

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580103

研究課題名(和文)代謝および転写機構改変によるメタノールを原料にした高物性PHA生産菌の育種

研究課題名(英文)Genetic and global transcription machinery engineering for production of practical polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol

研究代表者

折田 和泉(Orita, Izumi)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：70525964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：次世代資源として有用なメタノールを原料に微生物産生の生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の高物性共重合体を効率的に生合成する菌株を作製することを目的として、代表的なメタノール資化性菌を用い従来の代謝工学的手法と70をコードするrpoD遺伝子をランダム変異させることで包括的に転写機構を改変する革新的な手法を用いた分子育種を行った。代謝工学的手法を用いた育種では、第二モノマー分率が増加した菌株を取得した。包括的転写機構改変では、メタノール資化性菌ではじめて本法を確立し高濃度メタノール存在下でPHA蓄積率が増加した菌株を得た。

研究成果の概要(英文)：Polyhydroxyalkanoates (PHAs), the biodegradable plastics produced by many microorganisms, have attracted interest as the substitute for petroleum-derived plastics. In this study, genetic engineering and global transcription machinery engineering (gTME) approach were employed for the representative methylotrophic bacterium with the aim of constructing microbial strain capable of efficient biosynthesis of practical PHA copolymers from methanol. Recombinant strain which accumulated PHA copolymer with higher second monomer composition was constructed by expression of gene encoding enzyme involved in providing second monomer. A random mutant library of rpoD gene encoding sigma 70 factor was developed for gTME and enabled the screening of strains improved PHA contents on high concentration of methanol.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生分解性プラスチック メタノール メタノール資化性菌

1. 研究開始当初の背景

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は自然界の多くの微生物がエネルギー貯蔵物質として合成し蓄積するバイオポリエステルである。最終的に二酸化炭素と水に変換され自然に還る生分解性を有し、バイオマス資源など石油以外の原料から生産出来ることから環境低負荷型プラスチックとしてその普及が期待されている。

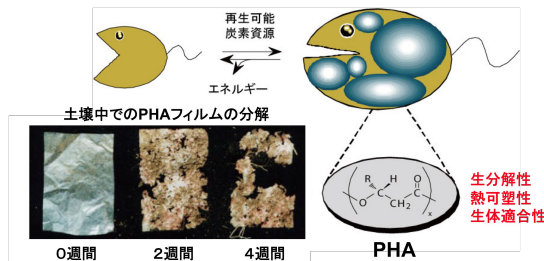


Fig. 1. 微生物による PHA の生合成

一方、本研究で PHA 生産の原料として注目したメタノールは、埋蔵量が石油の約 10 倍とも見積られる天然ガスやバイオマスから生成され、運搬が容易な利便性、優れた燃焼特性を有する上に、価格も天然ガスが続く限り低価格を維持していることから、次世代資源として有用である。メタノールを単一炭素源・エネルギー源として生育出来る微生物を C_1 化合物資化性微生物 (メチロトロフ) という。PHA を生合成するメチロトロフとして、*Paracoccus denitrificans* や *Methylobacterium extorquens* などが知られている。これらのメチロトロフをメタノールを単一炭素源にして培養した際には、最も一般的な PHA であるポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] という炭素数 4 のモノマーからなるホモポリマーのみ合成することが報告されている。しかし、P(3HB) は破壊伸び率が 5% 以下と脆く柔軟性に乏しい材料であるために実用化に適さない。PHA の物性を向上させる方法として、第二モノマー成分を導入する共重合化があげられる。例として、*P. denitrificans* にメタノールと *n*-ペンタノールの混合炭素源を与えることで共重合体のポリ(3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシペンタン酸) [P(3HB-co-3HV)] を生合成した例があるが、*n*-ペンタノール添加による高コスト化と、この共重合体では柔軟性がまだ十分ではないことが問題となっている。そこで、申請者らは、メタノールのみを炭素源として共重合 PHA を生合成するための微生物育種をすすめており、本研究の開始時までに、*M. extorquens* に広基質特異性の PHA 重合酵素 (PhaC) を導入することによってメタノールから C_4 モノマーに C_6 モノマーが共重合したポリ(3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-co-3HHx)] を生合成することに世界ではじめて成功していた。しかし、この 3HHx 分率と PHA 蓄積率が低く、これら

の向上が課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、次世代資源として有用なメタノールを原料として微生物産生の生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸の高物性共重合体を効率生産する微生物の育種することを目的とした。本研究の成果は持続可能なプラスチック社会の構築に貢献するものと期待される。

3. 研究の方法

メタノールを原料にして第二モノマー分率が向上した PHA を効率よく蓄積する菌株の取得を目的として、代表的なメチロトロフである *M. extorquens* を用いた分子育種を以下のように行った。まず、第二モノマー前駆体の供給経路に着目し、プラスミドベクターによる遺伝子発現や相同組換えによる遺伝子破壊といった代謝工学的手法を用いて代謝改変を行った。さらに、転写制御因子である $\sigma 70$ にランダム変異を加える「包括的転写機構の改変」(Fig. 2)によって、メタノール生育能や PHA 蓄積率、第二モノマー分率が劇的に変化した株の取得を目指した。包括的な転写機構の改変では、原核生物における多数の遺伝子の転写開始因子である $\sigma 70$ をコードする *rpoD* 遺伝子にエラープロン PCR によってランダム変異を導入し、広宿主域ベクターによってメチロトロフに導入することで *rpoD* 変異ライブラリーを作製した。メタノール資化能や PHA 生産能が向上した菌株を、コロニーの生育能やポリエステル・脂質貯蔵細胞を検出可能な色素 (Nile Red) を利用したコロニー染色を指標にして一次スクリーニングを行った。さらに、培養した菌体をガスクロマトグラフィーに供し、PHA 蓄積量やモノマー組成を測定することで特に優れた株を単離した。

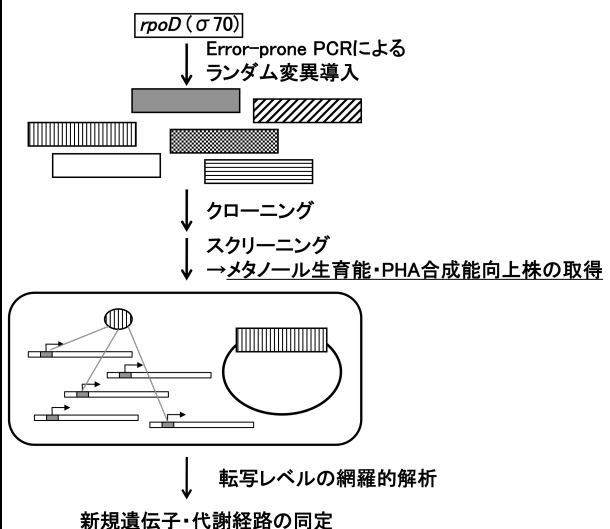


Fig. 2. 本研究で実施した包括的転写機構改変の概要

4. 研究成果

代謝工学的手法を用いた育種では、*M. extorquens* が有するエチルマロニル-CoA 経路上にブチリル-CoA (C6 モノマー前駆体) やプロピオニル-CoA (C5 モノマー前駆体) といった第二モノマーの前駆体が存在することに着目し、第二モノマー前駆体供給酵素遺伝子の高発現と前駆体が PHA 合成以外に使われる経路の遮断を行った (Fig. 3)。前者では *M. extorquens* がコードするβ-ケトチオラーゼ (PhaA) と NADPH 依存性 アセトアセチル-CoA レダクターゼ (PhaB) の遺伝子をメタノールデヒドロゲナーゼプロモーターの支配下で発現した。その結果、生育速度が低下したものの、炭素数 5 の第二モノマー (3HV) 分率が増加した。

後者ではプロピオニル-CoA カルボキシラーゼ (Pcc) 遺伝子の破壊を行った。その結果、破壊株はメタノール生育能を失った。これはモノマー前駆体がメタノール生育に必要な代謝経路上の化合物であることに起因する可能性が考えられた。そこで、経路遮断株をコハク酸培養した後にメタノール培養する二段培養を行った結果、3HV 分率がメタノール培養時に著しく増加した。

また、育種の過程で、本菌はコバルトイオン欠乏条件において、メタノールを単一炭素源として P(3HB-co-3HV) 共重合体を蓄積すること。さらに、コバルトイオンの濃度低下に従って、生育速度が低下し、第二モノマーとして 3HV 分率が増加することを明らかにした。

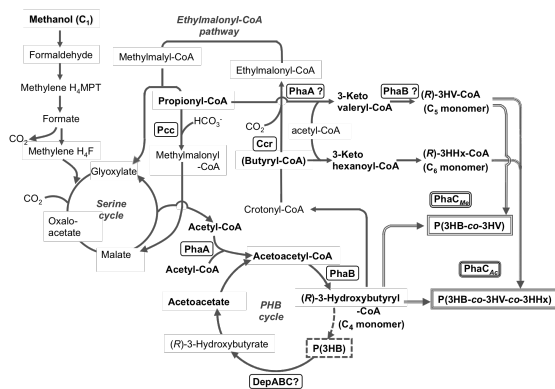


Fig. 3. *M. extorquens* AM1 の主要なメタノール代謝経路

PhaC: PHA シンターゼ、PhaA: β-ケトチオラーゼ、PhaB: NADPH 依存性 アセトアセチル-CoA レダクターゼ、Ccr: クロトニル-CoA カルボキシラーゼ/レダクターゼ、Pcc: プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ、Dep: PHA デポリメラーゼ

包括的転写機構改変では、ランダム変異やスクリーニングの方法を検討し、メチロトロフではじめて本法を確立した。エラープロオン PCR とエラープロオン PCR の増幅断片

をメガプライマーとする MEGA primer WHOLE Plasmid (MEGA-WHOP)法により *rpoD* 変異ライブラリーを取得した。*M. extorquens* を形質転換し表現型に基づくスクリーニングにより PHA 蓄積率やメタノール生育能が向上した菌株を取得した。さらに、取得したプラスミドを鋳型にしてランダム変異を施し、高濃度メタノール存在下で PHA 蓄積率が増加した菌株を得た。現在、トランスクリプトーム解析のための条件検討を行っている。

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 1 件)

(1) Izumi Orita, Kouta Nishikawa, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions.
Appl. Microbiol. Biotechnol., **98**, 3715-3725 (2014)査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 鈴木 裕貴、折田 和泉、福居 俊昭、中村 聡
Methylobacterium extorquens の包括的転写機構改変によるポリヒドロキシアルカン酸生産能の向上
日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日, 明治大学 (神奈川県・川崎市)

(2) Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
Biosynthesis of PHA copolymers from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions
The 4th International Conference on Biobased polymers, September 26, 2013, Hanyang Institute of Technology, Seoul, Korea

(3) 折田 和泉、中村 聡、福居 俊昭
Methylobacterium extorquens AM1 のメタノール生育とポリヒドロキシアルカン酸 合成における金属イオン濃度の影響
第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 20 日, 広島国際会議場 (広島県・広島市)

(4) 折田 和泉、中村 聡、福居 俊昭
Methylobacterium extorquens の代謝改変によるメタノールを原料にした共重合 PHA の生産
日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 27 日, 東北大学 (宮城県・仙台市)

〔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：
出願年月日：
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

折田 和泉 (Orita Izumi)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
助教
研究者番号：70525964

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし