

研究報告書

「光合成と連動するバイオポリマー合成系の構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 松本 謙一郎

1. 研究のねらい

研究領域の目標である二酸化炭素の資源化を達成するためには、二酸化炭素の固定効率の向上のみならず、固定された炭素源を有用な化合物に変換する合成経路が不可欠である。一般に広く研究されている方法は、植物が光合成で固定化した炭素から合成する糖や油など(植物バイオマス)を前処理したのち、微生物を用いた物質変換を行う、あるいはさらに化学合成を組み合わせることで目的物質を合成するものである。合成のターゲットとなる物質には、燃料、化成品原料、高分子などがあり、微生物の種類、微生物内で発現する物質生産関係の酵素群により、合成される物質を制御できる。したがって、微生物細胞内に高付加価値の化合物の合成経路を構築できれば、より有用なプロセスを作ることができる。本研究課題は、遺伝子組換え微生物を用いることにより、材料として利用できるポリエステルを合成すること、とくに、グリコール酸ポリマーを生物合成することを目的とした。グリコール酸ポリマーは、生体適合性と生体吸収性を有することから、医療用材料としても利用される有用なポリマーであるが、現在は石油を原料として化学合成により合成されている。ある種の微生物はポリヒドロキシアルカン酸と呼ばれるポリエステルを合成し、細胞内に蓄積する能力を有するが、これまでにグリコール酸ユニットが含まれたポリエステルを合成する生物は見つかっていない。そこで、ポリヒドロキシアルカン酸の生合成経路を人工的に改変する事で、グリコール酸ポリマーを合成できる経路を作ることを検討した。この生合成系は、ポリヒドロキシアルカン酸の生合成経路をベースにしているため、ポリヒドロキシアルカン酸のモノマーとグリコール酸の共重合した新規ポリマーが得られる点で興味深い。そこで本研究では、この新規グリコール酸ポリマーの効率的合成系を構築するとともに、本ポリマーの熱的・機械的性質などの物性を評価することを検討した。さらに、グリコール酸ポリマーを合成するための遺伝子を構築することができれば、その遺伝子を他の生物に導入して機能させることも可能である。そこで、研究の第二段階では、光合成能力を有する微生物である光合成細菌に、ポリマー生合成系を構築して、二酸化炭素を直接の炭素源としてポリマー合成を行うことを検討した。

2. 研究成果

(1) 概要

ポリマー合成系酵素遺伝子群を導入した組換え大腸菌を用いてグリコール酸ポリマーの合成を行った。グリコール酸ポリマーの合成には、グリコール酸モノマーであるグリコリル CoA を合成する CoA 転移酵素、3-ヒドロキシ酪酸(3HB)モノマーである 3HB-CoA を合成するベータケトチオラーゼとアセトアセチル CoA レダクターゼ、さらにこれらを重合する重合酵素の4つの酵素が必要である。これらの酵素をコードする遺伝子を導入した組換え大腸菌を、グリコール酸を含む培地で培養することにより、グリコール酸と3HB との共重合体が合成される。予備実験

により、組換え大腸菌を用いてグリコール酸ポリマーを合成することが可能であることは確認されていた。しかし、合成されるポリマー量が極めて微量であったため、合成されたポリマーの物性は不明であった。本研究では、種々の検討の結果、グリコール酸ポリマーの生産性が低くなる原因は、大腸菌の増殖とグリコール酸の細胞内への取り込みが両立していないことであることを見出した。そこで、グリコール酸ポリマー合成のための培養条件を検討することにより、大腸菌が良好に成育し、かつグリコール酸の細胞内への取り込みがスムーズに進行する条件を見出した。本条件を用いることにより、従来法の100倍以上の効率でグリコール酸ポリマーを合成することが可能となった。得られたポリマーは、半透明の伸張性を有するフィルムに加工することができた。透明性の向上とポリマーの融点が低下したことなどから、高分子の結晶化度が低下したことが示され、これはランダム共重合体によく観測される特徴と一致した。加えて、グリコール酸ポリマーは、加水分解性が高いことが知られ、その性質により、生体医療材料として使用されている。3HBのホモポリマーであるP(3HB)は、非酵素的な加水分解がほとんど進行しないが、今回合成した生合成グリコール酸ポリマーは、純水中で分解が進行したことから、グリコリルユニットの導入により、加水分解性が付与されたことがわかった。さらに、光合成細菌でのポリマー合成のため、ポリマー合成系遺伝子群を導入した組換え菌を作成し、ポリマー合成系の構築を行った。この実験については、現在構築作業が継続しているが、代謝中間体をモニターしながら一段階ずつ代謝経路を構築し、テスト系として用いた大腸菌ではポリマー合成系が作動することを確認できた。



生合成グリコール酸ポリマーのフィルム

(2) 詳細

研究テーマ A「グリコール酸ポリマーの効率的生合成」

研究プロジェクト開始時点で、組換え大腸菌を用いて細胞内でグリコール酸ポリマーを合成できることが確認されていた。しかし、得られるポリマー量は培地1リットル当たり数十ミリグラムであり、通常数グラムのポリマーが得られることと比較して極めて低かった。本研究課題では、生合成グリコール酸ポリマーの生産性を通常のレベルに増加させることを目標とした。最初に成功したグリコール酸ポリマーの合成条件は、脂肪酸の一種であるドデカン酸とグリコール酸を混合して培養するものであった。しかし、宿主として用いた大腸菌は脂肪酸の資化能力が低く、脂肪酸の資化能力を向上させた変異株を用いても、菌の生育は非常に遅くなるのが欠点であった。しかし、酵母エキスなどを含む栄養培地や、グルコースを含む培地など、大腸菌の培養に適した培地では、菌の生育は改善するがグリコール酸ポリマーは合成できな

った。これらの原因として、酵母エキスをを用いた培地では、培地中の窒素源に対する炭素源の量が少ないために、ポリマーの合成が促進されないこと、グルコースを含む培地では、グルコースの存在による代謝抑制(カタボライトリプレッション)が誘導されグリコール酸が大腸菌に取り込まれなくなることが考えられた。この仮説に基づいて、大腸菌の生育とポリマー合成を促進し、かつグリコール酸の取り込みを阻害しない炭素源を用いることを検討した。その結果、グリコール酸ポリマーの生産性を大幅に向上させ、培地1リットル当たり数グラム生産する条件を見出した。これは通常の天然型の微生物産生ポリエステルで得られる生産性と同程度であった。合成されるポリマーの組成は、培地中のグリコール酸濃度により制御でき、最大で 15 mol%まで導入することができた。これらの結果より、生合成グリコール酸の生産性の向上は、概ね目標どおり達成できた。

研究テーマ B「グリコール酸ポリマーの物性評価」

生合成されたグリコール酸と 3HB のランダム共重合体は初めて合成されたポリマーであったため、その物性を調べた。上述した条件で、グリコール酸分率の異なるポリマーを合成し、ソルベントキャスト法でポリマーフィルムを調製した。得られたフィルムは、グリコール酸分率に応じて、白色からわずかに白濁した透明フィルムまで変化した。これらのフィルムは、グリコール酸分率の上昇に伴って融点が低下した。これは、共重合化により、ポリマーの結晶化度・結晶化速度が低下したためと考えられる。3HB ユニットを含むポリマーは、分子鎖の運動性が高いため、結晶化度を低下させると軟質で伸張性のある物性を示すと予想された。実際に、ポリマーフィルムの引っ張り試験を行ったところ、P(3HB)ホモポリマーと比較して伸張性が向上し、伸びる材料になっていた。これらのことから、生合成したグリコール酸ポリマーは、透明度と伸張性を有するポリマー材料として利用できることがわかった。

次にポリマーの加水分解性を評価した。分解性ポリマーには、微生物が分泌するエステル分解酵素などの作用を受けて分解される酵素分解性ポリマーと、酵素が存在しなくても分解が進行する非酵素的加水分解性ポリマーがある。人間の体内などで分解・吸収される生体吸収性材料としての用途では、非酵素的加水分解性が重要な因子となる。P(3HB)は環境中の微生物が分泌する酵素により分解される酵素分解性ポリマーであるが、非酵素的加水分解性は非常に低い。一方、化学合成グリコール酸ポリマーは高い加水分解性を有することが知られていた。生合成グリコール酸ポリマーからエマルジョンを調製し、純水中で一定時間インキュベーションした後の生成物を分析した。その結果、P(3HB)はわずかに分子量が低下したのみで、ほとんど加水分解性を示さないのに対し、グリコール酸ユニットを含むポリマーは可溶化するまで分解され、加水分解性が優位に向上することがわかった。分解産物の詳細な分析により、ポリマーは数量体前後のオリゴマーに分解されており、ポリマー中のグリコール酸ユニットはほぼ分解されていると予想された。生合成グリコール酸ポリマーには、化学合成グリコール酸ポリマーとは異なる構造上の特徴がある。化学的手法で合成されるグリコール酸ポリマーは、グリコール酸の環状二量体であるグリコリドを開環重合して得られる。この重合では、モノマーが二量体であるため、共重合体中を合成した場合、グリコール酸ユニットは必ず二個単位で存在する。一方、生合成グリコール酸ポリマーは、ポリマー鎖中にグリコール酸

ユニット1つずつ存在する。本結果により、本ポリマーの加水分解は、このようなモノマー配列に依存せず進行することがわかった。これらの結果から、生合成グリコール酸ポリマーは、フィルム等に加工でき、加水分解性を有することがわかった。

研究テーマ C「光合成細菌を用いたグリコール酸ポリマーの合成」

植物などの光合成生物は大気中の二酸化炭素を固定し、糖や脂質などの有機化合物を合成する。二酸化炭素を炭素源としたモノづくりでは、光合成で合成された糖や脂質などを出発物質として、微生物発酵、化学変換、あるいはその組み合わせにより、目的化合物を合成する。一方で、遺伝子組換え技術を用いると、光合成生物内の代謝を改変して目的とする化合物を合成することも可能である。本研究課題では、光合成生物の細胞内に新規ポリエステル生合成系を構築し、光合成の一次生産物を改変することを目的とした。研究開始時には、植物を宿主として使用することを計画していた。しかし、代謝の改変のしやすさと、実験に要する時間を考慮し、宿主を光合成細菌に変更した。

ポリエステルは複数の酵素反応を経て合成される。当然のことながら、このような複数ステップで合成される化合物は、代謝経路の一箇所でも進行しなければ合成されない。したがって、新しい合成経路を構築することを試みる場合、各酵素反応の進行が不確実な状態で、複数の酵素反応を連結して目的物質を合成するのは困難である。この問題を回避するための一つのシンプルな方法として、目的とする経路の上流から一つずつ酵素を発現させ、その反応産物が合成されていることを確認していくことが考えられる。ただし、代謝経路の途中の化合物は、通常細胞外に分泌されず、細胞内の濃度も非常に低い。細胞内の代謝中間体を分析する手法として、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)を用いる方法がある。LC-MSは複雑な混合物中の目的物質を検出できる強力な手法ではあるが、分析対象が不安定な化合物であることに加え、使用できるカラムや移動相の制限が多く、良好な結果を得るためには、細胞内成分の抽出法、前処理、カラムおよび移動相、質量分析計の設定について、適切な実験条件を見つける必要がある。本研究課題では、大腸菌をモデル系として用い、代謝中間体の分析条件を確立した後に、これを利用して上述したような手法での代謝経路の構築を検討した。その結果、大腸菌内に目的としたポリエステルを合成・蓄積させることができた。この手法を光合成細菌に適用することにより、同様に合成経路を構築できると期待される。本プロジェクトの期間内には、光合成細菌への一部の遺伝子の導入と、一部代謝中間体の検出に成功しているが、目的としたポリエステルの合成は未達成であったため、本項目の達成度は半分程度であった。

3. 今後の展開

本研究成果により、生合成グリコール酸ポリマーの生産性が向上し、物性評価が可能となった。本ポリマーは、3-ヒドロキシ酪酸とのランダム共重合体であり、透明性と伸張性を持つ。また、天然の微生物産生ポリエステルと比較して、加水分解性が大幅に向上している。現在は、グリコール酸分率が15モル%までのポリマーが合成できている。今後は、合成条件のさらなる改

良により、より幅広いグリコール酸分率の共重合体を合成できるようにするとともに、その用途開発にも取り組む。具体的には、本ポリマーの生体適合性の評価と材料開発のため、動物細胞培養系を用いた毒性評価と分解性評価などを行う。光合成によるポリマー生産系については、引き続き代謝経路の構築を進め、二酸化炭素を直接の炭素源としたポリマー合成系の確立を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

新規グリコール酸ポリマーの合成および物性解析においては、概ね期待通りの結果が得られた。光合成ポリマー合成系の構築については、現時点では未完成であるが、その中間段階として、新規ポリマー合成系を構築するための手法開発と大腸菌における予備実験に成功しているため、今後達成できると期待できる。研究の進め方としては、領域アドバイザーおよび同じ領域内のさきがけ研究者、CREST 研究者との議論を通じて有用な助言が得られたため、当初の研究計画から変更追加した項目もあり、当初計画に拘り過ぎず柔軟に進めた。研究体制は、コアメンバーとして大学院学生1, 2名と実験補助員1名で推進した。とくに一人の学生はポリマー合成系の構築で中心的な役割をはたし、さらに別テーマを担当した大学院生が、LC-MS 分析系の立ち上げに関して重要な貢献をした。一方で、遺伝子構築の配列ミスが遺伝子導入後に見つかり、遺伝子構築をやり直すなど、チェック不足による時間のロスがあったことは反省点である。研究費の使用目的としては、金額として大きいものとしては、実験補助員の雇用費とキャピラリー電気泳動装置(CE)の導入がある。実験補助員は、本プロジェクト期間を通じて、非常に大きな貢献をした。また、CE 装置は、低濃度のグリコール酸を検出するために、非常に有効であった。したがって、研究費は適正にかつ効果的に使用されたと考えている。本研究で得られた成果は、二酸化炭素からより高付加価値の化合物を合成する手法を提供するものであり、新たな生体医療材料の候補となるだけでなく、将来的には、植物バイオマスの有効利用、低炭素社会の実現などに貢献するものと期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

松本氏は、植物などの光合成生物の細胞内で、グリコール酸を直接ポリマーとして変換する経路を確立することを本研究の課題とした。その結果、組換え大腸菌を用いて、キシロースを炭素源として、グリコール酸経由でポリマーを生産する系の確立に成功した。この成果は、植物によるポリマー生産への道筋を付けたという点で評価できる。また、領域内からの多くの助言などを取り入れて研究を進めるなど、研究の進め方が着実であったことは評価したい。しかしながら、これまでの所では、二酸化炭素を材料とした光合成がこの工程の出発点となっていないのは残念である。なお、松本氏は、来年度から、ALCA での研究を実施することになっているが、本研究の成果を生かして、さらに研究を発展させてほしい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ken'ichiro MATSUMOTO, Kota TOBITANI, Shunsuke AOKI, Yuyang SONG, Toshihiko OOI, Seiichi TAGUCHI. Improved production of poly(lactic acid)-like polyester based on metabolite analysis to address the rate-limiting step. AMB Express. 2014, Vol. 4, 83
2. Toshinori YOKOO, Ken'ichiro MATSUMOTO, Takashi OOBA, Kenjiro MORIMOTO, Seiichi TAGUCHI. Enhanced poly(3-hydroxybutyrate) production in transgenic tobacco BY-2 cells using engineered acetoacetyl-CoA reductase. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2015, Vol.3, pp.1-3
3.
4.
5.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・招待講演

1. 松本謙一郎:“糖質バイオマスを利用した非天然ポリエステル微生物合成”、日本木材学会バイオマス変換研究会夏季講演会「バイオマス変換の研究最前線」、北海道大学農学部、平成27年7月11日
2. K. Matsumoto, M. Miyake, S. Terai, T. Kabe, T. Shiba, T. Ooi, T. Iwata, S. Taguchi: “Production of Unusual Microbial Polyesters”, IPC2014 – The 10th SPSJ International Polymer Conference, Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, 2014.12.2-5.
3. K. Matsumoto, J. M. Nduko, J. Sun, S. Taguchi: “Engineering of Bacteria and pathways toward efficient plastic production from renewable feedstock”, 5th Symposium on Academic Exchange and Collaborative Research, ETH, Zurich, Switzerland, 2014.11.27.
4. K. Matsumoto, J. Sun, T. Ooi, S. Taguchi: “Biosynthesis of polyesters consisting of 2-hydroxyalkanoates and their applications”, ISBP 2014 – International Symposium on Biopolymers, Mendes Plaza Hotel, Santos, Brazil, 2014.09.29.
5. 松本謙一郎、横尾俊憲、大井俊彦、田口精一:”二酸化炭素からプラスチックを合成する人工生命システムの創成 –最短の合成ルートは?–”、日本生物工学会大会シンポジウム、札幌コンベンションセンター、平成26年9月9日
6. 松本謙一郎、森本健二郎、大場貴史、横尾俊憲、田口精一:“微生物産生ポリエステルの植物合成 –植物の脂質代謝系はポリエステル合成に利用できるか–”、第26回植物脂質シンポジウム、北海道大学学術交流会館、平成25年9月

・研究会の立ち上げ

さきがけ領域内のバイオマス利用に関する研究を展開する研究者で、バイオマス研究会を立ち上げ、これまでに二度の勉強会を企画した。

・学会内での活動

高分子学会:2013-2014 に北海道支部若手研究会の世話人を務め、若手研究者・学生が中心となり研究発表を行う研究会を二度開催した。

生物工学会:2014年大会では、札幌が会場となり、実行委員および会場係りを担当した。2012年より教育委員を担当し、学会の刊行物などの編集に協力した。

農芸化学会:2015年大会では、札幌が会場となり、実行委員を務めた。

・研究事業への応募等

当さきがけ研究プロジェクトで得られた結果に基づき、2015年度 JST 先端的低炭素化技術開発(ALCA)に応募した。