

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660080

研究課題名(和文) 乳酸ポリマー中のモノマー分率を高度に制御する微生物酵素の進化工学研究

研究課題名(英文) Evolutionary engineering of microbial enzyme that regulates the monomer composition in lactate-based polymer

研究代表者

田口 精一 (TAGUCHI, SEIICHI)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70216828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸重合酵素の開発を契機に、従来の微生物ポリエステルであるポリヒドロキシ酸ファミリーを拡張した乳酸ポリマーの微生物合成系開発に成功している。本申請課題では、乳酸と共重合化モノマー3HB(3-hydroxybutyrate)とのコポリマー中のモノマー分率の制御を目指し、NADPH依存型acetoacetyl-CoA還元酵素(PhaB)に焦点を当て、実験室内進化を実施したところ、活性が向上しポリマー生産性も向上させる2種の優良変異酵素を取得できた。立体構造上で考察してみたところ、これらの変異効果が基質認識に関与する領域での構造柔軟性に起因することが推察された。

研究成果の概要(英文)：Microbial synthetic system for lactate (LA)-based polymer, as an advanced member of microbial polyester (polyhydroxyalkanoate) family, was already established by development of lactate-polymerizing enzyme. In order to regulate the monomer composition in P(LA-co-3-hydroxybutyrate (3HB)) copolymer, I have applied evolutionary engineering to NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) through the plate assay-based enzyme evolution program. As the result, I obtained two beneficial PhaB enzymes with increased activities that can also increase microbial polymer production. Acquired beneficial properties of these evolved P(3HB) enzymes can be accounted for by flexibility increase in the substrate-related region based on the tertiary structure bearing two domains.

研究分野：酵素進化工学

キーワード：ポリヒドロキシアリカン酸 乳酸ポリマー 乳酸分率 アセトアセチルCoA還元酵素 進化工学 速度論的解析 ポリマー物性 コリネ型細菌

1. 研究開始当初の背景

環境と生体に調和するバイオポリマーの代表格であるポリ乳酸は、乳酸発酵と乳酸重合が融合したバイオ・化学ブハイブリッドプロセスにより生産されてきた。申請者は、乳酸重合酵素を世界に先駆けて開発し、微生物細胞内でポリ乳酸やその誘導体をワンポット生合成する系を初めて確立した。本乳酸ポリマー微生物合成系は、乳酸重合酵素の広い基質特性に基づき、乳酸を多様なモノマーと共重合化した乳酸ベースポリマー「多元ポリ乳酸」の創出が新たに可能となった。本研究課題では、乳酸(LA)と 3-hydroxybutyrate (3HB)とのコポリマーである P(LA-co-3HB)をターゲットに、ポリマー物性を決定づけるモノマー分率の制御を目的として、NADPH依存型 acetoacetyl-CoA 還元酵素の進化学研究をすることにした。

2. 研究の目的

微生物細胞内で合成されるバイオポリマーの物性を支配する共重合組成は、重合酵素の基質特異性の他に、モノマー供給酵素の基質特異性も重要な要因となる。本研究対象となる P(LA-co-3HB)のモノマー分率を制御する手法として、3HB-CoA 合成を触媒する PhaB に着目した。P(LA-co-3HB)二元共重合体中の 3HB モノマーの取り込みに直接関わる PhaB の立体構造情報は、同時に進行していた他のプロジェクトの成果から提供され、進化学研究との融合が可能である。そこで、本研究の目的を、主に PhaB の進化学的改変によるモノマー分率制御、ポリマー生産性向上と設定した。

3. 研究の方法

ポリマー合成宿主として、E. coli BW 株シリーズを利用した。また、コリネ型細菌も標準菌を利用した。3HB-CoA 供給系として、水素細菌由来 PhaA と PhaB の 2 遺伝子を発現ベクターに挿入した。一方、LA-CoA 供給には嫌気細菌由来 propionyl-CoA 転移酵素遺伝子を加味して、最終的に重合を触媒する新規開発乳酸重合酵素遺伝子を導入した。PhaB の進化実験は、3HB のホモポリマー合成能力をポリマー特異的染色色素を含有するプレートアッセイに基づいて実施した。すなわち、変異誘発 PCR によって作成した PhaB 変異体ライブラリーを発現宿主株に遺伝子導入して、優良変異株(高ポリマー合成蓄積株)を上記プレートアッセイ系で選別した。

得られた優良変異酵素に関しては、大腸菌で組換え発現させ、抽出・精製後に市販の天然基質 acetoacetyl-CoA に対して反応速度論的解析を行った。変異効果に関しては、同時に進行しているプロジェクトにより解明された立体構造に基づいたモデリングにより行った。

ポリマーの合成量、モノマー分率および配

列は HPLC、GC-MS および NMR を利用して決定した。また、分子量は GPC により評価した。ポリマー物性、特に熱的性質は DSC あるいは機械的性質は引っ張り試験機を用いて測定した。

4. 研究成果

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、糖や脂肪酸のような再生可能原料から微生物によって生合成される環境・生体調和型の脂肪族ポリエステルである。これまでに、150種以上の構成モノマーユニットが特定され、細胞内に発現するモノマー供給酵素と重合酵素の基質特異性によりそれらモノマーの構成組成(分率)が決まる。すなわち、構造関連・非関連モノマー前駆体が細胞内に流入・生成すれば、重合酵素の広い基質特異性に依存して多様な組合せに共重合化されたコポリマーが合成可能である。

申請者は、乳酸重合酵素の開発に成功し、乳酸ポリマーの微生物合成を可能とする系を開発した。本申請課題では、乳酸と共重合化モノマー3HB(3-hydroxybutyrate)とのコポリマー中のモノマー分率の制御を目指し、acetoacetyl-CoA 還元酵素(PhaB)に焦点を当て、独自に開発した進化分子工学プログラム(1,2 アミノ酸置換頻度の変異誘発 PCR により作成した変異体ライブラリーとポリマー特異的染色色素 Nile red を含有したプレート評価系との融合)に基づいた実験室内進化を実施したところ、活性が向上した2種の優良変異酵素を取得できた。

組み換え発現し精製したいずれの変異酵素も、天然基質 acetoacetyl-CoA に対して反応速度論的解析を行ったところ2.4倍および3.5倍の kcat 値向上を示しや。そこで、実際コリネ型細菌や植物体に遺伝子導入したところ、P(3HB)ホモポリマーの合成量が上昇した。酵素活性上昇をもたらす変異効果を立体構造上で考察してみたところ、基質認識に関与する領域での構造柔軟性に起因することが推察された。PhaB は4量体を形成し、可動性領域と非可動性領域の2ドメインから成り、基質結合部位は可動性領域に位置する。特にこの領域に優良変異が発生し易いという傍証も本考察を支持している。現在、本酵素と重合酵素との組み合わせにより、乳酸(3HB)分率の変動したコポリマーの合成と物性評価を実施している。

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5件)

- (1) R. Kadoya, Y. Kodama, K. Matsumoto, S. Taguchi: Indirect positive effects of a sigma factor RpoN deletion on the lactate-based polymer production in *Escherichia coli*, *Bioengineered*, 6, 307-311

- (2015).
- (2) R. Kadoya, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: MtgA deletion-triggered cell enlargement of *Escherichia coli* for enhanced intracellular polyester accumulation, PLoS ONE, **10**, 1-8 (2015).
 - (3) R. Kadoya, Y. Kodama, K. Matsumoto, S. Taguchi: Enhanced cellular content and lactate fraction of the P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) production in recombinant *Escherichia coli* by the deletion of sigma factor RpoN, J. Biosci. Bioeng., **119**, 427-429 (2015).
 - (4) T. Yokoo, K. Matsumoto, J. M. Nduko, T. Ooi, S. Taguchi: Enhanced poly(3-hydroxybutyrate) production in transgenic tobacco BY-2 cells using engineered acetoacetyl-CoA reductase, Biosci. Biotechnol. Biochem., **3**, 1-3 (2015).
 - (5) K. Matsumoto, K. Tobitani, S. Aoki, Y. Song, T. ooi, S. Taguchi: Improved production of poly(lactic acid)-like polyester based on metabolite analysis to address the rate-limiting step, AMB Express, **4**, 1-6 (2014).
- 〔学会発表〕特に国際会議（海外開催）での基調講演・招待講演に限定（計5件）
- (1) S. Taguchi: Advances in microbial system for production of PLA-related polymers, American Chemical Society, Pacificchem 2015, Honolulu, Hawaii, USA of Engineering, Singapore, December 17, 2015.
 - (2) S. Taguchi: Biosynthetic PLA-related polymers improved by the metabolic engineering, The 5th International Conference on Bio-based Polymers, The National University of Singapore (NUS), Faculty of Engineering, Singapore, June 25, 2015.
 - (3) S. Taguchi: Microbial Plastic Factory: New lactate-based and related biopolymers, 2nd International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials, Nice, France, October 4, 2014.
 - (4) K. Matsumoto, J. Sun, T. Ooi, S. Taguchi: Biosynthesis of polyesters consisting of 2-hydroxyalkanoates and their applications, 248th ACS National Meeting and Exposition, Mendes Plaza Hotel, Santos, Brazil, September 29, 2014.
 - (5) K. Matsumoto, S. Taguchi: Biosynthesis, properties and enzymatic degradation

of poly(2-hydroxyalkanoates), 248th ACS National Meeting and Exposition, The Hilton San Francisco Union Square, San Francisco, CA, USA, August 10, 2014.

〔図書〕(計3件)

- (1) J. M. Nduko, J. Sun, S. Taguchi: Biosynthesis, Properties, and Biodegradation of Lactate-Based Polymers, ACS Symposium Series, Green Polymer Chemistry: Biobased Materials and Biocatalysis, American Chemical Society, 2015. ACS Symposium Series Vol. 1192, Edited by H. N. Cheng, Richard A. Gross and Patrick B. Smith, pp. 113-131, 2015.06, ISBN: 978-0-84123-065-1.
- (2) Y. Song, J. M. Nduko, K. Matsumoto, S. Taguchi: Microbial Factory for the Production of Polyesters: A New Platform of *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium glutamicum* from Systems Biology to Biotechnological Applications Caizer Academic Press, pp.137-148, 2015.05. ISBN: 978-1-910190-05-0.
- (3) K. Matsumoto, K. Tajima, S. Taguchi: Biosynthesis of Polymers, Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials, edited by S. Kobayashi and K. Müren, Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-12, 2015.02, ISBN: 978-3-642-36199-9.

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

名称：高分子量微生物産生ポリエステルの合成法

発明者：松本謙一郎、田口精一

権利者：同上

種類：特許

番号：2015-153415

出願年月日：2015年0808日

国内外の別：国内

名称：MtgA 遺伝子の欠損した微生物

発明者：田口精一、門屋亨介

権利者：同上

種類：特許

番号：2015-110777

出願年月日：2015年0510日

国内外の別：国内

取得状況（計 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
所属研究室
<http://labs.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/>
H28年度 文部科学大臣表彰科学分野(研究分野)受賞

6. 研究組織

(1)研究代表者

田口 精一 (TAGUCHI SEIICHI)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：70216828

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：