のP(3HP)が蓄積された。菌体内ポリマーを抽出精製し、¹H-および¹³C-NMRによりP(3HP)ホモポリマーであることを確認した。さらにPhaABによる(R)-3HB-CoA供給経路と3HP-CoA供給経路を同時に機能させることでP(3HB-co-3HP)共重合体が生合成され(Fig. 3右側経路)、さらに誘導剤濃度でPhaAB発現レベルを変化させることで組成制御が可能となることを示した。今後は3HB-CoA、3HP-CoAの各モノマー供給経路に発現制御系の導入を図る。

一方、同様に*E. coli*を宿主とし、脂肪酸を炭素源として2種類の(R)-3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを供給する経路への発現制御系の導入を新たに設計し、発現ベクターおよび組換え株を作製した。この組換え株をドデカン酸を炭素源として培養することで少量のPHA共重合体が生合成されることを確認した。現在、培養条件検討によるPHA生合成量の向上と蓄積ポリマーの構造について解析を行っている。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①「組換え*Escherichia coli*によるポリ(3-ヒドロキシプロピオン酸)の生合成」渡辺将史、堀川 洋、向山正治、折田和泉、中村 聡、福居俊昭 日本農芸化学会 2013 年度大会 4C12a04 東北大学川内北キャンパス(仙台市青葉区)、2013/03/27

[図書] (計 0 件)

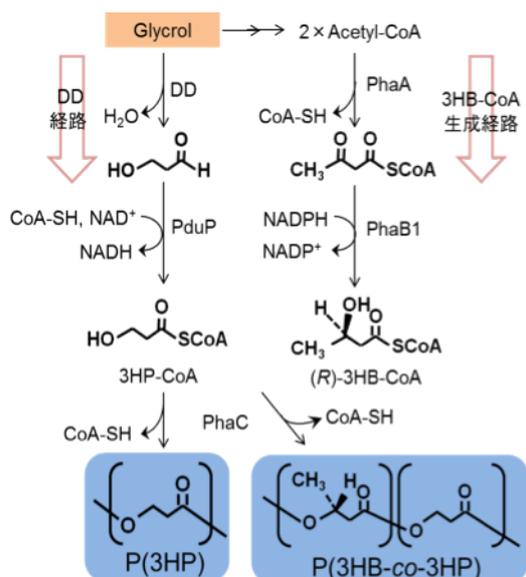


Fig. 3. グリセロールを炭素源としたP(3HP)およびP(3HB-co-3HP)生合成経路

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福居 俊昭 (Fukui Toshiaki)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授

研究者番号：80271542

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし