



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	人工改変ポリエステル合成系遺伝子群を導入した植物工場によるポリエステル生産
Author(s)	松本, 謙一郎
Citation	高分子論文集, 68(8), 562-569 https://doi.org/10.1295/koron.68.562
Issue Date	2011-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71535
Type	journal article
File Information	inalversion-1.pdf



1 [総合論文]

2
3
4 人工改変ポリエステル合成系遺伝子群を導入した植物工場によるポリエステル
5 生産

6
7
8 松本 謙一郎

9
10 北海道大学工学研究院 生物機能高分子部門

11 (〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目)

12
13 TEL: 011-706-6612

14 e-mail: mken@eng.hokudai.ac.jp

和文要旨（400 字程度）

ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、微生物が合成・蓄積するポリエステルであり、バイオマスを原料として生産できるプラスチック材料として注目されている。さらに、PHA の生合成に必要な遺伝子を植物に導入する事により、大気中の二酸化炭素を炭素源とした PHA 生産が可能となる。PHA の熱的・機械的性質は、ポリマーを構成するモノマーの種類と共重合組成に大きく影響されるため、優れた物性を持つ PHA を生産するためには、組成の制御が重要になる。植物で共重合体を合成するためには、二酸化炭素から構成成分となるモノマーを供給し、さらにそれらのモノマーを重合できる活性を有する重合酵素を機能的に発現させる必要がある。筆者らは、人工的に変異を導入して機能を高めた PHA 合成酵素群を植物細胞内で組み合わせることにより、共重合体の合成に成功した。この結果により、人工改変酵素が光合成 PHA 生産におけるポリマーの分子設計に強力なツールになりうることを示された。

1. はじめに

プラスチックは、軽量で丈夫な材料であり安価に生産可能なことから、幅広い用途に使用され、我々の快適な生活になくてはならないものになっている。現在、ほとんどのプラスチックは石油から作られているが、将来的には石油資源が減少し、価格が上昇すると予想されているため、新たな原料の確保が課題となっている。そこで注目されているのが、バイオマスを原料として合成されるバイオベースプラスチックである。バイオマスは石油と比較して持続的に利用可能であることが期待できる上、バイオマスの大部分は植物や光合成微生物が大気中の二酸化炭素を固定して合成した有機物であるので、バイオマスを物質生産に利用することにより、大気中の二酸化炭素濃度の増加が抑えられると考えることができる。

バイオマスからプラスチックを合成する生産法は、バイオマスを微生物発酵によりモノマーまたはその前駆物質に変換し、それを化学的に重合してポリマー化する方法と、バイオマスから微生物発酵により直接ポリマー化までを行う生産法に大別することができる（Figure 1）。前者は、原料となるバイオマスの合成、モノマー合成、ポリマー合成の工程を経ることから、3 ステップ生産法と呼ばれる。3 ステップ生産法で生産されているバイオ

ベースプラスチックの代表として、ポリ乳酸が挙げられる。¹⁾ また、 ω -ヒドロキシ脂肪酸からポリエステルを合成する方法も報告されている。²⁾ 一方後者は、バイオマスの合成、発酵によるポリマー合成の2段階で生産されることから、2ステップ生産法と呼ばれる。ある種の微生物によって合成されるポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、2ステップ生産で合成される代表的なバイオベースプラスチックである。³⁻⁵⁾ 2ステップ生産法は、化学プロセスが不要であるため、その分のプロセスエネルギーが削減できる点と、化学合成と比較して、夾雑物を多く含む純度の低い原料からでもポリマーが合成できる長所がある。

本報では、この微生物のポリマー合成プロセスを植物細胞内に構築することにより、植物の栽培という一段階の工程でプラスチックを生産する1ステップ生産法への試みについて述べる。植物によるプラスチック生産系では、微生物発酵に必要な炭素源のコストが不要なため低コストで生産できる可能性がある。加えて、生産ステップが少なく各工程で消費されるエネルギーを削減できるため、省エネのプロセスになると期待できる。しかし、植物では二酸化炭素を唯一の炭素源としてポリマーを合成する必要があるため、ポリマーの構造やモノマー組成を制御することが非常に難しい。本報では、人工的な変異導入により高活性化した変異型 PHA 合成系酵素の開発について解説し、それを応用した植物による共重合体合成について述べる。

2. PHA の構造と物性

PHA は多くの微生物が細胞内に蓄積するポリエステルであり、炭素源・エネルギー源の貯蔵物質として機能していると考えられている。PHA は、典型的には 3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとし、微生物および炭素源の種類によって、ホモポリマーまたは共重合体が合成される。これらの PHA の熱的・機械的性質は、モノマーの種類および共重合組成に大きく影響される(Table 1)。⁶⁾ PHA のモノマーユニットは、炭素数が 4 または 5 が短鎖、6 から 12 までは中鎖と呼ばれる(この分類は栄養学上の分類とは異なっている)。最も多くの微生物に見られる PHA が 3-ヒドロキシブタン酸(3HB)のホモポリマーである P(3HB)である。P(3HB)は結晶性が高くガラス転移温度が 4℃付近であるため、室温では徐々に二次結晶化が進行し脆化がおこる。そのため、加工後に変形したり割れたりしやすく、利用可能な用途が限定される。この弱点を克服する方法の一つとして、延伸処理により高

強度繊維に加工する技術が研究されている。これまでに 1.3 GPa の引張り強度を有する繊維化に成功している。⁷⁾ また、材料としてではなく、動物の飼料に添加することで、P(3HB)の加水分解後に生成する 3HB の効果により、動物に感染する病原菌の抑制に利用する研究もある。⁸⁾ しかし、P(3HB)を包装材などとして用いられる汎用樹脂フィルムの代替材料として利用することは難しい。一方、中鎖 PHA は通常炭素数が 6 から 12 までのモノマーユニットを含む共重合体として合成される。このポリマーは非晶質であり、軟質のエラストマーとなる。これに対し、3HB を主成分として中鎖のモノマーユニットを含む共重合体(短鎖・中鎖共重合体)は、中鎖モノマー成分が 3HB ユニットの結晶化を抑制するため、適度な強度を持ちつつ柔軟性と伸長性を示すフィルムになる。⁹⁻¹⁰⁾ この性質から、短鎖・中鎖共重合体は、P(3HB)の欠点を補う事ができる材料として有力視されており、カネカ(株)では、最近 3HB と 3-ヒドロキシヘキサノ酸(3HHx)の共重合体の商業生産に着手している。短鎖・中鎖共重合体の物性は、中鎖モノマー成分の炭素数とポリマー中の分率により制御することができ、中鎖モノマーの炭素数が大きいほど、また中鎖モノマー成分の割合が高いほど材料が柔らかくなる。したがって、柔軟性の高い材料を合成するためには、炭素数が 8~12 のモノマーを導入すると効果が高く、さらに目的に応じて材料物性を調節するためには、モノマー組成を精密に制御する必要がある。また、短鎖・中鎖共重合体は、結晶化が抑制されているため、P(3HB)と比較して融点が低くなる。共重合体の融点はモノマー組成により変化するが、融点が低くなることで、低い温度で加工することができ、エネルギーの節約と溶融成形時の熱分解が低減するメリットがある。

3. PHA の生合成メカニズム

微生物細胞内の PHA の生合成メカニズムは、モノマーの合成と重合の 2 段階に大別される。モノマーとなるのは、典型的には 3-ヒドロキシ酸の CoA 体である。CoA はチオール基を有する補因子であり、カルボキシル基とチオエステルを形成したものを CoA 体と呼ぶ。生体内では CoA 体が有する自由エネルギーを利用し、様々な物質の生合成が行われる。例えば P(3HB)は、酢酸の CoA 体であるアセチル CoA を出発物質として合成される(Figure 2)。まず、PhaA の働きにより 2 分子のアセチル CoA が縮合してアセトアセチル CoA が合成され、さらに PhaB により還元される事によりモノマーとなる 3-ヒドロキシブチリル CoA (3HB-CoA)が合成される。次いで、重合酵素である PHA シンターゼ(PhaC)によって重合され

る事で、ポリエステルが合成される。

一方中鎖の PHA は、中鎖モノマーである 3-ヒドロキシアシル CoA が PHA シンターゼにより重合されることで合成される。中鎖モノマーの供給経路はいくつか知られているが、代表的なものは、脂肪酸の β 酸化系を経る経路である (Figure 4)。 β 酸化系は、文字通り β 位の炭素を酸化しながら脂肪酸を分解する反応サイクルであり、1 サイクルごとにアセチル CoA が 1 分子生成し、炭素数が 2 減少する。この反応の中間体として、PHA の中鎖モノマーとなる 3-ヒドロキシアシル CoA を経由する。このため、PHA 生産細菌、または PHA 合成系遺伝子群を組み込んだ組換え微生物を脂肪酸を炭素源として培養すると、中鎖の PHA が得られる。

ここで非常に重要なファクターとなるのが、PHA シンターゼの基質特異性である。これまでに様々な微生物から 60 種類以上の PHA シンターゼが単離されているが、それぞれの PHA シンターゼは重合できるモノマーの炭素数によって、いくつかのグループに分類される (Figure 2)。¹¹⁾ *Ralstonia eutropha* など多くの PHA 生産菌が有するクラス I の PHA シンターゼは、短鎖モノマーにのみ重合活性を有する。したがって、これらの PHA シンターゼを用いると、P(3HB) と炭素数が 4 と 5 のモノマーを含む短鎖共重合体が合成されるが、短鎖・中鎖共重合体は合成できない。一方、多くの *Pseudomonas* 属細菌は、中鎖モノマーに重合活性を示すクラス II の PHA シンターゼを有している。これらの PHA シンターゼを用いると、中鎖 PHA が合成されるが、短鎖モノマーを取り込むことができない。しかし、いくつかの PHA シンターゼは、例外的に幅広い基質特異性を持つことが知られている。例えば、*Aeromonas caviae* 由来のクラス I の PHA シンターゼは短鎖モノマーと炭素数が 6 の中鎖モノマーに重合活性を有し、前述した 3HB と 3HHx の共重合体の合成に使用されている。¹²⁾ また、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来のクラス II の PHA シンターゼは、炭素数が 6~12 の中鎖モノマーに加えて、活性は低いものの短鎖モノマーも重合することができる。¹³⁾ これらの PHA シンターゼを用いることで、短鎖・中鎖共重合体の合成が可能になる。

4. 人工変異導入による PHA 合成系酵素群の機能改変

PHA の物性はモノマー組成によって大きく影響されるため、PHA シンターゼの基質特異性は非常に重要な因子となる。しなやかなフィルムを作るためには、3HB を主成分とし少量の中鎖モノマーを含む短鎖・中鎖共重合体が効率よく合成できることが望まれる。しかし、

Pseudomonas sp. 61-3 由来の PHA シンターゼは短鎖 (3HB) モノマーに対する活性が低いため、このような共重合体の生産性が低いことが問題であった。この問題の一つの解決策は、天然から目的とする組成に適した基質特異性を有する PHA シンターゼを見つけ出すことであるが、短鎖・中鎖のモノマーを重合可能な PHA シンターゼは、現在知られている数多くの酵素の中でもごくわずかしかなことから、目的に適合する酵素を見つけるのは容易ではないと予想された。そこで田口らは、PHA シンターゼに人工的に変異を導入する事により、基質特異性を変化させることを検討した。¹⁴⁻¹⁵⁾

一例として、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA シンターゼの 3HB モノマーの重合活性向上のための機能改変について述べる (Figure 3)。この酵素をコードする遺伝子にランダム変異 (DNA の塩基配列の置換) を導入し、その変異遺伝子を大腸菌に導入した。この組換え大腸菌をナイルレッド色素を含む寒天培地上で培養して P(3HB) を蓄積させた。ナイルレッドは疎水性の物質と結合する性質があり、P(3HB) を多く蓄積している細胞ほど強く染色される。この染色度合いを指標として、P(3HB) の蓄積率 (乾燥菌体重量中に含まれるポリマー重量の割合として定義される) の高い変異体を選抜できる。この方法を用いて 10 万以上の変異体を選抜した結果、P(3HB) の蓄積率が乾燥菌体重量当り 0.1% から 4% まで増加する変異体を得られた。¹⁶⁾ さらに、複数の優良変異を組み合わせる事により、P(3HB) 蓄積率を 40% 程度にまで向上させることができた。¹⁷⁾ 現在では、変異のさらなる最適化により、P(3HB) の蓄積率は 70% 程度にまで向上している。¹⁸⁾ 本 PHA シンターゼを構成する 559 アミノ酸残基のうち、325 番目と 481 番目にそれぞれセリン(S)→スレオニン(T)、グルタミン(Q)→リジン(K)の変異を導入した ST/QK 変異体は、こうして得られた優良変異体の一つである。P(3HB) の蓄積が高いと言う事は、3HB モノマーの重合能力が高い事を示唆している。実際、筆者らは、合成基質を用いた反応速度解析により、ST/QK 変異体の 3HB-CoA と中鎖モノマーである 3-hydroxyoctanoyl-CoA の重合速度が、野生型酵素と比較してそれぞれ 18 倍、6 倍に増加していることを確認した。¹⁹⁾ したがって、ST/QK 変異体は重合活性が向上しているだけでなく、短鎖モノマーを主成分とする短鎖・中鎖共重合体の合成に適した基質特性を持っている事が分かった。さらに、最近筆者らの研究グループでは、この ST/QK 変異体が、通常細胞内では重合される事がないと考えられていた乳酸ユニットを重合できる活性を有する事を見出した。²⁰⁻²¹⁾ この特殊な活性を利用した乳酸ポリマーの生合成については、本誌掲載予定の別の総合論文を参照して頂きたい。吉瀬らは同様の方法を用いて、*Aeromonas caviae* 由来の PHA シンターゼの高活性変異体(N149S)を取得している。²²⁾

5. 植物による PHA 生産

さて、植物に話を戻そう。P(3HB) 生合成の出発物質であるアセチル CoA は、(おそらく) あらゆる生物に存在する非常に基本的な代謝中間体であるので、PhaA, PhaB, PhaC の三つの酵素が存在すれば、原理的にはどのような宿主でも P(3HB) が合成できると考えられる。植物への遺伝子導入は、アグロバクテリウム法が広く用いられている。アグロバクテリウムは植物に寄生して増殖する微生物であり、植物の核ゲノム DNA に遺伝子を挿入して、自分が栄養源として利用できるノパリンという物質を生産させる機能を持っている。この機能を借用し、アグロバクテリウムの遺伝子の一部を置き換える事で、意図した遺伝子を植物のゲノム中に組み込むことが出来る。

植物による P(3HB) 合成は、シロイヌナズナという植物を用いて Poirier らによって初めて報告された。²³⁾ シロイヌナズナはアブラナ科の草であり、小型で増殖が早いことから、植物研究のモデルとして広く用いられている。PhaB と PhaC の遺伝子を導入した組換えシロイヌナズナの抽出物のガスクロマトグラフィー分析により 3HB が検出され、電子顕微鏡観察により細胞内にグラニューールの存在が確認されたことから、P(3HB) の蓄積が確認された。植物の細胞質には、アセトアセチル CoA が存在するため、PhaA 遺伝子を導入しなくてもポリマーが合成される。P(3HB) 生産の宿主としては、同様のモデル系であるタバコなどに加え、²⁴⁻²⁵⁾ 商業的な生産を目指し、より大型でバイオマス生産能力の高い宿主による生産も試みられた。これまでに、菜種、²⁶⁾ サトウキビ²⁷⁾ などでの P(3HB) 生産が報告されている。

植物をはじめとする真核生物の細胞は、細胞内に細胞内小器官（オルガネラ）とよばれる膜で囲まれた構造を有している（細胞の中でオルガネラ以外の部分を細胞質と呼ぶ）。オルガネラには、呼吸を行うミトコンドリア、脂肪酸代謝などを行うペルオキシソームなどあり、さらに植物に特徴的なオルガネラとして、光合成を行う葉緑体がある。これらのオルガネラの内部では、細胞質とは異なる代謝経路が存在するため、PHA の生産性にも大きく影響する。

オルガネラ内での PHA 合成の最初の例は葉緑体で試みられた。²⁸⁾ 葉緑体は、細胞質よりも体積が大きく代謝も活発なため、PHA の生産性が高くなると期待された。葉緑体でポリマーを合成するには、葉緑体局在化シグナルを利用する。目的とする酵素遺伝子に、葉緑体局在化シグナルのアミノ酸配列をコードする DNA を付加すると、植物細胞内のトランスポ

1 ーターの働きにより、細胞質内で合成された酵素が葉緑体へと輸送される。この仕組みを
2 利用して、葉緑体内で PHA の合成酵素を発現させ、PHA を合成できる。Nawrath らはこの方
3 法を用いてシロイヌナズナの葉緑体に PHA を蓄積させ、蓄積率が高くなる事を示している。
4 ²⁸⁾ 葉緑体内でポリマーを合成する方法として、葉緑体形質転換と呼ばれる方法も知られて
5 いる。この方法は、植物のゲノム DNA とは別に、葉緑体自体が持っている DNA の中に目的
6 遺伝子を挿入する方法である。最近 Bohmert-Tatarev らは、この手法を用いてタバコの中
7 に PHA を非常に高蓄積させることができることを示している。²⁹⁾

8 6. 植物細胞内での変異酵素の機能

11 これまで植物を用いた PHA 研究のほとんどは、単純な経路で合成でき PHA の基本形であ
12 る P(3HB)を効率的に生産する事を目的とするものである。これに対し筆者らは、より優れ
13 た物性を示す短鎖・中鎖共重合体を植物で合成するための代謝経路を構築する事を目指し
14 ている。上で述べたように、短鎖・中鎖共重合体を合成するためには、特殊な基質特異性
15 を有する PHA シンターゼを発現させる必要がある。これらの PHA シンターゼは重合活性が
16 必ずしも高くないため、人工変異によって活性を高めた PHA シンターゼが非常に重要なツ
17 ールとなると期待できる。

18 しかし、大腸菌の系を使って得られた高活性変異体が、植物細胞内で高い活性を示すこ
19 とは自明ではない。酵素はタンパク質の一種であり、遺伝子にコードされたアミノ酸配列
20 の情報に基づいてアミノ酸が重合され、それが 3 次元的に折り畳まれて生体触媒としての
21 機能を発揮する。このタンパク質を折り畳む機能を担うタンパク質は、当然大腸菌と植物
22 では異なっているため、大腸菌と植物で全く同じ構造のタンパク質が作られるという保証
23 はない。また、細胞内で供給されるモノマーの量、温度やイオン強度などの細胞環境など
24 も大腸菌と植物では異なっている。これらの要因が高活性変異体の酵素活性に影響を与え
25 ることは十分考えられる。実際、*R. eutropha* に PHA シンターゼの高活性変異体を導入した
26 実験では、いくつかの変異体の活性が大腸菌とは異なることが示唆されている。³⁰⁾ そのた
27 め、人工変異酵素が植物細胞内で期待通りの機能を持つかどうかを調べる必要があった。

28 そこで筆者らは、*Aeromonas caviae* 由来の PHA シンターゼの高活性変異体 (N149S) を細
29 胞質で発現するように設計した遺伝子をシロイヌナズナに導入し、P(3HB)を合成すること
30 を試みた。実験は新井の方法を用いた。³¹⁾ この組換え株を分析したところ、高活性変異体

1 の導入株は、平均して野生型遺伝子導入株の 10 倍もの PHA を蓄積した。³²⁾ この結果より、
2 PHA シンターゼの高活性変異体は、植物細胞内でも高い活性を示すことが強く示唆された。
3 また、大腸菌で同じ変異体を発現させた場合は、ポリマー蓄積率が数%増えるのみである
4 ので、²²⁾ このような大きな効果が得られたのは驚くべきことであった。この結果は、微生物
5 と植物とで PHA 合成を制限する因子が異なっていることを示していた。すなわち、組換え
6 大腸菌の PHA 合成系では、ある程度以上 PHA シンターゼの活性が高くなると、モノマー
7 供給の方が律速になることが指摘されている。また、蓄積率がおおよそ 60%以上になると、
8 おそらく細胞内にポリマーを貯めるスペースが少なくなってくるために蓄積が制限される。
9 これに対して植物では、生産されるポリマーの量に対して細胞が非常に大きいため、体積
10 的な制限が無視できると考えられる。さらに、PHA シンターゼの高活性化により蓄積率が大幅
11 幅に向上することから、植物細胞内の PHA シンターゼの活性が十分でないことが推定でき
12 る。

13 続いて筆者らは、*Aeromonas caviae* 由来の PHA シンターゼよりも中鎖モノマーの重合能
14 力の高い ST/QK 変異体を用いて、同様にシロイヌナズナで P(3HB) を合成する実験を試みた。
15 この実験では、葉緑体局在化シグナルを用いて、葉緑体内に PHA シンターゼおよび PhaA、
16 PhaB が局在化するように遺伝子を設計した。この場合でも、ST/QK 変異体は、野生型 PHA
17 シンターゼと比較して約 7 倍の PHA を蓄積した (Table 2)。³³⁾ このことから、ST/QK 変異体が
18 植物の葉緑体内で有効に機能することが確認できた。

19 20 7. 植物における短鎖・中鎖共重合体の合成

21
22 これまでの結果により、幅広い基質特異性を持つ PHA シンターゼの優良変異体が植物で
23 機能する事が明らかとなったため、これを用いた短鎖・中鎖共重合体の合成を試みた。し
24 かし、植物での共重合 PHA の生産においては、中鎖モノマーをいかに供給するかが難しい
25 問題である。微生物で共重合体を合成する場合、脂質や脂肪酸を炭素源として培養し、脂
26 肪酸分解の中間体からモノマー合成することができる。一方、植物による PHA 生産の場合
27 は、二酸化炭素を唯一の炭素源とするため、目的とするポリマー合成に必要な分子はすべ
28 て植物細胞の中で合成しなければならない。

29 筆者らがまず最初に着目したのは、ペルオキシソームにおける PHA 生産である。ペルオ
30 キソームでは脂肪酸の分解が行われており、微生物を脂肪酸を炭素源とした際と類似の

代謝経路が存在する (Figure 4)。例えば、種子が発芽する際に、種子に蓄積された脂質を成長に利用する際にペルオキシソームが活性化される。過去の研究により、ペルオキシソームに PHA シンターゼを局在化させると中鎖 PHA の合成が可能であることは示されていた。³⁴⁾ また、*Aeromonas caviae* 由来の PHA シンターゼを導入すると炭素数が 4 と 6 のモノマーを含む共重合体が合成できる事が示されており、³¹⁾ より幅広い基質特異性を有する PHA シンターゼを用いれば、炭素数が 8 以上の中鎖モノマーを含む短鎖・中鎖共重合体の合成が可能であると予想された。そこで筆者らは、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の PHA シンターゼと ST/QK 変異体遺伝子にペルオキシソーム局在化シグナルを付加してシロイヌナズナに導入した。得られた組換え株は、予想通り炭素数が 4~8 のモノマーを含む短鎖・中鎖共重合体を合成した (Table 2)。³⁵⁾ しかし、ペルオキシソームにおける PHA 合成では、野生型 PHA シンターゼと ST/QK 変異体との間で、蓄積されたポリマーの蓄積率とモノマー組成に有意な差が見られなかった。PHA シンターゼの活性が上昇していると予想されるにも関わらず、ポリマーの蓄積に明確な効果が見られなかったことから、ペルオキシソームでの PHA 合成においては、PHA シンターゼの活性以外にモノマーの供給またはオルガネラの物理的サイズなどのファクターによって、ポリマー蓄積が制限されていると推定された。

8. 変異型 FabH を利用した中鎖モノマー供給

そこで筆者らは、脂肪酸の分解系ではなく、脂肪酸合成系の代謝中間体を利用する方法を検討した。植物では、脂肪酸合成系が葉緑体内に存在するが、葉緑体のほうがペルオキシソームよりも体積が大きいと期待された。脂肪酸合成は、脂肪酸分解の逆反応に近い形式で脂肪酸を合成する (Figure 4)。この 2 つの経路の違いは、反応の中間体が CoA 体ではなくアシルキャリアプロテイン (ACP) 体である事である。ACP は CoA と一部同じ構造を有し、カルボキシル基とチオエステル結合を作る点では同じである。しかし、PHA シンターゼは、CoA 体の基質のみを重合し、ACP 体に対しては全く活性を持たないため、脂肪酸合成系の中間体から PHA を合成するためには、ACP 体を CoA 体に変換する必要がある。

筆者らは、脂肪酸合成系の酵素の一つである FabH の変異体を利用して、植物細胞内でこの変換を行う事を試みた。FabH は、アセチル CoA をアセチル ACP に変換する ACP/CoA 転移反応を触媒する活性を有することが知られている。この反応を利用して、脂肪酸合成系の

中間体の ACP 体を CoA 体に変換できれば、脂肪酸合成系からの PHA 合成が可能になると考えられる。過去の研究により、大腸菌で FabH を過剰に発現させると P(3HB) が合成されることが示されている。³⁶⁾ このことから、FabH は炭素数が 4 の基質に対する ACP/CoA 変換活性があると推定されていた。しかし、中鎖モノマーは供給できなかった。そこで野村らは、人工変異により FabH の基質特異性を改変することを検討した。FabH はそのタンパク質立体構造から、87 番目のアミノ酸残基が基質結合ポケット付近に存在することが示されていた。³⁷⁾ この部位に変異を導入した変異型 FabH を大腸菌に導入したところ、少量であるが中鎖モノマーを含む PHA が合成することができた。³⁸⁾ このことから、変異型 FabH は脂肪酸合成系の中間体から中鎖モノマーを供給できることが示唆された (Figure 4 には、FabH が触媒する推定上の反応を示している)。筆者らは、このシステムを植物に適応することを試みた。変異型 FabH、STQK 変異体、PhaA、PhaB の遺伝子に葉緑体局在化シグナルを付加し、シロイヌナズナに導入した。この遺伝子組換え体からポリマーを抽出して分析したところ、P(3HB) を蓄積している事は確認できたが、植物体が小さく、そこから得られるポリマーも少量のため、第二モノマー成分の分析は不可能であった。そこで、この組換え株の後代 (子孫) を作成し、遺伝的に均一な組換え植物体を多数栽培して十分量のポリマーを抽出した。このポリマーを分析したところ、このポリマーが炭素数 6 から 14 の中鎖ユニットを含む短鎖・中鎖共重合体であることが分かった (Table 2)。³³⁾ また、FabH を導入しないコントロールからも、C6 モノマー (3HHx) が検出されたことから、植物細胞内に 3HHx-CoA の弱い供給経路が存在することが示唆された。さらに、このポリマーの蓄積率は、ペルオキシソームで蓄積させた場合と比較して 10 倍程度高かった。これらのことから、葉緑体内はポリマー蓄積率の点では、短鎖・中鎖共重合体の合成の場として適していた。しかし、実用に適した物性を示すためには 5 モル%程度の中鎖ユニットを含む必要があり、FabH による中鎖モノマーの供給能力が十分であるとは言えなかった。変異型 FabH の導入によって 3HB ユニットの蓄積量が倍増していることから、FabH が主に短鎖モノマーの供給を増加させたと考えられる。今後 FabH のさらなる機能改変により中鎖モノマーの供給量を増加させることが必要であると考えられる。

9. おわりに

植物は、大気中の二酸化炭素と太陽エネルギーを利用して有機物質を合成できる非常に

優れたシステムを有している。この能力を自在にコントロールして物質生産を行う事は、夢の技術であると言える。一方で、本報でも紹介したように、二酸化炭素を唯一の出発物質として、目的の構造を有するポリマーを合成することは容易ではない。ここで紹介した共重合体の生合成系は、生産性と組成制御の両面から、物質生産としてはまだ発展途上の技術である。植物における PHA 生産は、蓄積率十数%が採算の一つの目安と言われているが、植物による物質生産のコストは、宿主、気候条件、収穫と抽出にかかるコストなど様々な因子の影響を受けるため、見積もりは難しい。10%以上の蓄積率はモデル植物では達成された例があるが、実用植物では未だ達成されていない。加えて、組成制御についても、フィルムへの加工に適する 90%程度の 3HB 分率を達成した例はない。しかし、大腸菌の系を利用して開発した様々な有用遺伝子資源が植物に応用可能であることは重要な知見であり、今後、植物の代謝経路も視野に入れた新たな代謝経路を開発する事により、植物でより多様なポリマーの効率的合成が可能になると期待できる。

リファレンス

1. Auras, R., Harte, B. and Selke, S.: An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol. Biosci.*, 4, 835-864 (2004).
2. Lu, W.H., Ness, J.E., Xie, W.C., Zhang, X.Y., Minshull, J. and Gross, R.A.: Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 15451-15455 (2010).
3. Chen, G.Q.: A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 2434-2446 (2009).
4. Doi, Y.: *Microbial Polyesters*, VHC Publishers: New York, (1990).
5. Sudesh, K. and Iwata, T.: Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *Clean-Soil Air Water*, 36, 433-442 (2008).
6. Roy, I., Akaraonye, E. and Keshavarz, T.: Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biot.*, 85, 732-743 (2010).
7. Iwata, T., Aoyagi, Y., Tanaka, T., Fujita, M., Takeuchi, A., Suzuki, Y. and Uesugi, K.: Microbeam X-ray diffraction and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers with two kinds of molecular conformations. *Macromolecules*, 39, 5789-5795 (2006).
8. Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. and Bossier, P.: Short-chain fatty acids and poly-beta-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnol. Adv.*, 27, 680-685 (2009).

9. Matsusaki, H., Abe, H. and Doi, Y.: Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, 1, 17-22 (2000).
10. Fukui, T., Mifune, J. and Nakamura, S.: Engineering of pha operon on *Cupriavidus necator* chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. *Polym. Degrad. Stab.*, 95, 1305-1312 (2010).
11. Rehm, B.H.A.: Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.*, 376, 15-33 (2003).
12. Fukui, T. and Doi, Y.: Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.*, 179, 4821-4830 (1997).
13. Matsusaki, H., Abe, H., Taguchi, K., Fukui, T. and Doi, Y.: Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 401-409 (2000).
14. Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakamura, H. and Doi, Y.: Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system. *FEMS Microbiol. Lett.*, 198, 65-71 (2001).
15. Nomura, C.T. and Taguchi, S.: PHA synthase engineering toward superbiocatalysts for custom-made biopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 969-979 (2007).
16. Takase, K., Taguchi, S. and Doi, Y.: Enhanced synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* by means of error-prone PCR mutagenesis, saturation mutagenesis, and *in vitro* recombination of the type II polyhydroxyalkanoate synthase gene. *J. Biochem.*, 133, 139-145 (2003).
17. Matsumoto, K., Takase, K., Aoki, E., Doi, Y. and Taguchi, S.: Synergistic effects of Glu130Asp substitution in the type II polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: Enhancement of PHA production and alteration of polymer molecular weight. *Biomacromolecules*, 6, 99-104 (2005).
18. Shozui, F., Matsumoto, K., Sasaki, T. and Taguchi, S.: Engineering of polyhydroxyalkanoate synthase by Ser477X/Gln481X saturation mutagenesis for efficient production of 3-hydroxybutyrate-based copolyesters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 1117-1124 (2009).
19. Matsumoto, K., Shozui, F., Satoh, Y., Tajima, K., Munekata, M. and Taguchi, S.: Kinetic analysis of engineered polyhydroxyalkanoate synthases with broad substrate

- specificity. Polym. J., 41, 237-240 (2009).
20. Matsumoto, K. and Taguchi, S.: Enzymatic and whole-cell synthesis of lactate-containing polyesters: toward the complete biological production of polylactate. Appl. Microbiol. Biotechnol., 85, 921-932 (2010).
21. Taguchi, S., Yamada, M., Matsumoto, K., Tajima, K., Satoh, Y., Munekata, M., Ohno, K., Kohda, K., Shimamura, T., Kambe, H. and Obata, S.: A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105, 17323-17327 (2008).
22. Kichise, T., Taguchi, S. and Doi, Y.: Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by *in vitro* evolution of *Aeromonas caviae* PHA synthase. Appl. Environ. Microbiol., 68, 2411-2419 (2002).
23. Poirier, Y., Dennis, D., Klomparens, K. and Somerville, C.: Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. Science, 256, 520-523 (1992).
24. Nakashita, H., Arai, Y., Yoshioka, K., Fukui, T., Doi, Y., Usami, R., Horikoshi, K. and Yamaguchi, I.: Production of biodegradable polyester by a transgenic tobacco. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63, 870-874 (1999).
25. Matsumoto, K., Morimoto, K., Gohda, A., Shimada, H. and Taguchi, S.: Improved polyhydroxybutyrate (PHB) production in transgenic tobacco by enhancing translation efficiency of bacterial PHB biosynthetic genes. J. Biosci. Bioeng., (2010).
26. Slater, S., Mitsky, T.A., Houmiel, K.L., Hao, M., Reiser, S.E., Taylor, N.B., Tran, M., Valentin, H.E., Rodriguez, D.J., Stone, D.A., Padgett, S.R., Kishore, G. and Gruys, K.J.: Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. Nature Biotechnology, 17, 1011-1016 (1999).
27. Petrasovits, L.A., Purnell, M.P., Nielsen, L.K. and Brumbley, S.M.: Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. Plant Biotech. J., 5, 162-172 (2007).
28. Nawrath, C., Poirier, Y. and Somerville, C.: Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 12760-12764 (1994).
29. Bohmert-Tatarev, K., McAvoy, S., Daughtry, S., Peoples, O.P. and Snell, K.D.: High levels of bioplastic are produced in fertile transplastomic tobacco plants engineered with a synthetic operon for production of polyhydroxybutyrate. Plant Physiol., (2011).
30. Tsuge, T., Yamamoto, T., Yano, K., Abe, H., Doi, Y. and Taguchi, S.: Evaluating the ability of polyhydroxyalkanoate synthase mutants to produce P(3HB-co-3HA) from soybean oil. Macromol. Biosci., 9, 71-78 (2009).

31. Arai, Y., Nakashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Shimizu, T., Yasuda, M., Doi, Y. and Yamaguchi, I.: Synthesis of a novel class of polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis* peroxisomes, and their use in monitoring short-chain-length intermediates of β -oxidation. *Plant Cell Physiol.*, 43, 555-562 (2002).
32. Matsumoto, K., Nagao, R., Murata, T., Arai, Y., Kichise, T., Nakashita, H., Taguchi, S., Shimada, H. and Doi, Y.: Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) production in the transgenic *Arabidopsis thaliana* by the *in vitro* evolved highly active mutants of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase from *Aeromonas caviae*. *Biomacromolecules*, 6, 2126-2130 (2005).
33. Matsumoto, K., Murata, T., Nagao, R., Nomura, C.T., Arai, S., Arai, Y., Takase, K., Nakashita, H., Taguchi, S. and Shimada, H.: Production of short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer in the plastid of *Arabidopsis thaliana* using an engineered 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *Biomacromolecules*, 10, 686-690 (2009).
34. Mittendorf, V.V., Robertson, E.J., Leech, R.M., Krüger, N., Steinbüchel, A. and Poirier, Y.: Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 13397-13402 (1998).
35. Matsumoto, K., Arai, Y., Nagao, R., Murata, T., Takase, K., Nakashita, H., Taguchi, S., Shimada, H. and Doi, Y.: Synthesis of short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymers in peroxisome of the transgenic *Arabidopsis thaliana* harboring the PHA synthase gene from *Pseudomonas* sp 61-3. *J. Polym. Environ.*, 14, 369-374 (2006).
36. Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T. and Doi, Y.: Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA- ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. *Biotechnol. Lett.*, 21, 579-584 (1999).
37. Scarsdale, J.N., Kazanina, G., He, X., Reynolds, K.A. and Wright, H.T.: Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *J. Biol. Chem.*, 276, 20516-20522 (2001).
38. Nomura, C.T., Taguchi, K., Gan, Z., Kuwabara, K., Tanaka, T., Takase, K. and Doi, Y.: Expression of 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (*fabG*) genes enhances production of polyhydroxyalkanoate copolymer from glucose in recombinant *Escherichia coli* JM109. *Appl Environ Microbiol*, 71, 4297-4306 (2005).

1

2

3

[Comprehensive Papers]

Production of polyhydroxyalkanoate copolymers in transgenic plants expressing engineered enzymes

Ken'ichiro Matsumoto

Division of Biotechnology and Macromolecular Chemistry, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, (N13-W8, Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan)

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial polyesters that can be an alternative to petroleum-derived plastics. Transgenic plants harboring PHA biosynthetic genes are capable of producing PHAs directly from atmospheric CO₂. The properties of PHAs greatly depend on their monomer composition. Therefore, fine regulation of monomer composition is essential to the production of PHAs with the desired properties. In order to synthesize PHA copolymer in plants, the supply of monomers and the expression of PHA synthase (polymerizing enzyme) having a broad polymerizing capacity are required. We found that the engineered enzymes with enhanced activity and/or altered substrate specificity are functional in plant cells. This finding enabled us to produce PHA copolymer in

transgenic plants.

KEY WORDS Polyhydroxyalkanoate / PHA / PHA synthase / Plant factory / engineered enzyme / Biomass / Bio-based plastic

Table 1. Properties of PHAs with various monomer compositions

Monomer Composition	Melting Temperature (°C)	Elongation break (%) to
P(3HB)	176	5
P(3HB- <i>co</i> -20 mol% 3HV)	145	50
P(3HB- <i>co</i> -10 mol% 3HHx)	127	400
P(3HB- <i>co</i> -6 mol%3HA)	133	680

Table 2. Polymer content and monomer composition of SCL/MCL PHA in transgenic Arabidopsis

PHA synthase ^a	Targeting of enzymes	PHA content (µg/g cdw) ^b	Monomer composition (mol%)	
			SCL (C ₄ , C ₅)	MCL
		from <i>Aeromonas caviae</i>		
wild-type	cytosol	150 (720)	100	-
N149S	cytosol	1500 (4100)	100	-
from <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3				
wild-type	peroxisome	48 (230)	89	11 (C ₆ , C ₈)
ST/QK mutant	peroxisome	44 (180)	88	12 (C ₆ , C ₈)
wild-type	plastid	30 (120)	100	-
ST/QK mutant	plastid	210 (1800)	99.8	0.2 (C ₆)
ST/QK mutant with FabH	plastid	420 (1400)	99.9	0.1 (C ₆ -C ₁₄)

^aPHA synthase gene from *Aeromonas caviae* was introduced with the *phaB* gene. The

1 plastid-targeted PHA synthase gene from *Pseudomonas* sp. 61-3 was introduced with
2 *phaAB* genes. ^bPHA content is shown as average of 15 to 17 samples. Data in
3 parenthesis is the highest value.

4
5 Figure captions

6
7
8 **Figure 1.** Comparison of processes for bio-based plastics. The PLA production is shown
9 as an example of 3-step production. Bacterial PHA is produced via 2 steps. The
10 transgenic plants harboring PHA biosynthetic genes are capable of producing PHAs
11 directly from CO₂ (1 step production).

Figure 2. Biosynthetic pathways for short-chain-length (SCL) and medium-chain-length (MCL) PHAs. 3HB-CoA is synthesized from acetyl-CoA via three reactions, while MCL 3HA-CoAs are supplied from fatty acid metabolism. Substrate specificity of PHA synthase (PhaC) is a key to determine the monomer composition of PHA. PHA synthase (I), class I; PHA synthase (II), class II. SCL, MCL and SCL/MCL PHAs have drastically different properties.

Figure 3. Mutagenesis and high-throughput screening of PHA synthase acquiring enhanced polymerizing activity toward 3HB monomer

Figure 4. PHA biosynthetic pathways via fatty acid biosynthesis and β -oxidation pathways. The engineered FabH is proposed to supply CoA form of intermediate from fatty acid biosynthesis pathway.

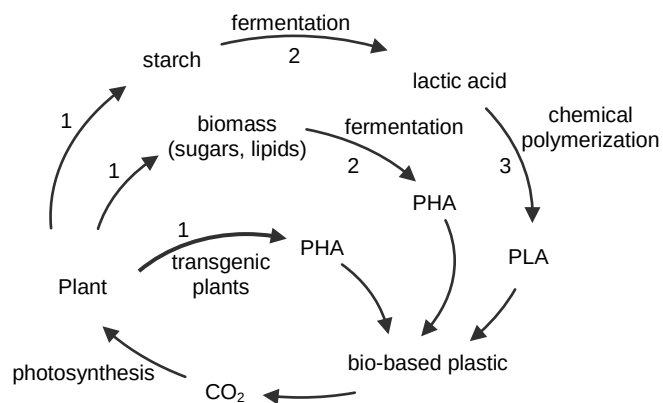


Figure 1

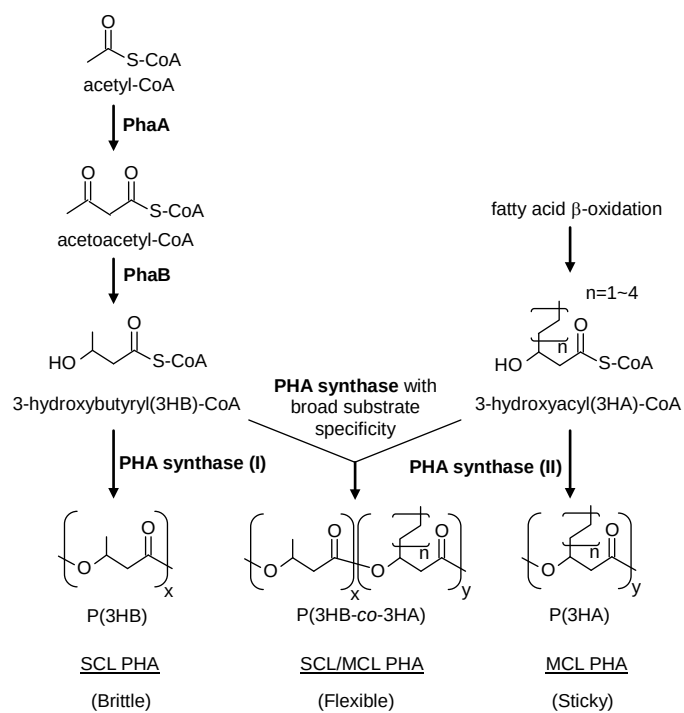


Figure 2

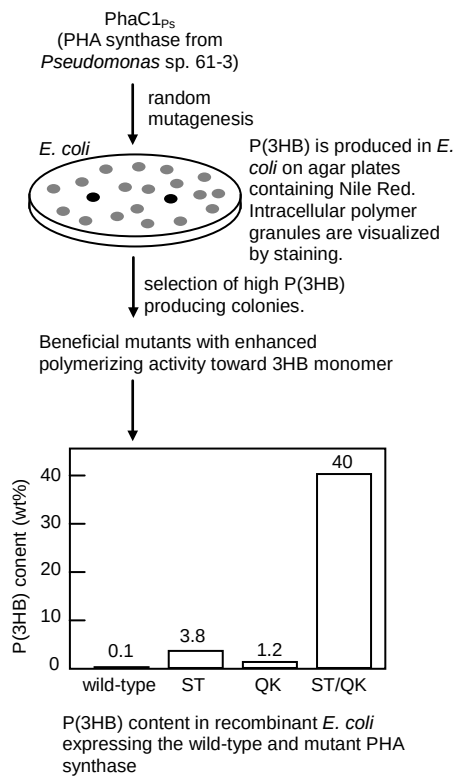


Figure 3

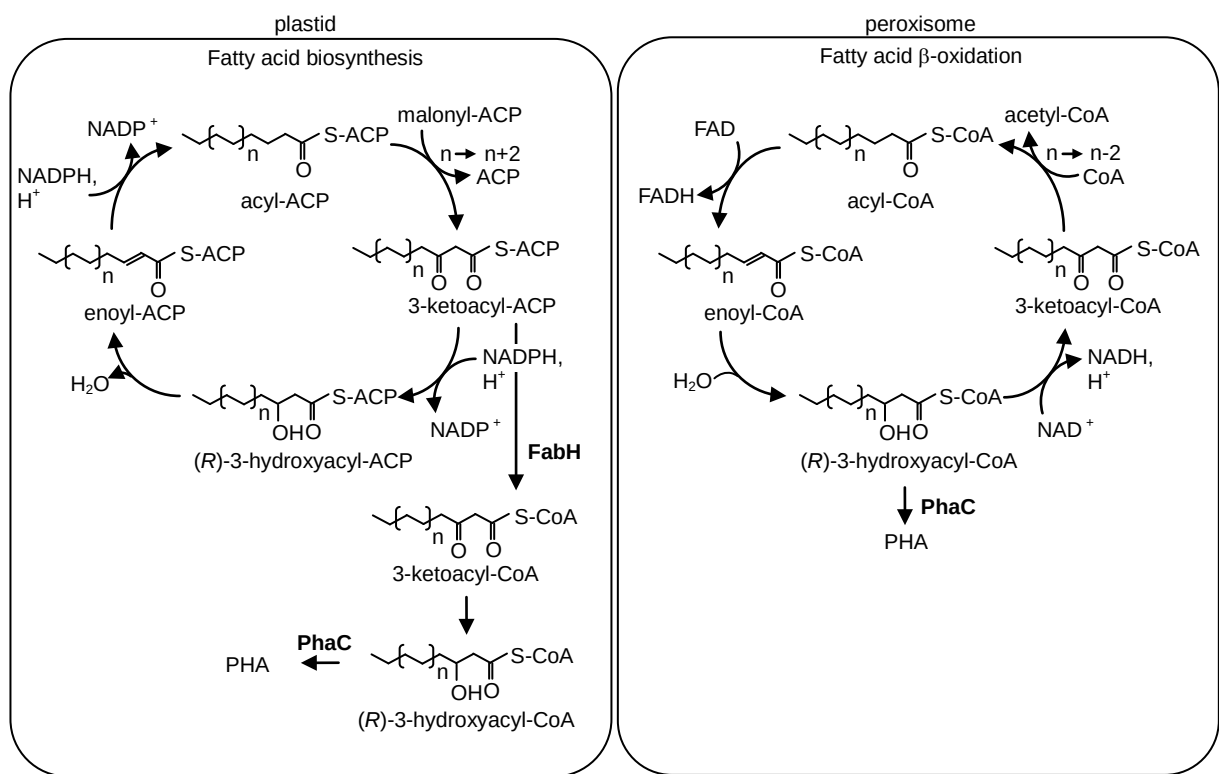


Figure 4