

バイオポリエステル発酵生産における分子量制御技術の創成

柘植 丈治

(東京工業大学大学院総合理工学研究科)

研究の目的

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、ある種の細菌が炭素およびエネルギー貯蔵物質として細胞内に蓄積する、熱可塑性や生分解性を備えたバイオポリエステルである。天然由来の細菌が合成する PHA の重量平均分子量は、一般的には 50~100 万の範囲にある。高分子の分子量は、その物性に影響を及ぼすため、分子量が制御された高分子は産業的に価値の高い材料である。しかしながら、PHA の発酵生産の場合、任意の分子量に制御することは非常に難しい。

本研究では、PHA 重合酵素の変異体が野生型酵素とは異なった分子量の PHA を合成することに着目して、発酵法における PHA 分子量制御技術の創出に取り組んだ。具体的には、種々の変異体酵素を作製し、目的に応じた分子量のポリマーを合成する酵素を選択して使用することで、規定された分子量の PHA を合成する手法について検討した。

方法

グラム陰性細菌 *Ralstonia eutropha* は、代表的な PHA 合成細菌として知られており、細胞内に最大 90 wt% のポリマーを蓄積する能力を有している。その PHA 合成欠損株である PHB⁻4 株を宿主として、高性能な PHA を合成することができる *Aeromonas caviae* 由来 PHA 重合酵素を発現させることで PHA 合成を行った。本実験で使用した変異体酵素は、505 位のアラニンが他の 19 種類全てのアミノ酸に置換されている。

組換え株の培養は、500 ml 容フラスコを用いて、フルクトースを炭素源とした合成培地で、30 度、72 時間振とう培養した。培養後、菌体を凍結乾燥し、ガスクロマトグラフィー (GC) による PHA 蓄積量の分析、および、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を用いた分子量の測定を行った。

結果

PHA 重合酵素の配列解析と変異導入位置

PHA 重合酵素は、基質特異性および四次構造の違いから 4 つのタイプに分類される。最も研究が進んでいる *R. eutropha* の PHA 重合酵素はタイプ I に属し、508 位のヒスチジンは活性中心を形成するアミノ酸残基の 1 つである。これまでの研究により、その 2 残基下流に位置する 510 位のアラニンを他のアミノ酸に置換すると、合成される PHA 分子量に変化が表れることが分かった。^[1] また、タイプ II に属する *Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 重合酵素 I においても、同じポジションに位置するグルタミンを他のアミノ酸に置換すると、合成されるポリマーの分子量が変化することが分かった。^[2] したがって、タイプ I および II の酵素において、活性中心のヒスチジンの 2 残基下流に位置するアミノ酸は、PHA の分子量規定に関わるアミノ酸残基である可能性が考えられた。

A. caviae の PHA 重合酵素は、タイプ I の亜種であり、基質特異性の面でタイプ II 酵素に似

通った性質を有する。相同性解析から、この酵素の活性中心ヒスチジンは 503 位に位置しており、505 位のアラニンが分子量の規定に関与するアミノ酸と予測された。本研究では、505 位への変異導入効果を検証する目的で、他の 19 種類のアミノ酸に置換した変異体を作製した。

変異型酵素の PHA 合成能評価

PCR法により作製した変異型遺伝子を広宿主域ベクターに挿入し、*Ralstonia eutropha* PHB⁻4 株に導入した。作製した組換え株とコントロール株の計 20 種類を、所定条件で培養し、PHA の蓄積量を調べた。

培養後の乾燥菌体重量は、2.8~4.1 g/l の範囲にあり、全ての株がおおむね良好な増殖を示した。PHA の蓄積量は、野生型酵素で最も高い値 (79 wt%) を示し、メチオニン (78 wt%)、トレオニン (77 wt%) への置換体がそれに続いた。一方、最も低い PHA 蓄積量を示した酵素は、プロリン、アルギニン、リジンへの置換体で、66 wt% の蓄積量であった。しかしながら、PHA を全く蓄積しなかった組換え株は存在せず、また、最も貯めた株とそうでない株との差は、わずかに 13 wt% であった。したがって、505 位のアミノ酸残基は、PHA 合成にそのものには大きな影響を及ぼさないポジションであると推測される。

PHA 分子量の測定

乾燥菌体から、クロロホルムを用いて PHA を抽出した。精製したポリマーを GPC に供し、数平均分子量、重量平均分子量、および多分散度の測定を行った。その結果、野生型酵素によって合成されたポリマーの数平均分子量は 25 万であり、多分散度は 2.6 であった。変異型酵素によって合成されたポリマーは、11 万~29 万の数平均分子量を示した。野生型より高い分子量のポリマーを合成する酵素は得られなかったが、低い分子量のポリマーを合成する変異型酵素を幾つか取得することができた。特に、メチオニン (11 万) とイソロイシン (12 万) への置換体では、再現性良く低分子量のポリマーを合成し、それらの多分散度は 2.5 と 3.3 であった。これら変異体は、野生型酵素と同等の高い PHA 合成能を有していることから、低分子量の PHA 合成を行う場合には、非常に利用価値の高い酵素である。

結論

Aeromonas caviae 由来の PHA 重合酵素の 505 位にアミノ酸置換を導入し、変異体酵素が合成する PHA の分子量を調べた。505 位のアラニンをメチオニンまたはイソロイシンに置換すると、PHA 蓄積能を維持したまま、分子量を低下させる効果があった。これら変異体酵素を利用することで、従来の PHA よりも分子量が半分のポリマーを合成できるようになった。このような変異体酵素のライブラリーを構築することにより、分子量が規定された PHA を自在に合成する手法を確立することができる。

文献

[1] Tsuge, T., Saito, Y., Narike, M., Muneta, K., Yahaya, N. M., Kikkawa, Y., Hiraishi, T., Doi, Y.: Mutation effects of a conserved alanine (Ala510) in type I polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha* on polyester biosynthesis; *Macromol. Biosci.*, 4, 963-970

(2004)

[2] Tsuge, T., Yano, K., Imazu, S., Numata, K., Kikkawa, Y., Abe, H., Taguchi, S., Doi, Y.: Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases; *Macromol. Biosci.*, 5, 112-117 (2005)