

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630373

研究課題名(和文) 顆粒結合タンパク質を利用した微生物の共重合ポリエステル生合成能の向上と制御

研究課題名(英文) Improvement and compositional regulation of copolyester biosynthesis by applying functions of granule-associated protein

研究代表者

福居 俊昭 (Fukui, Toshiaki)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：80271542

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)：バイオプラスチックであるP(3HB-co-3HHx)の効率的微生物合成に向けた新規な改変戦略として、PHA顆粒結合タンパク質PhaPの機能に着目した。組換えRalstonia eutrophaにおける本来の主要PhaPを、広基質特異性の外来PHA合成酵素と同じ微生物に由来する外来PhaPに置換したところ、大豆油炭素源から生合成されたP(3HB-co-3HHx)の3HHx分率と分子量の増加が見られた。PHA顆粒表面に存在するPhaPの置換によって顆粒上のPHAシンターゼの触媒特性を変化させ、代謝経路やPHA蓄積機構を変えずにPHA共重合体の組成や分子量を制御できることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study focused on a novel engineering strategy based on functions of PHA granule-associated protein PhaP for efficient biosynthesis of P(3HB-co-3HHx), a practical bioplastic. We previously developed a recombinant Ralstonia eutropha for P(3HB-co-3HHx) biosynthesis from vegetable oils by introduction of a mutant of PHA synthase derived from Aeromonas caviae. Here, a gene of major PhaP in R. eutropha was further replaced by phaP derived from A. caviae, the same source as the exogenous PHA synthase. When grown on soybean oil, the resulting strain produced P(3HB-co-3HHx) with higher 3HHx composition and higher molecular weight than the parent strain. The results indicated that the PhaP replacement would induce some change of catalytic properties of PHA synthase co-existed on the surface of PHA granule, that allowed to regulate PHA composition and molecular weight without any modifications in metabolic pathway and PHA accumulation machinery.

研究分野：微生物工学

キーワード：生分解性プラスチック バイオマスプラスチック ポリヒドロキシアルカン酸 酵素重合 組成制御 Ralstonia eutropha 顆粒結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

現代社会において石油から大量生産されているプラスチックは安価で丈夫な材料であるが、難分解性であるために廃棄された際の環境への流出や埋め立て地の不足が問題となっている。さらに脱石油化の観点からも、糖や植物油などの再生可能バイオマスを原料とし、廃棄後は環境微生物中により分解される生分解性バイオマスプラスチックが環境調和型高分子材料として期待されている。

微生物が菌体内に蓄積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の一種である。しかし代表的なPHAであるポリ(3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]は硬く脆い高結晶性高分子であるために材料としての実用化は困難であった。

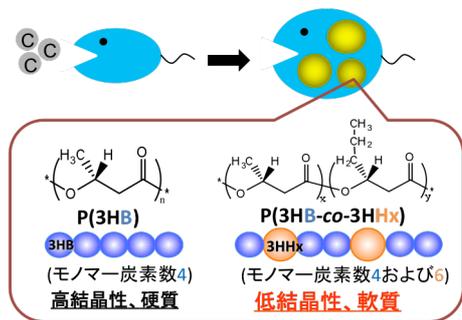


Fig. 1. P(3HB)およびP(3HB-co-3HHx)の構造と特徴

我々は柔軟性に優れた共重合PHAであるポリ(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)](Fig. 1)の微生物合成について研究を進めてきた。これまでにP(3HB)生産菌*Ralstonia eutropha* H16株の改変により、適度な柔軟性を示すP(3HB-co-9~10mol% 3HHx)を植物油から高効率生産する組換え株を作製した^{1,2)}(Fig. 2)。しかしながら、3HHx分率の向上と制御、分子量の制御、生産性の向上など、次世代型バイオポリマー生産菌の確立に向けて取り組むべき課題は多い。

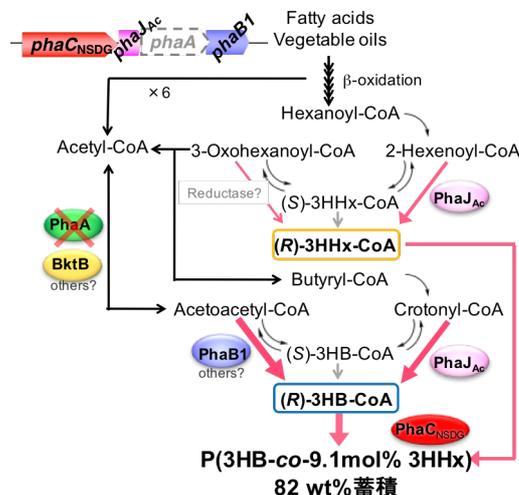


Fig. 2. 組換え*R. eutropha*による大豆油からのP(3HB-co-3HHx)合成

細胞内で生合成されたPHAは菌体内で不溶性の顆粒として存在し、その表面はphasinとも呼ばれる顆粒結合タンパク質PhaP、重合酵素であるPHAシンターゼPhaC、分解酵素であるPHAデポリメラーゼPhaZなどが結合している。PhaPは両親媒性タンパク質であり、疎水性の高い顆粒表面に結合することでPHA顆粒を細胞質に維持しやすくしていると推測されている(Fig. 3(a))。*R. eutropha* H16株は複数のphasinを有するが、PhaP_{Re}は本菌における主要phasinであり、その遺伝子はphaP1プロモーターによりPHA蓄積期に非常に強く転写される。またPhaP_{Re}を過剰発現させると細胞内のPHA顆粒が小さくなることから(Fig. 3(b))、PHA顆粒の体積に対する表面積の割合を調整する機能が提唱されている³⁾。これら一連の研究において、PhaPは顆粒表面上でPHAシンターゼになんらかの作用をおよぼしているのではないかとこの考察もなされていた⁴⁾。近年、PhaCとPhaPの相互作用について解析され、PhaPとPhaCが*in vivo*で短鎖PHBと共に複合体を形成するという報告⁵⁾や、*in vitro*でPhaPがPhaCを活性化するという報告がある⁶⁾。

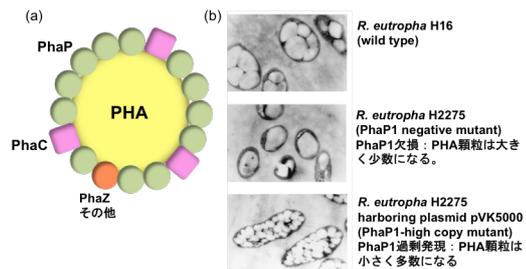


Fig. 3. (a) PHA生産菌におけるPHA顆粒構造の模式図 (b) 顆粒結合タンパク質PhaPの発現量によるPHA顆粒の形態変化

2. 研究の目的

従来、有用物質生産微生物の代謝工学には生合成経路における律速酵素の高発現や副産物生成経路の遮断、エネルギー代謝の改変などの戦略が取られており、PHA生産菌においてもその例外ではなかった。本研究ではこのような従来の代謝改変に加えて、菌体内PHA顆粒の形成と維持に関与する顆粒結合タンパク質PhaPに着目し、そのPHAシンターゼにおよぼす効果による共重合PHA生合成能の向上と制御という、新たなアプローチを試みた。

3. 研究の方法

我々は以前に*Pseudomonas putida*などにP(3HB-co-3HHx)生産菌*Aeromonas caviae*由来のphasinであるPhaP_{Ac}と広基質特異性PHAシンターゼPhaC_{Ac}を共発現させると、PhaC_{Ac}単独発現と比べて生合成されたPHA中の3HHx分率が増加することを観察した⁷⁾。その理由は当時不明であったが、上述のphasin研究の進展を踏まえ、顆粒表面上でのPhaP_{Ac}との相互作用によってPhaC_{Ac}の重合特性や

基質特異性が変化した可能性を考えた。一方、我々がこれまでに作製した *R. eutropha* NSDG 株は、染色体の *pha* オペロン中の PHA シンターゼ遺伝子 *phaC_{Re}* を *PhaC_{Ac}* 2 アミノ酸変異体遺伝子 *phaC_{NSDG}* に置換した株で、脂肪酸や植物油から少量の 3HHx ユニットの含む P(3HB-co-3HHx) を生合成する。これらの株で *PhaC_{NSDG}* と共に顆粒表面に結合しているのは *R. eutropha* が本来有する phasin である。PhaP-PhaC 相互作用を考えた場合、当然のことながらその相互作用には特異性がある可能性が考えられた。

本研究では PhaP の特性に着目した P(3HB-co-3HHx) 生合成の効率化と共重合組成の制御を目指し、以下の二点について検討を行った。

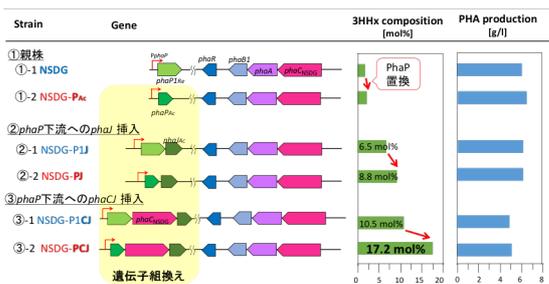
- 1) *R. eutropha* 染色体上 *phaP_{Re}* 下流への PHA 生合成系遺伝子の挿入
- 2) *R. eutropha* における主要 phasin の置換

4. 研究成果

- 1) *R. eutropha* 染色体上 *phaP_{Re}* 下流への PHA 生合成系遺伝子の挿入

上述のように *R. eutropha* では *phaP_{Re}* プロモーターは PHA 蓄積期に非常に高い転写活性を示す。そこで上述の *R. eutropha* NSDG 株を宿主として、もう 1 コピーの *phaC_{NSDG}* や脂肪酸β-酸化経路から 3HHx モノマーを生成する (*R*)-エノイル-CoA ヒドラーターゼ遺伝子 *phaJ_{Ac}* を染色体上の *phaP_{Re}* 下流に挿入することで高発現させ、大豆油炭素源での PHA 生合成におよぼす影響を検討した。その結果、*phaC_{NSDG}* 単独導入では 3HHx 組成に大きな変化は見られなかったが、*phaJ_{Ac}* 単独導入で PHA 生産量が減少することなく 3HHx 分率が著しく増加し、*phaJ_{Ac}* と *phaC_{NSDG}* の両方の導入によって 3HHx 分率はさらに増加した (Table 1)。これらの結果から、*phaP_{Re}* 遺伝子座は PHA 生合成関連遺伝子の挿入部位として有効であることが示された。一方で 2 コピー目の *phaC_{NSDG}* の導入は蓄積 PHA の分子量を大幅に低下させ (約 1/9)、PHA シンターゼの発現量は PHA 組成だけではなく分子量にも影響を与えることが示された。多分散度 (PDI) は遺伝子操作によらずほぼ一定であった。

Table 1. *PhaP_{Re}* 遺伝子座組換え *R. eutropha* による大豆油からの P(3HB-co-3HHx) 生合成



* 菌体培養条件: 窒素源制限無機塩培地、1% 大豆油、72 h、30°C
* Mn: 数平均分子量、Mw: 重量平均分子量、PDI: 多分散度

- 2) *R. eutropha* における主要 phasin の置換

PHA 顆粒に結合しているタンパク質の解析により、*R. eutropha* の本来の主要 phasin である *PhaP_{Re}* が NSDG 株においても PHA 顆粒に多量に結合していることを確認した。そこで NSDG 株由来の各種組換え株について、*phaC_{NSDG}* と同じ *A. caviae* 由来の *phaP_{Ac}* で *phaP_{Re}* を置換する組換えを施し、PhaP の違いによる PHA 生合成能への影響を検討した。興味深いことに、この遺伝子改変により大豆油からの PHA 生産量をほぼ維持したまま 3HHx 分率を増加させる傾向が見られた。特に、*phaP_{Ac}* 下流に *phaC_{NSDG}-phaJ_{Ac}* を挿入した NSDG-*PhaC* 株では、本来の *phaP_{Re}* を保持する NSDG-*PhaC* 株と比較して大豆油から蓄積した P(3HB-co-3HHx) 中の 3HHx 分率が 10.5 mol% から 1.6 倍の 17.2 mol% と著著に増加した。さらに *PhaP_{Ac}* 置換株が生合成した P(3HB-co-3HHx) の数平均分子量 (M_n) は、*PhaP_{Re}* を有する親株の PHA と比較して、それぞれ 1.8 倍、1.4 倍に増加した。この結果は、顆粒表面において *PhaP_{Ac}* が同じ *A. caviae* 由来の PHA シンターゼ *PhaC_{NSDG}* の重合特性を変化させた可能性を強く示唆する。

Table 2. *PhaP_{Re}* 遺伝子座組換え *R. eutropha* の不溶性画分における PHA シンターゼの動力学的解析

株 (遺伝子型)	基質	K _m		V _{max}		V _{max} /K _m	
		[μM]	C ₆ /C ₄ ratio	[μmol/min/ mg-insoluble ^a]	C ₆ /C ₄ ratio	C ₆ /C ₄ ratio	C ₆ /C ₄ ratio
NSDG- <i>PhaC</i>	C ₄	320		0.21		6.4 × 10 ⁻⁴	
	C ₆	614	1.9	0.041	0.20	6.6 × 10 ⁻⁵	0.10
NSDG- <i>PhaC</i>	C ₄	86	0.71	0.52	0.21	6.1 × 10 ⁻³	0.30
	C ₆	61		0.11		1.8 × 10 ⁻³	

* 窒素源制限無機塩培地、1% (v/v) 大豆油、48 h、30°C
* 基質: C₄: (R)-3HB-CoA; C₆: (R)-3HHx-CoA
* a. Dry insoluble fraction

PhaP_{Ac} による *PhaC_{NSDG}* の触媒特性の変化について知見を得るため、PHA 顆粒を含む不溶性画分を用いた PHA シンターゼ活性測定を行った。その結果、*PhaC_{NSDG}* の基質に対する親和性は *PhaP_{Ac}* によって高くなるが、C₆ 基質に対して特に高くなることが示され (Table 2)、この触媒特性の変化により蓄積 PHA の組成変化が起こったものと推測された (Fig. 4)。

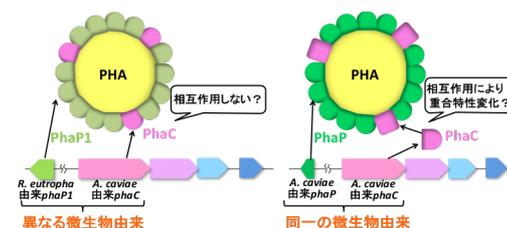


Fig. 4. *PhaP*-*PhaC* 相互作用による *PhaC* 特性変化の推定

本研究の結果から、微生物細胞内の PHA 顆粒に結合する phasin タンパク質を選択することによって、生合成される PHA 共重合体の組成や分子量を制御することが可能であ

ることが示された。共重合 PHA 生合成を目的とした従来の代謝改変では、第二、第三ユニット分率の増加は第一ユニット分率の低下による相対的なものであり、その結果として生産量の低下を伴うことが多い。本研究による PhaP 置換は PHA シンターゼの重合特性の変化に基づくもので代謝フラックスには影響を与えず、従って生産量低下を伴わずに共重合組成などの PHA 生合成を制御できる新機な改変戦略であると言える。従来の代謝改変と組み合わせた相乗的な効果も期待できる。

<引用文献>

- 1) Mifune J, et al. *Polym Degrad Stab* **95**:1305–1312 (2010)
- 2) Insomphun C, et al. *J Biosci Bioeng* **117**:184–190 (2014)
- 3) Wiczorek R, et al. *J Bacteriol* **177**:2425–2435 (1995)
- 4) York GM, et al. *J Bacteriol* **183**:2394–2397 (2001)
- 5) Cho M, et al. *Biochemistry* **51**:2276–2288 (2012)
- 6) Ushimaru K, et al. *Appl Environ Microbiol* **80**:2867–2873 (2014)
- 7) Fukui T, et al. *Biomacromolecules* **2**:148 (2001)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- 1) Yui Kawashima, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, and Toshiaki Fukui, “Compositional regulation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by replacement of granule-associated protein in *Ralstonia eutropha*”, *Microb Cell Fact*(査読有), **14**:187, 2015
DOI: 10.1186/s12934-015-0380-8

〔学会発表〕 (計 6 件)

- (1) 川島由依・折田和泉・中村 聡・福居俊昭「顆粒結合タンパク質の特性を利用した共重合ポリエステル生合成能の改変」第 3 回 JACI/GSC シンポジウム、平成 26 年 5 月 22 日-23 日、東京
- (2) Toshiaki Fukui, Yui Kawashima, Chayatip Insomphun, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, “Microbial synthesis of biodegradable copolyesters from biomass”, *Enzyme Engineering XXII*, 2014.9.22-26, Toyama
- (3) 川島由依・折田和泉・中村 聡・福居俊昭「顆粒結合タンパク質の特性を利用した *Ralstonia eutropha* 共重合ポリエステル生合成能の改変」日本農芸化学会

2014 年度大会、平成 26 年 3 月 28 日-30 日、川崎

- (4) Toshiaki Fukui, “Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from biomass resources”, The 4th ACIKITA International Conference on Science & Technology 2014, 2014.8.25-27, Jakarta, Indonesia.
- (5) 川島由依・折田和泉・中村 聡・福居俊昭「*Ralstonia eutropha* での共重合ポリヒドロキシアルカン酸生合成における顆粒結合タンパク質の影響解析」第 66 回日本生物工学会大会、平成 26 年 9 月 9 日-11 日、札幌
- (6) Yui Kawashima, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui, “Compositional regulation of PHA copolymers synthesized from plant oil by replacement of granule-associated protein in *Ralstonia eutropha*”, International Symposium on Biopolymers 2014, 2014.9.28-10.1, Santos, Brazil.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ポリエステル顆粒結合タンパク質遺伝子座を改変した組換え株による共重合ポリエステルの製造法

発明者：川島由依・折田和泉・福居俊昭

権利者：東京工業大学

種類：特許

番号：特願 2014-041787

出願年月日：平成 26 年 8 月 4 日

国内外の別：国内

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・教授

研究者番号：80271542

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

川島由依 (KAWASHIMA, Yui)