

生分解性を有する高性能バイオプラスチックの 環境調和型合成法の開発

所属：熊本県立大学 環境共生学部 環境共生学科 食健康環境学専攻

助成対象者：松崎弘美

共同研究者：田口精一、田中賢二、阿部英喜

概要

プラスチックによる環境問題を解決するため、生分解性を有する高性能バイオプラスチックの生合成を行うことを目的に研究を行った。微生物が合成するバイオプラスチック、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) のモノマーユニット供給系酵素として、*Pseudomonas* sp. 61-3 の (R)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼおよび (R) 体特異的エノイル CoA ヒドラターゼの遺伝子をクローニング、同定した。その後、*Cupriavidus necator* を宿主として、モノマーユニット供給系酵素遺伝子を *Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子 (*phaCl*) あるいはその改変体遺伝子 (*phaCl(STQK)*) とともに導入した結果、組換え株は糖や脂肪酸から P(3HB-co-3HA) や P(LA-co-3HB) を合成した。

abstract

In order to solve the environmental problems caused by current plastics, we conducted the research with the aim of biosynthesizing high-performance bioplastics with biodegradability. The genes of (R)-3-hydroxyacyl-CoA ligase and (R)-specific enoyl-CoA hydratase as monomer unit supplying enzymes for polyhydroxyalkanoate (PHA) in *Pseudomonas* sp. 61-3 were cloned and identified. Introduction of monomer unit supplying enzyme genes into *Cupriavidus necator* together with *phaCl* or the variant *phaCl(STQK)* gene from *Pseudomonas* sp. 61-3 resulted in the synthesis of P(3HB-co-3HA) and P(LA-co-3HB) copolymers from sugar or fatty acids.

研究内容

「背景」

プラスチックは軽量かつ丈夫であり、使用中はその性質が有用であるが、使用後はその丈夫さ、強さ故にさまざまな環境問題を引き起こしている。特に直径 5 mm 以下のマイクロプラスチックによる海洋汚染は深刻であるため、自然環境中で完全に分解される生分解性プラスチックの開発と実用化が望まれている。中でも、微生物が合成するバイオプラスチック、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、生分解性プラスチックの有力な候補である。微生物は再生可能資源を利用するため、石油エネルギーの使用量や二酸化炭素排出量の削減も期待できる。しかし、野生株が合成する PHA は硬くて脆いものや非晶質のものなど物性に難があり実用的とはいえない。すなわち、PHA を汎用性プラスチックの代替として普及させるためには、生分解性と実用性を兼ね備えた高性能 PHA の創製と PHA 生産の低コスト化が重要となる。そのためには、PHA のモノマーユニット供給系酵素を明らかにし、低基質特異性 PHA 重合酵素を用いて代謝制御を行って PHA のモノマー組成を制御する必要がある。例えば、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*) および *Cupriavidus necator* の 3HB ユニット供給系酵素 (β -ケトチオラーゼおよびアセトアセチル CoA レダクターゼ) 遺伝子 (*phbAB*) を導入したセルフクローニング系の *Pseudomonas* sp. 61-3 組換え株は、グルコースを炭素源として耐衝撃性に優れた P(3HB-co-3HA) 共重合体 (炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) と炭素数 6~12 の 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) からなるランダム共重合体) を合成した¹⁻³⁾。特に、P(94% 3HB-co-6% 3HA) の破断伸びは、P(3HB) の 5% に対して 680% であり、レジ袋やゴミ袋に利用されている低密度ポリエチレンと同等の物性を示す丈夫な PHA であった³⁾。一方、透明性を有するバイオプラスチックも求められている。現在、透明なポリ乳酸 (PLA) が生分解性プラスチックとして知られているが、有害な重金属を用いて化学合成されている。そのため、乳酸 (LA) ユニットの重合できる PhaC1 の改変体 PhaC1(STQK) を用いて、PLA 様物質 (LA ベースポリマー) の生合成が可能となった⁴⁻⁷⁾。このような物性に優れた実用的な高性能 PHA の作製とその環境調和型合成法を開発することが生分解性プラスチックの普及と実用化には重要となる。

「目的」

C. necator を宿主とし、糖や脂肪酸を唯一の炭素源として実用的な P(3HB-co-3HA) および LA ベースポリマーの合成を行うことを目的とした。そのため、脂肪酸合成経路から中鎖長 3HA ユニット、(R)-3HA-CoA の供給経路として、(R)-3-ヒドロキシアシル ACP チオ

に示した代謝制御を行い、*C. necator* の短鎖長特異的 PHA 重合酵素遺伝子を破壊した H16dC 株を宿主とした遺伝子組換え株を作製した。また、脂肪酸分解経路からの (*R*)-3HA-CoA の供給経路として、*Pseudomonas* sp. 61-3 の (*R*)体特異的エノイル CoA ヒドラーゼ遺伝子 (*phaJ*) のクローニングおよび同定を行った。

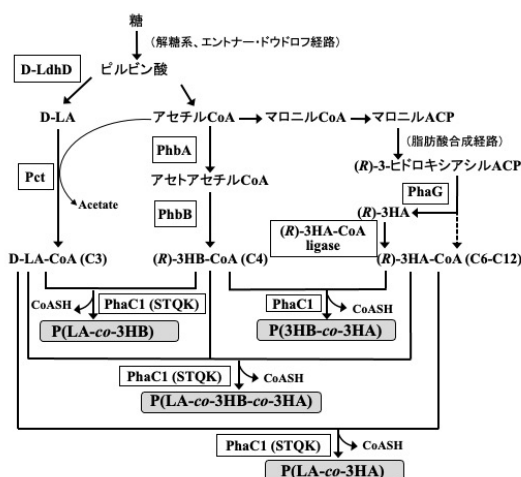


図1 糖からの高性能バイオプラスチック [P(3HB-co-3HA) およびLAベースポリマー] の生合成における代謝制御

「結果」

(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有する PP0763 遺伝子の翻訳産物と相同性を示す近縁菌由来の推定タンパク質の保存領域を基にプライマーを設計し、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA の degenerate PCR を行った。次に、得られた増幅産物の塩基配列を基に nested PCR を行った。3.5 kb *Sall*-*EcoRI* 領域の塩基配列を決定した結果、1,683 塩基対、560 アミノ酸残基からなる推定分子量 62 kDa のタンパク質をコードしていた。*Pseudomonas* sp. 61-3 の推定(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子の推定翻訳産物は PA3924 のそれと 97%の相同性を示した。次に、その推定

(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子および *phaG* 遺伝子を *phaC1* 遺伝子とともに導入した *C. necator* H16dC の組換え株は、PA3924 導入株と同様にフルクトースから脂肪酸合成経路を介して蓄積率 8~9 wt% で

表1 *phaC*/G_{ps} および(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した組換え *R. eutropha* H16dC 株による PHA 生産

plasmid (relevant markers)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA concentration (g/L)	PHA composition (mol%)					
				3HB (C4)	3HA (C6-14)				
					3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')
pJASc22 (P _{Ps} , <i>phaCI</i> _{Ps})	0.7	1.0	0.01	100	0	0	0	0	0
pRTcAA-G and pJASc22 (P _{lac} , <i>phaG</i> _{Ps}) (P _{Ps} , <i>phaCI</i> _{Ps})	0.8	1.2	0.01	100	0	0	0	0	0
pRTcAA-GMCL(Pa) and pJASc22 (P _{lac} , <i>phaG</i> _{Ps} , PA3924) (P _{Ps} , <i>phaCI</i> _{Ps})	1.5	8.6	0.13	93.8	0	2.2	2.4	1.6	0
pRTcASc2-GMCL(Ps) and pJASc22 (P _{lac} , <i>phaG</i> _{Ps} , (R)-3HA-CoA ligase gene (Ps)) (P _{Ps} , <i>phaCI</i> _{Ps})	0.9	7.6	0.07	94.6	0.5	1.8	1.7	1.2	0.2

Cells were cultivated at 30°C for 72 h in mineral salt medium containing 2% (w/v) fructose.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-5-*cis*-dodecanoate.

P(3HB-*co*-3HA)を合成した（表 1）。また、そのときの 3HB 分率は 94～95 mol%、3HA 分率は 5～6 mol%であった。これは、先行研究の *Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株が合成した低密度ポリエチレンと同様な物性を示す P(94% 3HB-*co*-6% 3HA)³⁾と同様なモノマー組成であることから、実用的な高性能なバイオプラスチックが合成できたと考えられた。次に、(*R*)体特異的エノイル CoA ヒドラーゼ活性を有する *P. aeruginosa* PAO の *phaJ4_{Pa}* 遺伝子の翻訳産物と相同性を示す近縁菌由来の推定タンパク質のアライメントを行い、保存領域を基に degenerate プライマーを設計し、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。続いて、その増幅産物の塩基配列を基にプライマーを設計し、inverse PCR、nested PCR、anchor PCR を行って、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaJ4_{Ps}* 遺伝子の塩基配列を決定した。

その結果、*phaJ4_{Ps}* 遺伝子は 456 塩基対、151 アミノ酸残基からなる推定分子量 17 kDa のタンパク質をコードしていた。これは、多くの *Pseudomonas* 属細菌の MaoC family dehydratase と 81～99%と高い相同性を示し、*P. aeruginosa* PAO の *phaJ4_{Pa}* 遺伝子 (PA4015) の翻訳産物と 81%の相同性を示した。続いて、*phaJ4_{Ps}* 遺伝子を *phaC1* 遺伝子とともに大腸菌 LS5218 株に導入したところ、*phaJ4_{Pa}* 遺伝子導入株と同様にドデカン酸を炭素源として P(3% 3HB-*co*-97% 3HA)を 18 wt%で合成した。また、*C. necator* H16dC の *phaC1* 遺伝子導入株はテトラデカン酸

を炭素源として

P(3HB-*co*-3HA)を合成し、

さらに *phaJ4_{Pa}* 遺伝子を導

入すると 3HA 分率が 72

mol%まで高まった（表 2）。

表 2 *phaJ4_{Ps}* 遺伝子を導入した組換え *R. eutropha* H16dC 株による PHA の蓄積

plasmid (relevant markers)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA concentration (g/L)	PHA composition (mol%)					
				3HA (C6-14)					
				3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')
pJASc22 (<i>P_{Ps}</i> , <i>phaC1_{Ps}</i>)	0.8	22.6	0.19	63.0	3.3	15.6	11.6	6.5	0
pRTXX-J4 and pJASc22 (<i>P_{lac}</i> , <i>phaJ4_{Pa}</i>) (<i>P_{Ps}</i> , <i>phaC1_{Ps}</i>)	0.7	5.9	0.04	28.0	4.7	32.4	23.0	11.9	0

Cells were cultivated at 30°C for 72 h in mineral salt medium containing 0.2% (w/v) tetradecanoate.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-5-*cis*-dodecanoate.

さらに、*C. necator* H16dC に *Megasphaera elsdeni* のプロピオニル CoA 転移酵素遺伝子 (*pct*)、*Lactobacillus acetotolerans* HT の D-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*ldhD*)、PhaC1 改変体酵素遺伝子 (*phaC1(STQK)*) を導入した組換え株を作製した。その組換え株をフルクトースあるいはグルコン酸を炭素源として培養したところ、*C. necator* は 3HB ユニット供給系酵素遺伝子 (*phbAB*) を有しているにも関わらず、ポリマーを全く合成しなかった。そこで、*C. necator* H16 (野生株) の短鎖長 PHA 重合酵素遺伝子 (*phbC*) を *phaC1(STQK)* 遺伝子に置換した H16C1STQK 株に上記遺伝子を導入した組換え株を作製し、同様に培養した。その結果、LA 分率は 0.5 mol%未満であったが、*C. necator* を宿主として LA ベー

スポリマーP(LA-co-3HB)の生合成に初めて成功した(表3)。次に、組換え株を栄養豊富なNB培地で菌体を増殖させ

た後、窒素源を制限したMS培地にて培養を行う二段階培養を行った結果、グルコン酸を炭素源としたときにLA分率が4.5 mol%と向上したP(LA-co-3HB)を合成することができた(表4)。

「今後」

本研究により、*C. necator* を宿主として高性能バイオプラスチック、P(3HB-co-3HA) および

P(LA-co-3HB)を合成することができたが、その蓄積率が低いことやLA分率が低いことが課題として残る。そのため、蓄積率向上を目指した分子育種をさらに進める必要がある。加えて、*C. necator* は二酸化炭素を炭素源として利用できるのも、二酸化炭素からの高性能バイオプラスチックの生合成を行い、地球温暖化防止をも含めた高度環境調和型合成法の確立を目指す。

引用文献

- 1) Matsusaki H. et al., J. Bacteriol., 180, 6459-6467, 1998
- 2) Matsusaki H. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 401-409, 2000
- 3) Matsusaki H. et al., Biomacromolecules, 1, 17-22, 2000
- 4) Taguchi S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 105, 17323-17327, 2008
- 5) Yamada M. et al., J. Biotechnol., 154, 255-260, 2011
- 6) Goto S. et al., J. Biosci. Bioeng., 128, 191-197, 2019
- 7) Goto S. et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 65, 204-208, 2019
- 8) Tappel R.C. et al., ACS Sustainable Chem. Eng., 2, 1879-1887, 2014
- 9) Hokamura A. et al., J. Biosci. Bioeng., 120, 305-310, 2015

表3 *pct*、*phaC1(STQK)*および*ldhD* 遺伝子を導入した組換え *C. necator* H16C1STQK 株における LA ベースポリマーの合成

Carbon source	Condition	Dry cell weight (g/L)	Polymer content (wt%)	Polymer composition (mol%)	
				LA (C3)	3HB (C4)
Fructose	Aerobioc	1.32	49.8	0.1	99.9
Gluconate	Aerobioc	3.43	84.1	0.4	99.6
Fructose	Microaerobic	1.45	50.3	0.2	99.8
Gluconate	Microaerobic	1.43	39.8	0.1	99.9

Cells were cultivated at 30°C for 72 h in MS medium containing 2% fructose or 2% sodium gluconate as the sole carbon source. *C. necator* H16C1STQK is the strain in which the *phbC* of the H16 strain is replaced with *phaC1(STQK)*. LA, D-lactate; 3HB, 3-hydroxybutyrate.

表4 *pct*、*phaC1(STQK)*および*ldhD* 遺伝子を導入した組換え *C. necator* H16C1STQK 株における LA ベースポリマーの合成 (二段階培養)

Carbon source	Condition	Dry cell weight (g/L)	Polymer content (wt%)	Polymer composition (mol%)	
				LA (C3)	3HB (C4)
Fructose	Aerobic	1.12	46.3	1.5	98.5
Gluconate	Aerobic	1.10	45.1	4.5	95.5

Cells were cultivated at 30°C for 24 h in NB medium (growth phase) and were subsequently cultivated at 30°C for 48 h in nitrogen-free MS medium (polymer accumulation phase) containing 2% fructose or 2% sodium gluconate as the sole carbon source. *C. necator* H16C1STQK is the strain in which the *phbC* of the H16 strain is replaced with *phaC1(STQK)*. LA, D-lactate; 3HB, 3-hydroxybutyrate.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

[口頭発表]

1) 新規乳酸ベースバイオポリマーの生合成における培養条件の検討

岡本沙樹、西上明花、後藤早希、松本謙一郎、阿部英喜、田口精一、田中賢二、松崎弘美

日本農芸化学会 2020 年度（令和 2 年度）大会、講演番号 3C02p05、3 月 27 日（九州大学（福岡）、3 月 25 日-3 月 27 日）（新型コロナウイルス感染防止のため開催中止）

2) 組換え微生物による高性能バイオプラスチックの生合成

岡本沙樹、久永理央、西愛美、西上明花、後藤早希、田中賢二、田口精一、松崎弘美
2020 年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会（日本農芸化学会西日本支部第 332 回講演会）、2020 年度（令和 2 年度）大会、講演要旨集 p.31、11 月 27 日（宮崎大学木花キャンパスおよび Zoom オンライン会議によるハイブリッド開催、11 月 27 日-11 月 28 日）

3) 組換え微生物による高性能バイオポリエステルの生合成

岡本沙樹、久永理央、西 愛美、西上明花、後藤早希、河原あい、田中賢二、田口 精一、松崎 弘美

日本農芸化学会 2021 年度（令和 3 年度）大会、講演番号 1D1p13、3 月 20 日（東北大学川内キャンパス（仙台）Zoom によるリモート開催、3 月 18 日-3 月 21 日）

[ポスター発表]

[その他]