

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658271

研究課題名(和文) バイオマス資源から芳香族ポリマーを発酵生産する微生物の育種

研究課題名(英文) Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate bearing phenyl and phenylalkyl side groups

研究代表者

柘植 丈治 (Tsuge, Takeharu)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70332260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、糖類などのバイオマス資源から芳香族ポリマーを効率的に生産する微生物の育種に取り組んだ。ここでいう芳香族ポリマーとは、ケイ皮酸誘導体(3-ヒドロキシ-3-フェニルプロパン酸、3H3PhP)を構成ユニットとするポリエステルのことであり、基質特異性の広い重合酵素を利用することで合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：A novel type of 3-hydroxybutyrate (3HB)-based polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer, poly(3HB-co-3-hydroxy-3-phenylpropionate) [P(3HB-co-3H3PhP)], which bears phenyl side group, was synthesized by employing *Ralstonia eutropha* PHB-4 recombinant expressing *Pseudomonas* sp. 61-3 PHA synthase 1. The 3H3PhP fraction was increased up to 8.9 mol% by feeding 3H3PhP precursors. As phenyl side group was introduced into P(3HB), the melting temperature and the enthalpy of fusion were decreased while the glass transition temperature was increased, demonstrating a distinct thermal behavior by the effect of phenyl side group.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオマス バイオプラスチック

1. 研究開始当初の背景

循環型社会の創成に向けて、産業基盤を有限な化石資源から再生可能なバイオマスに転換することが急務となっている。現在、バイオエタノールやバイオガスといったバイオ燃料とともに、ポリ乳酸をはじめとするバイオプラスチックの開発・普及が進みつつある。いずれの分野においても、バイオマスからの物質生産系には、微生物による発酵プロセスが欠かせない手段となっており、その重要性は年々増しつつある。

現在の石油化学工業では、ナフサを原料として、エチレンなどのオレフィン系化合物とベンゼンなどの芳香族系化合物が合成されている。一方で発酵による化学品生産では、従来技術によって生産が可能なアルコールや有機酸、アミノ酸などが中心である。化石資源からバイオマスへの転換においては、それにあわせて産業形態も転換する必要があり、発酵を中心とした技術の成熟が必要不可欠である。特に、技術的に空白となっている芳香族系化合物の発酵合成手法を確立することが必須の課題と考える。

ケイ皮酸は植物界に広く存在する芳香族不飽和カルボン酸であり、アミノ酸の一種であるフェニルアラニンが脱アミノ化されることで生成される。

ケイ皮酸発酵・フェニルアラニン発酵はバイオマスから芳香族化合物を生産する手法として重要な発酵法である。このような化合物を発酵により生産する取り組みは既に多くなされているが、どれも効率的な生産法とは言いがたいのが実情である。効率的な生産法が確立できない主な理由は、最終生産物である芳香族化合物が微生物細胞に対して強い毒性を示すこと、疎水的な芳香環の存在により菌体外への効率的な排出が困難であること、が挙げられる。

2. 研究の目的

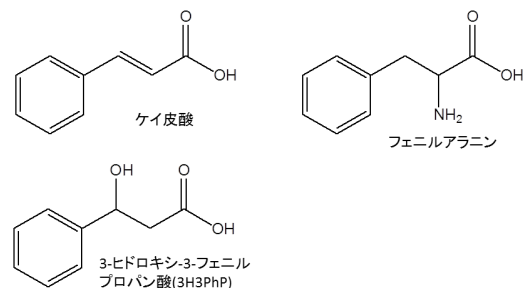
本課題では、糖類などのバイオマス資源から芳香族ポリマーを効率的に生産する微生物の育種を行う。ここでいう芳香族ポリマーとは、ケイ皮酸誘導体(3-ヒドロキシ-3-フェニルプロパン酸、3H3PhP)を構成ユニットとするポリエステルのことであり、代謝系構築から生成物回収までを視野に入れた生産システムの開発を目指して、基礎的研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、大腸菌 (*Escherichia coli*)、*Pseudomonas putida*、*Ralstonia eutropa* を宿主にして、ケイ皮酸ポリマーの合成を検討した。大腸菌の宿主系では、ケイ皮酸を外部添加

して細胞内でポリマー化させる方法と、細胞内でケイ皮酸を自家供給させてポリマー化する方法を試みた。既に、研究室のストックとして、各種の重合酵素遺伝子およびモノマー供給酵素遺伝子を所有しているため、これら遺伝子の組み合わせによりポリマー生産実験を行った。また、ケイ皮酸モノマーを自家供給させる方法では、フェニルアラニン過剰生産株である *E. coli* ATCC31884 株を入手して実験を行った。この株を宿主として、人工合成により作成したフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子 (*pal*) とフェニル酢酸 CoA リガーゼ遺伝子 (*pcl*)、そして、PHA 合成系として *R*-ヒドラターゼ遺伝子 (*phaJ*)、重合酵素遺伝子 (*phaC*) を発現するプラスミドを構築した。この菌株を PHA 非生産条件下で培養して、各酵素活性を測定することで、酵素の発現を確認した。また、PHA 生産条件下で培養して、蓄積された PHA 量およびそのモノマー組成をガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。

P. putida および *R. eutropa* を宿主にした生産系では、ケイ皮酸誘導体を外部添加することで、ポリマー中に取り込まれるかを検証した。得られたポリマーは、示差走査熱量計 (DSC) を用いて熱物性について解析を行った。

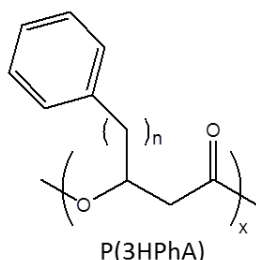


4. 研究成果

まず、組換え大腸菌を宿主にしてケイ皮酸ポリマーの合成・蓄積を試みた。大腸菌は元来 PHA を蓄積しない微生物なので、PHA を合成させるためには、重合酵素およびモノマー供給酵素を導入する必要がある。一方で、これまでに種々の遺伝子発現系を大腸菌宿主系で構築しているため、どのような遺伝子の組み合わせがケイ皮酸ポリマーの合成に適しているのかを、大腸菌を用いれば最も容易に判別可能と考えた。モノマー供給酵素である *R*-ヒドラターゼと重合酵素の組み合わせをいくつか試し、PHA 合成とモノマー組成を調べた。しかしながら、大腸菌を宿主にした場合において PHA の有意な蓄積が観察されなかった。この理由として、ケイ皮酸の細胞毒性により大腸菌の増殖が著しく阻害されたことが考えられた。そこで、大腸菌以外の宿主系において検討することにした。

次に野生型 *P. putida* について調べたが、PHA 中へ 3H3PhP (下図、n=0) の取り込みは観察できなかった。しかし、ケイ皮酸より炭素鎖

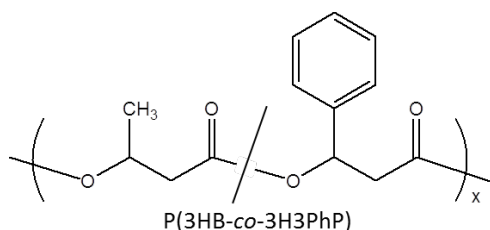
が2つ分長いモノマー前駆体を供給したところ、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3H5PhV, n=2) のホモポリマー合成が可能であることがわかった。



また、それより炭素鎖が1つ短い3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3H4PhB, n=1)についても、共重合体としてポリマー中に取り込ませることが可能であった。モノマーの炭素鎖が長くなると重合が可能になることから、*P. putida* の有する重合酵素は基質特異性が狭く、側鎖の短いケイ皮酸誘導体を取り込まない可能性が考えられた。そこで、基質特異性の広い *Pseudomonas* sp. 61-3 の重合酵素遺伝子を保持した組換え株を作成し、ケイ皮酸誘導体の取り込みについて検討した。しかし、発現系がうまく機能せず、若干量の PHA しか合成できず、かつ、ケイ皮酸誘導体の取り込みを確認することができなかった。

野生型 *P. putida* を用いることで P(3H5PhV) を合成することができたので、大量合成し、熱物性の解析を行った。P(3H5PhV) は融点を持たず、ガラス転移点は 15.7 に観測された。これは一般的な PHA よりも 10 ほどガラス転移温度が高く、側鎖の効果により特異な熱物性を示すことが分かった。さらに、側鎖構造と熱物性の関連を調べるために、*P. putida* を用いて P(3H4PhB-co-3H6PhHx) を合成した。この共重合体ポリマーは、P(3H5PhV) と同様に高いガラス転移温度を示し、芳香環が主鎖に近い位置になるほど、ガラス転移温度が高くなることを確認した。

さらに、*R. eutropha* を生産宿主として、ケイ皮酸ポリマーの合成・蓄積を試みた。*Pseudomonas* sp. 61-3 重合酵素を発現させた組換え *R. eutropha* を作成し、フェニルアラニンおよびその構造類似体を前駆体として培地に加え、3H3PhP がポリエステルの構成モノマーとして取り込まれるかを検討した。その結果、フェニルアラニンから 3H3PhP の取り込みは確認できなかったが、ケイ皮酸などからは 3H3PhP が取り込まれた P(3HB-co-3H3PhP) が合成された。



詳細に構造を調べるために、PHA を精製し、NMR 分析および熱分析に供した。その結果、NMR 解析により 3H3PhP がポリマーに取り込まれている確実な証拠を得、3H3PhP の導入に伴いポリエステルの結晶性が低下していることを確認した。3H3PhP が取り込まれた PHA は、いままで生合成された報告が無く、本研究が初めての成功例となった。一方で、フェニルアラニン過剰合成大腸菌である ATCC31884 株を入手し、この株に「フェニルアラニン ケイ皮酸 ケイ皮酸 CoA 3H3PhP 3H3PhP 含有 PHA」の代謝系を構成する遺伝子を導入した。しかし、現時点では、3H3PhP 含有 PHA の合成は確認できず、ケイ皮酸より下流の代謝系の強化が必要であることがわかった。今後、継続して改善を試みる予定である。

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 1 件)

Shoji Mizuno, Shiori Katsumata, Ayaka Hiroe, Takeharu Tsuge:

Biosynthesis and thermal characterization of polyhydroxyalkanoates bearing phenyl and phenylalkyl side groups, *Polym. Degrad. Stab.*, 2014, 印刷中, 査読有

DOI 10.1016/j.polymdegradstab.2014.05.020

[学会発表](計 4 件)

水野匠詞、柘植丈治:

フェニル基を有する新規微生物ポリエステルの合成、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 28 日、名古屋国際会議場

水野匠詞、柘植丈治:

フェニル基を有する新規微生物ポリエステルの合成と熱物性解析、JACI/GSC シンポジウム、2014 年 5 月 23 日、東京国際フォーラム

水野匠詞、勝又しおり、柘植丈治:

フェニル基導入型微生物ポリエステルの合成と熱的特性の解析、高分子討論会、2013 年 9 月 11 日、金沢大学

勝又しおり、石井直樹、柘植丈治:

赤外分光法による PHA ホモポリマーの C=O 伸縮振動観察、ポリマー材料フォーラム、2012 年 11 月 2 日、北九州国際会議場

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柘植 丈治 (Tsuge, Takeharu)
東京工業大学・大学院総合理工学研究科・
准教授

研究者番号：70332260

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし