

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：57403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871137

研究課題名(和文)未利用なバイオマス資源を原料とした芳香族ポリエステル微生物生産

研究課題名(英文)A challenge for biosynthesis of polymers containing aromatic monomers from unutilized biomass resources

研究代表者

富澤 哲 (Tomizawa, Satoshi)

熊本高等専門学校・生物化学システム工学科・助教

研究者番号：90634709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が生産するポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の熱性向上を目的として、主鎖に芳香環を有するモノマーを含む脂肪族-芳香族ポリエステルの微生物生産を試みた。PHAのモノマー組成は微生物に与える炭素源でコントロールできるため、未利用な芳香族バイオマス資源であるリグニンの分解物や予想される代謝産物を炭素源として微生物の培養を行った。得られたポリマーを分析した結果、一部の微生物は脂肪族ポリエステルを生産していた。PHAを合成する酵素と化学合成した芳香族モノマーを直接反応させたが、脂肪族-芳香族ポリエステルは得られなかった。そこで、改変型酵素を取得する実験の構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the conversion of lignin derivatives to bio-polymers containing aromatic monomers, polyhydroxyalkanoate (PHA)-accumulating strains were cultured on mineral salt media containing each of the lignin derivatives and hydroxybenzoic acids, including intermediates derived from the metabolism of lignin derivatives in bacteria. *Ralstonia eutropha* H16 could synthesize PHA from hydroxybenzoic acids, but aromatic polymers were not produced in this strain. To examine the ability of PHA synthase, I tried in vitro polymerization of aromatic polymers using wild-type PHA synthases and aromatic monomers. However, aromatic polymers were not synthesized in this study.

研究分野：微生物工学

キーワード：バイオマス PHA PHB リグニン

1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素の発生を抑制の観点から、植物油や廃棄グリセロールなどの未精製なバイオマス資源を原料として、微生物生産される脂肪族ポリエステル的一种であるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、早期実用化が期待されている高分子材料である。PHAは熱可塑性、生分解性を有する優れた材料であるが、熔融成型中に著しい性能低下が生じるため、ほとんど利用されていない。この原因はPHAが熔融する温度と熱分解する温度が近いためである。一般に、主鎖に芳香環を有するモノマー成分を含む高分子材料は高い耐熱性を示すことが知られている。もし、主鎖に芳香環を有するモノマー成分をPHAに導入できれば、耐熱性の向上が期待できる。

植物資源の主要な成分としてセルロース、ヘミセルロース、リグニンの三つが挙げられる。グルコースの重合体であるセルロースや複数の多糖で構成されているヘミセルロースは、加水分解や発酵され、糖やアルコール、化学原料として利用されている。それに対して、芳香環を含み複雑な構造をしているリグニンの分解物は、多様な化合物の混合物であり、特定の化合物を分離精製することが難しいため、ほとんど利用されていない。もし、未精製なリグニン分解物を原料として、主鎖に芳香環を有するモノマー成分を含むポリエステルを微生物生産できれば、バイオマス資源の活用と微生物産ポリエステルの高性能化の両立が可能となり、バイオマス由来の高分子材料の利用が促進されるものと予想される。

2. 研究の目的

未利用なバイオマス資源であるリグニンに関係する化合物を炭素源として、PHA生産微生物を培養することにより耐熱性が飛躍的に向上した微生物産脂肪族-芳香族ポリエステルを生産することを目的とした。

3. 研究の方法

未利用なバイオマス資源であるリグニンの構成成分であるp-クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸、シナピン酸およびリグニンの構成成分の代謝経路に含まれると推測した芳香族カルボン酸(ヒドロキシ安息香酸、ジヒドロキシ安息香酸、トリヒドロキシ安息香酸、バニリン酸、シリング酸)を炭素源とし、制限培地でPHAを蓄積する微生物(11種類)を培養した。はじめに、炭素源とした芳香族化合物は水に溶解しにくいので、水酸化ナトリウム水溶液を用いて中和し、溶解した。続いて、各炭素源を含む2mLスケールの培地で培養し、微生物の増殖を分光光度計により調べた。増殖した微生物について、100mLへとスケールアップし、集菌、凍結乾燥した後、蓄積したポリエステルを溶解するためにクロロホルムに浸した。菌体をろ過で除去し、メタノールへ滴下することでポリエステルを抽出

した。沈殿物を回収後、ガスクロマトグラフィー(GC)と核磁気共鳴法(NMR)を用いて構造を解析し、分子量をゲルサイズ排除クロマトグラフィー(GPC)にて調べた。

PHAの合成反応を触媒する酵素であるPHA重合酵素と基質を直接反応させる生体外構成実験を計画した。PHA重合酵素の基質特異性は微生物の種類によって異なるため、*Ralstonia eutropha* H16、*Chromobacterium* sp. strain USM2由来のPHA重合酵素を準備した。また、基質である芳香族モノマーは化学合成により準備し、バッファー中でPHA重合酵素と混合する生体外合成を試みた。

芳香族モノマーを供給するCoAリガーゼをクローニングし、変異導入したPHA重合酵素を大腸菌細胞内で共発現させることにより、脂肪族-芳香族ポリエステルの微生物生産を試みた。

4. 研究成果

微生物が生産する脂肪族ポリエステルであるPHAのモノマー成分は微生物に与える炭素源によりある程度コントロールできる。また、微生物の種類により蓄積するPHAの構造は異なる。これらの事実を基に芳香族化合物を炭素源とした微生物の培養を行った。

はじめにp-クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸、シナピン酸およびリグニンの構成成分の代謝経路に含まれると推測した芳香族カルボン酸を単一炭素源として、PHAを蓄積する微生物(11種類)を2mLスケールで培養し、どの炭素源で増殖ができるか調べた(Table 1)。その結果、*R. eutropha* H16は3-ヒドロキシ安息香酸(3-HBA)と4-ヒドロキシ安息香酸(4-HBA)、*Pseudomonas putida* JCM13063はバニリン酸、4-HBA、3,4-ジヒドロキシ安息香酸(3,4-DHBA)、*Pseudomonas putida* Gpo1はp-クマル酸、フェルラ酸、バニリン酸、4-HBA、3,4-DHBAを炭素源としたときに増殖していた。この3つの微生物について100mLで培養し、ポリエステルの抽出を試みた。*P. putida* JCM13063と*P. putida* Gpo1を培養した場合、増殖はしたが、ポリエステルの蓄積は確認できなかった。それに対して3-HBAと4-HBAを炭素源として*R. eutropha* H16を培養したところ、最も一般的なポリエステルであるポリヒドロキシブタン酸(P[3HB])を乾燥菌体重量あたり63-65%蓄積した。得られたP(3HB)の数平均分子量は50-65万と一般的な微生物産PHAと同等の値であった。また、*R. eutropha* H16について、100mLの富栄養下で培養した後に集菌し、炭素源を含む100mLの制限培地へ移動する2段階培養も行った。*R. eutropha* H16は3-HBAと4-HBAに加え、2,5-DHBAと3,4-DHBAもP(3HB)へと変換できることが明らかとなった。この実験結果とリグニンの構成成分の代謝予想と比較すると、微生物細胞内でリグニンの構成成分を4-HBA、3,4-DHBに変換する代謝経路を強化あるいは補強すれば、リグニンの構成成分をP(3HB)

へ変換可能であることが示唆された。また、芳香族化合物を炭素源としても目的とした主鎖に芳香環が含まれたポリエステルは得られないことが明らかとなった。この原因は、(1)PHA 重合酵素に芳香族モノマーが供給されていない、(2)PHA の合成反応を触媒するPHA 重合酵素が芳香族モノマーを認識していない、の二点が考えられた。

Table 1 微生物の増殖試験結果

炭素源 (2 g/L)	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	<i>Ralstonia eutropha</i> PHB-4PhaC _{Ac}	<i>Ralstonia eutropha</i> PHB-4PhaC _{Ac} (E11/S12)	<i>Ralstonia eutropha</i> 11599	<i>Deiftia acidovorans</i>	<i>Pseudomonas putida</i> 13063	<i>Pseudomonas putida</i> GPe1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Vibrio</i> sp. KNO1
MS培地 ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-クマル酸	-	-	-	-	-	-	●	*	-	-	-
カフェ酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
フェルラ酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
パニリン酸	-	-	-	-	●	●	●	-	-	-	-
シナピン酸	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
シリンガ酸	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*
サリチル酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-HBA ²⁾	-	-	-	-	●	-	-	-	-	-	-
4-HBA ²⁾	-	●	-	-	●	-	-	-	-	-	-
2,3-DHBA ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-DHBA ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5-DHBA ³⁾	-	-	-	-	-	*	*	●	-	-	-
2,6-DHBA ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,4-DHBA ³⁾	-	-	-	-	●	-	-	-	-	-	-
3,5-DHBA ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4-THBA ⁴⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4,6-THBA ⁴⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,4,5-THBA ⁴⁾	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*

OD600 : ≥ 0.50, ○ : 0.50-0.20, ● : 0.20-0.10, △ : 0.10-0.01, - : ≤ 0.01

¹⁾2 mL の Mineral Salt 培地, ²⁾ヒドロキシ安息香酸 (hydroxylbenzoic acid), ³⁾ジヒドロキシ安息香酸 (dihydroxylbenzoic acid), ⁴⁾トリヒドロキシ安息香酸 (trihydroxylbenzoic acid), * 培地が変色した。

PHA の合成反応を触媒する酵素である PHA 重合酵素の基質は、実際に重合される部位と酵素が認識するために必要な補酵素 A (コエンザイム A, CoA) 部位がチオエステル結合した化合物である。まず、4-HBA と 3-HBA に CoA が共有結合した 4-ヒドロキシベンゾイル CoA と 3-ヒドロキシベンゾイル CoA を合成した。また、PHA 重合酵素の基質は PHA 重合酵素の種類により異なるため、最も一般的な PHA 重合酵素である *R. eutropha* H16 株由来の PHA 重合酵素と基質特異性が広いことで知られている *Chromobacterium* sp. strain USM2 由来の PHA 重合酵素を準備した。重合反応の進行は、チオエステル結合の吸収波長である 236nm の減少によりモニタリングした。はじめに PHA 重合酵素と芳香族モノマーをバッファ中で混合する生体外重合を行った

(Figure 1 A)。 *R. eutropha* H16 株由来の PHA 重合酵素の元来の基質である 3-ヒドロキシベンゾイル CoA (3HB-CoA) を加えた場合、236nm の吸収が減少しているのに対して、4-ヒドロキシベンゾイル CoA を加えた場合は吸収に変化がなかった。これは、PHA 重合酵素が 4-ヒドロキシベンゾイル CoA を認識していないことを意味していた。次に、3HB-CoA で活性化させた PHA 重合酵素に芳香族モノマーを追加する手法を試みた (Figure 1 B)。3HB-CoA を追加した場合は、236nm の減少が確認できるが、4-ヒドロキシベンゾイル CoA を追加した場合、236nm の吸収は変化しなかった。また、*Chromobacterium* sp. strain USM2 由来の PHA 重合酵素や 3-ヒドロキシベンゾイル CoA を基質とした場合も同様に芳香族モノマーに活性を示さなかった。この実験より、本研究で用いた PHA 重合酵素は芳香族モノマーに活性を示さないことが明らかとなった。すなわち、脂肪族-芳香族ポリエステルが得られない原因は PHA 重合酵素が芳香族モノマーに活性を示さないためであり、PHA 重合酵素の改変が目的達成の鍵になることが示唆された。

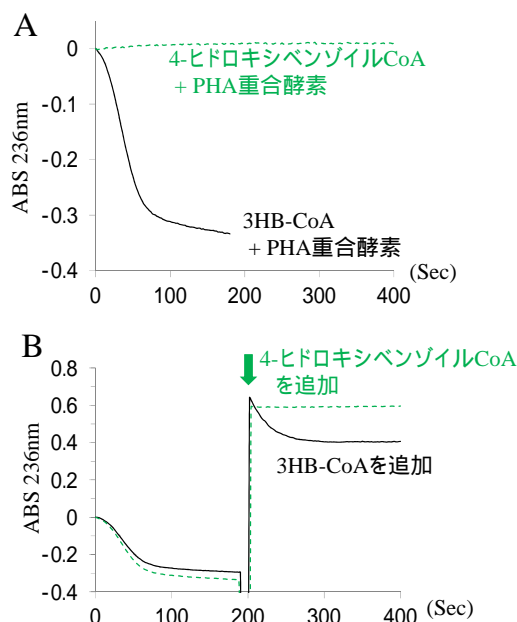


Figure 1 *R. eutropha* H16 由来 PHA 重合酵素の活性試験。(A) 実線: 3HB-CoA と PHA 重合酵素を混合した、破線: 4-ヒドロキシベンゾイル CoA と PHA 重合酵素を混合した。(B) 実線: 3HB-CoA と PHA 重合酵素を混合し、矢印の時間に 3HB-CoA を追加した、破線: 3HB-CoA と PHA 重合酵素を混合し、矢印の時間に 4-ヒドロキシベンゾイル CoA を追加した。

芳香族モノマーに対して活性を示す PHA 重合酵素を取得する方法として、芳香族モノマーを供給する CoA リガーゼと変異導入した PHA 重合酵素を大腸菌細胞内で共発現し、芳香族カルボン酸と染色試薬を含む寒天培地上で培養する手法の構築を試みた。現在までに芳香族モノマーを含むポリエステルは得

られていないが、本研究は、PHA 重合酵素に関する基礎的な知見の取得と芳香族モノマーに対して活性を示す PHA 重合酵素を取得するためのスクリーニング系の構築に貢献したといえる。

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)(査読あり)

(1) S. Tomizawa, JA. Chuah, K. Matsumoto, K. Numata: Understanding the Limitations in the Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Lignin Derivatives, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, **2**, 1106-1113, (2014).

[学会発表](計 3 件)

(1) 富澤哲、沼田圭司：ポリヒドロキシアリカン酸重合酵素の芳香族モノマーに対する活性の検討、第 63 回高分子年次大会、名古屋工業大学、2014 年 5 月

(2) 富澤哲、沼田圭司：ポリヒドロキシアリカン酸を合成する微生物による芳香族カルボン酸の変換、第 62 回高分子討論会、金沢大学、2013 年 9 月

(3) 富澤哲、渡辺友香、沼田圭司: Synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from aromatic carboxylic acid as a sole carbon source by PHA accumulation、第 62 回高分子年次大会、京都国際会議場、2013 年 5 月

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称：微生物によるポリヒドロキシアリカン酸の生産方法

発明者：沼田圭司、富澤哲、松本圭司

権利者：(独)理化学研究所、(株)カネカ

種類：特許

番号：特願 2013-216465

出願年月日：2013 年 10 月 17 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富澤 哲 (TOMIZAWA SATOSHI)

熊本高等専門学校・生物化学システム工学
科・助教

研究者番号：90634709