

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：27401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550096

研究課題名(和文) 二酸化炭素を原料とした共重合ポリエステル¹の生合成に関する研究

研究課題名(英文) Study on biosynthesis of copolyesters from carbon dioxide

研究代表者

松崎 弘美 (MATSUSAKI, Hiromi)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：30326491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：組換え*Ralstonia eutropha*による二酸化炭素からの生分解性共重合PHAの合成を最終目的とし、低基質特異性PHA重合酵素(PhaC1)、3-ヒドロキシアシル(3HA)-ACP:CoAトランスフェラーゼ(PhaG)、3HA-CoAリガーゼ(PA3924)、3-ヒドロキシブタン酸(3HB)ユニット供給系酵素(PhbAB)の全遺伝子を大腸菌および*R. eutropha*に導入した組換え株を作製し、脂肪酸合成経路を介した共重合PHAの合成を試みた。組換え大腸菌はグルコースから中鎖長3HAユニット(炭素数8～14)を含むP(3HB-co-5.4 mol% 3HA)共重合ポリエステルを合成した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the biosynthesis of biodegradable copolyesters by *Ralstonia eutropha* from carbon dioxide. PHA synthase (PhaC1) and 3-hydroxyacyl-ACP:CoA transferase (thioesterase) (PhaG) genes from *Pseudomonas* sp. 61-3, (R)-3-hydroxyacyl-CoA ligase gene (PA3924) from *Pseudomonas aeruginosa*, and beta-ketotiolase (PhbA) and acetoacetyl-CoA reductase (PhbB) genes from *R. eutropha* were introduced into *Escherichia coli* and PHA-negative *R. eutropha* strains. The copolymer containing 94.6 mol% 3-hydroxybutyrate (3HB) and 5.4 mol% medium-chain-length-3-hydroxyalkanoates (3HA) consisting of C8, C10, C12 and C14 was synthesized by the recombinant strains of *E. coli* from glucose as the sole carbon source.

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 二酸化炭素 ポリヒドロキシアリカン酸 環境技術 環境材料

1. 研究開始当初の背景

プラスチックで代表される化石燃料由来の合成高分子材料は優れた性能と機能を持つが、その廃棄物の多くは自然環境で分解されないために、環境中に半永久的に蓄積して、様々な環境問題を引き起こしている。そこで、ある種の微生物が合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) が注目されている。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り、微生物が合成するので再生可能資源のバイオマスを利用できる。すなわち、化石資源の消費量を抑え、温室効果ガスの二酸化炭素の排出量を抑制することができる。そのため、PHA は石油由来の生分解性プラスチック (ポリプロラクトンやポリエチレンサクシネートなど) と比べてもより地球に優しい環境調和型のプラスチックといえる。さらに、独立栄養細菌を PHA 合成における宿主とし、石油由来の汎用性プラスチックと同等な物性の優れた実用的な PHA を二酸化炭素から合成することができれば、環境低負荷のみならず環境保全にも大いに役立つと考えられる。その生産システムの確立はプラスチック製造における技術革新を起こす可能性もある。

水素細菌 *Ralstonia eutropha* は PHA 合成細菌としてよく知られており、従属培養においては、フルクトースや炭素数が偶数の脂肪酸を炭素源として炭素数4の3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) をモノマー単位とするポリ(3-ヒドロキシブタン酸)、P(3HB)を合成する。これは、耐衝撃性の弱いポリエステルであり、硬くて脆い材料であるが、鎖長の長い3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) を第2モノマー成分とした P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルは P(3HB) と比較して耐衝撃性が向上する。しかしながら、野生株では炭素数6以上の3HAユニットをポリエステル鎖中に取り込めない。これはPHA重合酵素の基質特異性に起因する。そこで、申請者らはこれまでに、*Pseudomonas* sp. 61-3のPHA合成遺伝子を同定し、本菌の低基質特異性PHA重合酵素(PhaC1)の遺伝子を導入した異種および同種の組換え菌を作製することにより、低密度ポリエチレンと同等な優れた物性を示すP(3HB-co-3HA)共重合ポリエステル(3HBと炭素数6~12の3HAからなるランダム共重合体)の合成に成功している(Matsusaki *et al.*, 2000)。

一方、*R. eutropha*を宿主とした場合、*phaC1*遺伝子を導入した組換え株は、脂肪酸からはP(3HB-co-3HA)を合成するが、フルクトースや二酸化炭素からはP(3HB)が合成されるだけである。これは、*R. eutropha*が脂肪酸合成経路から第2成分モノマーの(R)-3HA-CoA(炭素数6以上)を供給する系を有していないからである。そのため、(R)-3HA-CoAを供給する代謝経路を構築してやれば、安価な糖や二酸化炭素を唯一の炭素源として、丈夫でしなやかな実用性に優れたP(3HB-co-3HA)を

生合成することができると考えた。

2. 研究の目的

R. eutropha は、糖や脂肪酸のみならず二酸化炭素を炭素源として増殖し、生分解性プラスチックのポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を合成する。しかしながら、この細菌が合成する PHA は耐衝撃性が弱いポリ(3-ヒドロキシブタン酸)、P(3HB)、である。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性の PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*) および PHA 重合酵素の基質となる炭素数 6 以上の (R)-3-ヒドロキシアルキル CoA ((R)-3HA-CoA) を脂肪酸合成経路から供給する (R)-3HA-ACP:CoA トランスフェラーゼ (チオエステラーゼ) 遺伝子 (*phaG*)、*Pseudomonas* 属細菌由来の (R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子、さらには、*R. eutropha* 由来の β -ケトチオラーゼ遺伝子 (*phbA*) およびアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子 (*phbB*) を大腸菌あるいは *R. eutropha* の PHA 合成能欠損変異株に導入した組換え株を作製し、糖や二酸化炭素から耐衝撃性に優れた P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルを代謝制御工学的に生合成させることを目的とした (図 1)。

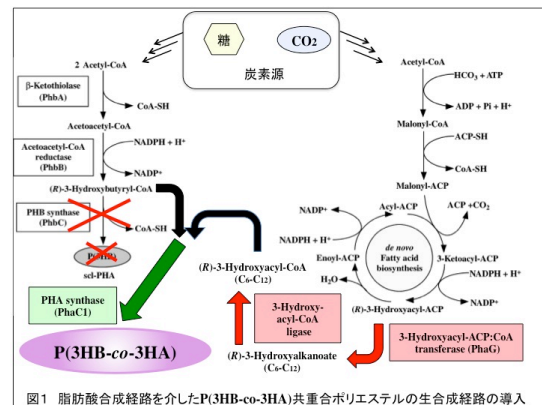


図1 脂肪酸合成経路を介したP(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの生合成経路の導入

3. 研究の方法

耐衝撃性に優れた実用的な共重合 PHA を二酸化炭素から生合成することが本研究の目的である。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性の PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*) および PHA 重合酵素の基質となる炭素数 6 以上の (R)-3HA-CoA を脂肪酸合成経路から供給する (R)-3HA-ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*phaG*)、*R. eutropha* 由来の β -ケトチオラーゼ遺伝子 (*phbA*) およびアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子 (*phbB*) を大腸菌あるいは *R. eutropha* の PHA 合成能欠損株に導入した組換え株を作製したが、目的とする P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルを合成することはできなかった。これは、PhaG 酵素がトランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性の方が高いため、(R)-3HA-ACP を (R)-3HA-CoA に変換するよりもむしろ 3-ヒドロキシアルカン酸を生成するためであると考えられた (Wang *et al.* Appl.

Environ. Microbiol., 2012)。そこで、(R)-3HA-CoA リガーゼに着目し、以下の研究を実施した。

(1) (R)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子のクローニング

最近、*Pseudomonas putida* KT2440 から 3-ヒドロキシアシル CoA (3HA-CoA) リガーゼ活性のある遺伝子 (PP0763) がクローニングされ、その遺伝子と PHA 重合酵素遺伝子を共発現させた大腸菌において、グルコースから中鎖長 3HA ユニット (炭素数 6~12) からなる共重合 PHA が合成されている (Wang *et al.* Appl. Environ. Microbiol., 2012)。すなわち、PHA 合成には、低基質特異性の PHA 重合酵素とその基質となるモノマー供給系酵素が必要であるが、脂肪酸合成経路を介するモノマー供給系酵素としては PhaG 酵素のみでは (R)-3HA-CoA を供給できず、(R)-3HA-CoA リガーゼも同時に必要である。そこで本研究では、*P. putida* KT2440 の PP0763 遺伝子と相同性が高い遺伝子を *Pseudomonas aeruginosa* PAO のゲノム DNA 情報から見出した PA3924 遺伝子をクローニングした。

(2) 遺伝子組換え菌による脂肪酸合成経路を介した共重合 PHA の生合成

phaC1, *phaG*, *phbA*, *phbB* の遺伝子に加え、*P. aeruginosa* PAO 由来の PA3924 遺伝子 (推定 (R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子) を大腸菌および *R. eutropha* の PHA 合成能欠損株に導入した組換え株を作製した。それら組換え株について、大腸菌は糖を唯一の炭素源として、*R. eutropha* は糖および二酸化炭素を唯一の炭素源として培養し、PHA の生合成を行った。

(3) 合成された PHA の性質

遺伝子組換え菌によって合成された PHA について、NMR および GC/MS により正確なモノマー組成を算出した。また、ゲル浸透クロマトグラフィーにより分子量を測定した。さらに、PHA のソルベントキャストフィルムを作製し、熱的および機械的性質を調べた。

4. 研究成果

(1) *P. aeruginosa* PAO の推定 (R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子のクローニング

P. putida KT2440 の PP0763 の翻訳産物が (R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有するとの報告があり (Wang *et al.* Appl. Environ. Microbiol., 2012)、ゲノム情報がすべて明らかとなっている *P. aeruginosa* PAO のゲノムを調べたところ、推定中鎖長アシル CoA リガーゼ (PA3924 の推定翻訳産物) が PP0763 とアミノ酸レベルで 82% の相同性を示した。そこで、PA3924 遺伝子を PCR クローニングして、その翻訳産物の *in vivo* における (R)-3HA-CoA リガーゼ活性を調べた。大腸菌 LS5218 株 (*fadR atoC*(Con)) を宿主に用いて、*phaC1* および *phaG* 遺伝子を導入した場合、PHA

は合成されなかったが、さらに PP0763 遺伝子を導入すると、炭素数 10 の 3HA ユニットが取り込まれた PHA が約 1 wt% 合成された。PP0763 遺伝子の代わりに本研究でクローニングした PA3924 遺伝子を導入すると、炭素数 8 および 10 の 3HA ユニットが取り込まれた PHA が合成された。このことから、PA3924 遺伝子の翻訳産物は (R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有することが明らかとなった。

(2) 遺伝子組換え菌による脂肪酸合成経路を介した共重合 PHA の生合成

① 大腸菌を宿主とした場合

phaC1, *phaG*, *phbA*, *phbB*、さらには PA3924 の全遺伝子を大腸菌 LS5218 株に導入した組換え株を作製した。その組換え株をグルコースを唯一の炭素源として培養した結果、炭素数 8 と 10 の 3HA ユニットが 6.2-7.0 mol% 導入された P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルが 5.3-7.2 wt% 合成された (表 1)。PA3924 遺伝子導入株を 25°C で培養した場合、炭素数 8 と 10 の 3HA ユニットが 5.1-7.1 mol% 導入された P(3HB-co-3HA) が 20 wt% 合成され、PP0763 遺伝子導入株と比べて 3HA 分率も PHA 蓄積率も高く、PHA 生産量は約 7 倍であった。

表 1 大腸菌 LS5218 の組換え株による PHA 合成

plasmids (Relevant markers)	Cultivation time (h)	Cultivation temperature (°C)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA concentration (g/L)	PHA composition (mol%)			
						3HB (C8)	3HBx (C9)	3HO (C8)	3HD (C10)
pSck-C1GAB (<i>phaC1</i> , <i>phaG</i> , <i>phbA</i> , <i>phbB</i>)	24	25	3.5	4.2	0.15	100	0	0	0
	48	25	4.3	7.6	0.33	100	0	0	0
	72	25	3.9	4.6	0.18	100	0	0	0
	24	30	3.2	0	0	0	0	0	0
pSck-C1GAB and pRTcAs-MCL(Pa) (<i>phaC1</i> , <i>phaG</i> , <i>phbA</i> , <i>phbB</i> , PP0763)	48	30	3.3	0	0	0	0	0	0
	24	25	4.1	3.5	0.14	100	0	0	0
	48	25	4.0	4.2	0.17	97.7	0	0	2.3
	72	25	3.8	3.8	0.14	97.4	0	0	2.6
pSck-C1GAB and pRTcAs-MCL(Pa) (<i>phaC1</i> , <i>phaG</i> , <i>phbA</i> , <i>phbB</i> , PA3924)	24	30	3.7	0.6	0.02	100	0	0	0
	48	30	3.1	0.5	0.02	100	0	0	0
	24	25	5.3	19.7	1.04	94.1	0	1.2	4.7
	48	25	5.4	19.4	1.05	94.9	0	0.2	4.9
	72	25	5.4	20.3	1.10	92.6	0	2.3	5.1
	24	30	3.4	7.2	0.24	93.0	0	1.5	5.5
	48	30	3.2	5.3	0.17	94.8	0	Trace	6.2
	24	37	2.2	0	0	0	0	0	0

Cells were cultivated at 25°C, 30°C or 37°C for 24 h, 48 h or 72 h in LB medium. 2% glucose was added to the medium after 8 h of cultivation. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HBx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate.

次に、培養 24 時間後の PA3924 遺伝子導入株 (*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcAs-MCL(Pa)) が合成した P(3HB-co-3HA) の詳細な性質を調べた。¹H-NMR 解析によってモノマー組成を調べた結果、3HB 分率が 96.4 mol%、炭素数 8 および 10 の中鎖長 3HA 分率が 5.4 mol% であった。さらに、トリメチルシリル化 (TMS 化) したサンプルを GC/MS で分析した結果、この共重合ポリエステルには、わずかではあるが炭素数 12 および 14 の 3HA ユニットもポリエステル鎖に取り込まれていることが明らかになった。また、¹³C-NMR 解析の結果、本研究で合成された P(3HB-co-3HA) は、短鎖長 PHA と中鎖長 PHA のブレンドではなく、3HB と中鎖長の 3HA からなる共重合ポリエステルであることが明らかとなった。

ゲル浸透クロマトグラフィーにより、分子量を分析した結果、本研究で合成された P(3HB-co-5.4% 3HA) 共重合ポリエステルの数平均分子量 (M_n) は 233×10^3 、重量平均分子量 (M_w) は 459×10^3 、多分散度 (M_w/M_n) は 2.0 であり、Tappel らが報告した大腸菌によって合成された P(3HB-co-5% 3HA)、P(3HB-co-7% 3HA) および P(3HB-co-8% 3HA)

の M_n (106×10^3 , 96×10^3 および 94×10^3) より 2.2-2.5 倍高かった (表 2)。これまでに大腸菌組換え株で、グルコースからこのように分子量の比較的高い P(3HB-co-3HA) の合成は報告されていない。

P(3HB-co-5.4% 3HA) 共重合ポリエステル融点 (T_m) およびガラス転移点 (T_g) はそれぞれ 161°C および 4.6°C であり、融解エンタルピー (ΔH_m) は 34.5 J/g であった (表 2)。

表 2 Molecular weights and thermal properties of solution-cast films of P(3HB-co-3HA).

sample	PHA composition (mol%)		Molecular weight		Thermal properties		
	3HB (C ₂)	3HA (C ₃ -C ₅)	M_n (x10 ³)	M_w/M_n	T_g (°C)	T_m (°C)	H_m (J/g)
P(3HB-co-5.4% 3HA) ^a	94.6	5.4	233	2.0	161	4.6	34.5
P(3HB-co-6% 3HA) ^a	94	6	605	2.3	133, 146	-8	39
P(3HB-co-5% 3HA) ^a	95	5	106	2.0±0.3	163.7±0.3	-3.0±0.1	37.1±0.9
P(3HB-co-7% 3HA) ^a	93	7	96	1.7±0.2	163.8±0.1	-3.3±0.3	36.1±0.5
P(3HB-co-8% 3HA) ^a	92	8	94	1.8±0.2	163.9±0.1	-2.9±0.2	31.7±0.4
P(3HB) ^b	100	0	650	1.8	178	4	91

PHA compositions were determined by ¹H-NMR. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HA, medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate units (C₃-C₅). M_n , number-average molecular weight; M_w , weight-average molecular weight; T_g , melting temperature; T_m , glass-transition temperature; H_m , enthalpy of fusion.

^a P(3HB-co-3HA) copolymer synthesized by *E. coli* LS5218 harboring pScK-CIGAB and pKTeASe-MCL(Pa) in this study.

^b Matsusaki et al. *Biomacromolecules*, 2000

^c Tappel et al. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2014

^d Abe et al. *Biomacromolecules*, 1994

このポリエステルの溶剤キャストフィルムを作製し、機械的特性を調べた結果、3週間エイジングしたフィルムにおける引張強度、ヤング率および破断伸びは、それぞれ 62 MPa , 0.23 GPa および 195% であった。この破断伸び (195%) は、P(3HB) の破断伸び (5%) や、現在、PHA として汎用されている P(3HB-co-20% 3HV) (3HV は 3-ヒドロキシ吉草酸) の破断伸び (50%) よりも高く、より丈夫な実用性があるポリエステルを合成することができたといえる。

② *R. eutropha* を宿主とした場合

大腸菌を宿主とした系においてグルコースを唯一の炭素源として中鎖長 3HA ユニットを含む P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルが合成することに成功したので、同様に *R. eutropha* の PHA 合成能欠損株を宿主とした組換え株をいくつか作製した。それらの組換え株をフルクトースあるいは二酸化炭素を唯一の炭素源として培養した。*R. eutropha* PHB⁺4 の組換え株は約 35 wt\% の PHA を合成したが、3HA 分率の取り込みはみられず、P(3HB) ホモポリマーであった。また、*R. eutropha* C-TnGmHX8 (PHA 重合酵素遺伝子破壊株) の組換え株は、炭素数 10 の 3HA ユニットを含む P(3HB-co-3HA) を二酸化炭素から合成したが (PHA 蓄積率は約 36 wt\%)、3HA 分率は 2.8 mol\% 以下とわずかであった。3HA 分率の向上をめざし、さらなる分子育種を現在行っている。

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 Ayaka Hokamura, Izumi Wakida, Yuki Miyahara, Takeharu Tsuge, Hideki Shiratsuchi, Kenji Tanaka and HiroMatsusaki (2015) *Biosynthesis* of

poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant *Escherichia coli* from glucose. *J. Biosci. Bioeng.*, in press (査読有り) (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.01.022)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 外村彩夏、西村綾乃、後藤早希、脇田和、田口精一、松本謙一郎、柘植丈治、田中賢二、松崎弘美 「組換え大腸菌による糖からの生分解性共重合ポリエステルの生合成」日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)
- ② 脇田和、外村彩夏、西村綾乃、柘植丈治、福居俊昭、田中賢二、松崎弘美 「脂肪酸合成経路を介した糖および炭酸ガスからの共重合ポリエステルの生合成に関する研究」、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)
- ③ 脇田和、外村彩夏、西村綾乃、田中賢二、福居俊昭、柘植丈治、松崎弘美 「糖および炭酸ガスからの共重合ポリエステル生合成に関する研究」、第 21 回日本生物工学会九州支部熊本大会 (2014)、2014 年 12 月 6 日、熊本大学工学部 (熊本県熊本市)
- ④ 西村綾乃、外村彩夏、後藤早希、脇田和、柘植丈治、松崎弘美 「組換え大腸菌による生分解性共重合ポリエステルの生合成」、第 21 回日本生物工学会九州支部熊本大会 (2014)、2014 年 12 月 6 日、熊本大学工学部 (熊本県熊本市)
- ⑤ 脇田和、外村彩夏、岩崎美佳、田中賢二、福居俊昭、柘植丈治、松崎弘美 「*Ralstonia eutropha* を宿主とした糖および炭酸ガスからのポリヒドロキシアルカン酸生合成」、日本生物工学会 2014 年度大会、2014 年 9 月 9 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑥ 外村彩夏、脇田和、柘植丈治、松崎弘美 「組換え大腸菌による脂肪酸合成経路を介した生分解性共重合ポリエステルの生合成」、日本生物工学会 2014 年度大会、2014 年 9 月 9 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑦ 藏富友博、平尾峻、松崎弘美、外村彩夏、田中賢二 「 CO_2 からの共重合 PHA を合成する水素酸化細菌組換え株の育種」、日本生物工学会 2014 年度大会、2014 年 9 月 9 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑧ 外村彩夏、岩崎美佳、村田和歌子、明智聡、福居俊昭、柘植丈治、田中賢二、松崎弘美 「脂肪酸合成経路を介した糖からの共重合ポリエステルの生合成」、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日 (明治大学生田キャンパス、神奈川県川崎市)
- ⑨ 外村彩夏、岩崎美佳、村田和歌子、柘植丈治、脇田和、松崎弘美 「組換え大腸菌に

よる糖からの共重合ポリエステルの生合成」、日本生物工学会九州支部佐賀大会(2013)(第20回)、12月7日(佐賀大学農学部、佐賀県佐賀市)

⑩岩崎美佳、外村彩夏、村田和歌子、田中賢二、柘植丈治、松崎弘美 「組換え *Ralstonia eutropha*における脂肪酸合成経路を介したポリヒドロキシアルカン酸の生合成」、日本生物工学会2013年度、9月20日(広島国際会議場、広島県広島市)

⑪外村彩夏、岩崎美佳、村田和歌子、脇田和、松崎弘美 「大腸菌を宿主とした生分解性共重合ポリエステルの生合成」、日本生物工学会2013年度、9月20日(広島国際会議場、広島県広島市)

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・教授
研究者番号：30326491

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田中 賢二 (TANAKA KENJI)
近畿大学・産業理工学部・教授
研究者番号：20236582