

メタノールを原料にした共重合バイオポリエステル生産のための微生物育種

折田 和泉

(東京工業大学大学院 生命理工学研究科)

研究の目的

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、微生物がエネルギー貯蔵物質として体内で合成、蓄積するバイオポリエステルである。このバイオポリエステルは、バイオマスに由来する糖や植物油を原料として生産可能であり、生分解性を有することから石油を原料とした汎用プラスチックの代替として期待されている。一方、PHA 生産の原料として注目したメタノールは、主として貯蔵量が豊富な天然ガスから合成され、将来的にはバイオマスやメタンハイドレートからの合成が期待されている未来型資源であり、古くから微生物の発酵原料としても利用されている。本研究では、このようなメタノールを単一炭素源として、高物性を有することが知られている中鎖モノマー (C₆) が共重合した PHA を効率よく生合成できる菌株を遺伝子工学的代謝改変によって育種することを目的とした。遺伝子組換えの宿主菌株として、メタノールを唯一の炭素源として生育可能なメタノール資化性微生物 (メチロトローフ) と、メタノールを資化出来ないが PHA を高効率で生産可能な水素細菌を用いることで、1) PHA を生産するメチロトローフにおける PHA の共重合化と生産効率化、2) PHA を生産出来ないメチロトローフへの PHA 合成能付与、3) PHA 高生産性非メチロトローフへのメタノール資化性付与を目指した研究を行った。

方法

遺伝子組換え用の大腸菌として、*Escherichia coli* DH5 α および *E. coli* S17-1 を用いた。メチロトローフには、異なる資化経路を有する以下の3種のメチロトローフ、*Methylobacterium extorquens* AM1 (セリン経路)、*Paracoccus denitrificans* (リブローズビスリン酸経路)、*Methylobacillus flagellatus* (リブローズモノリン酸経路) を用いた。また、非メチロトローフとして、水素細菌 *Ralstonia eutropha* を用いた。ターゲットの遺伝子は PCR 法により増幅し、プラスミドによる遺伝子発現の際には改変した pCM80¹⁾ を、相同組換えには pK18mobsacB を用いた。蓄積した PHA は、メタノールを終濃度 0.5% (v/v) となるように加えた 100 ml の窒素制限無機塩培地を用い、30 $^{\circ}$ C 振とう培養した菌体を凍結乾燥後、メタノリシス処理して、GC または GC-MS により解析した。さらに、PHA をクロロホルムで抽出した後、GPC と NMR に供して、分子量と組成の解析を行った。

結果

1) PHA の共重合化と生産効率化のための *M. extorquens* と *P. denitrificans* の分子育種
まず、*M. extorquens* AM1 野生株が生合成する PHA の再解析を行った。その結果、こ

れまで炭素数4のモノマーのみから成る P(3HB)しか合成出来ないと考えられていた野生株は、炭素数5のモノマーが共重合したポリ(3-ヒドロキシ酪酸-co-3-ヒドロキシ吉草酸) [P(3HB-co-3HV)]を合成しているという重要な事実を明らかにした。一方、申請者が以前に構築した本菌の PHA 重合酵素を基質特異性の広い酵素に置換した AM1C_{Ac}株は、炭素数4,5,6の3つのモノマーが共重合した共重合 PHA を蓄積していた (Table 1)。本菌はグリオキシル酸再生のためのエチルマロニル-CoA 経路 (EMCP) を有する²⁾。EMCP 上には、第二モノマーの前駆体となる CoA 中間体が存在するため、これらの CoA 中間体を第二モノマー成分に導くための酵素遺伝子を AM1C_{Ac}株内で高発現した。その結果、クロトニル-CoA カルボキシラーゼ/レダクターゼ遺伝子を発現させたとき、C₆モノマーユニットの分率が AM1C_{Ac}株の2倍程度増加したが、この発現株でも C₆ユニット分率は0.5 mol%と低かった。また、本菌の PHA モノマー供給酵素であるβ-ケトチオラーゼおよびアセトアセチル-CoA レダクターゼをコードする *phaA*, *phaB* を高発現した結果、PHA 蓄積率のみならず C₅ユニット分率の増加も確認され、これらが広基質特異性を有することが明らかとなった (Table 1)。

P. denitrificans は、メタノールを原料にしてホモポリマーP(3HB)を合成することが知られている³⁾。まず、*M. extorquens* の育種の際と同様に、染色体上の PHA 重合酵素遺伝子を基質特異性の広い *Aeromonas caviae* 由来 PHA 重合酵素 (PhaC_{Ac}) とその変異体 (PhaC_{NSDG}) の遺伝子に相同組換えによって置換した株を構築した。しかし、これらの組換え株は PHA 蓄積率、第二モノマー分率ともに宿主株と同等の値を示した。

2) *M. flagellatus* への PHA 合成能付与

M. flagellatus は、偏性メチロトローフでありメタノール培地で速やかな生育速度を示すが、PHA 合成能を有さない。そこで、*R. eutropha* 由来 *phaA*, *phaB* と *phaC*_{NSDG} を本菌のメタノールデヒドロゲナーゼプロモーターを配したベクター上で発現した。組換え株を培養した結果、宿主株と比較して生育速度は低下したものの、乾燥菌体重量あたり7 wt%の P(3HB)を蓄積した。

3) *R. eutropha* へのメタノール資化性付与

R. eutropha は糖や植物油を炭素源として80 wt%を超える PHA を蓄積するが、メタノール資化能を有さない。一方で、*R. eutropha* のゲノム解析の結果、メタノール酸化に関わる酵素遺伝子と相同性の高い遺伝子を見出した。そこで、これらの酵素遺伝子とメチロトローフに由来するメタノール資化に関わる酵素遺伝子を発現させるためのベクターを構築した。現在、構築した菌株のメタノール生育能を調べている。

Table 1. Biosynthesis of PHA from methanol by *M. extorquens* AM1 and recombinant strains.

Strain	Cultivation time ^a (h)	DCW ^b (g/l)	RCW ^b (g/l)	PHA content (wt%)	Composition (mol%)		
					3HB (C ₄)	3HV (C ₅)	3HHx (C ₆)
AM1	72	0.699	0.642	8.38	95.7	3.92	0
AM1C _{Ac}	72	0.874	0.580	32.6	99.2	0.710	0.280
AM1C _{Ac} / pCM80-ccr	96	0.720	0.539	25.1	99.5	0.528	0.528
AM1C _{Ac} / pCM80Km-phaAB	72	0.416	0.241	43.6	96.6	3.23	0.201

^a Cells were cultured on the medium containing 0.5% methanol

^b Dry cell weight

^b Residual cell weight

結論

本研究では各種メタノール資化性細菌や代表的な PHA 生産菌を宿主として遺伝子工学的代謝改変を実施した。その結果、メタノールを単一炭素源として中鎖モノマーが共重合した PHA の合成とその効率化に成功した。また、PHA を合成できないメタノール資化性細菌に PHA 合成能を付与することができた。しかし、中鎖モノマー分率や PHA 生産効率はまだ不十分であり、今後更なる育種が必要である。

文献

- 1) Marx, C. J., and M. E. Lidstrom. (2001) Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **147**: 2065-2075.
- 2) Peyraud, R., P. Kiefer, P. Christen, S. Massou, J. C. Portais, and J. A. Vorholt. (2009) Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using ¹³C metabolomics. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:4846-4851.
- 3) Yamane, T., X. F. Chen, and S. Ueda. (1996) Polyhydroxyalkanoate synthesis from alcohols during the growth of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiology Letters* **135**: 207-211.