

研究成果報告書

所属機関	職名	氏名
熊本県立大学 環境共生学部	教授	松崎 弘美

研究テーマ

高性能バイオポリマーを生合成する微生物の分子育種

研究報告

1. 研究の背景と目的

プラスチックは軽量かつ丈夫でコストも安いことから、私達の快適な生活を支えている。しかし、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。特にプラスチックの海洋汚染は深刻であり、中でも直径5 mm以下のマイクロプラスチックは海洋生物が餌として間違えて食べてしまい、海の生態系への影響が危惧されている。また、プラスチック製造に使用された化学物質が食物連鎖の高次捕食者へ移行・蓄積される可能性があり、食の安全性も脅かされている。2018年、EUがストローやスプーン、フォークなど一部の使い捨てプラスチック製品の使用禁止を提案し、日本でも食品容器・包装を生分解性プラスチックに変更する方針を表明した企業も増えてきた。そこで、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に関する研究は極めて重要かつ急務であり、世界的関心も非常に高い。

石油由来の生分解性プラスチックもあるが、再生可能資源（バイオマス）由来のものが化石資源の消費量を抑え、二酸化炭素の排出量を増やさないため、地球環境に優しい。バイオマスを利用できる微生物が菌体内に合成・蓄積するバイオポリマー、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。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ではない。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、使用目的に応じた実用的な高性能PHAの創製、そして、その高性能PHAを環境に優しい方法で効率的に生産すること（低コスト化生産）が重要となる。

PHA 合成細菌は PHA のモノマー構造により 2 つに大別され、一つは炭素数 4~5 の短鎖長（short-chain-length; scl）の(*R*)-3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）をモノマー単位とする scl-PHA（代表的なものはポリ-3-ヒドロキシブタン酸 [P(3HB)]）と炭素数 6~14 の中鎖長（medium-chain-length; mcl）の 3HA からなる mcl-PHA である。scl-PHA は硬くて脆く、mcl-PHA は非晶質性である。PHA の硬さや丈夫さ、融点やガラス転移温度などの機械的・物理的性質は PHA のモノマー組成によるところが大きく、3HB と中鎖長 3HA からなる共重合体 P(3HB-co-3HA) が柔軟性と丈夫さを併せ持つ実用的な PHA といえる。一方、一般に PHA は不透明であるため、透明性を有する PHA の合成も求められる。ポリ乳酸（PLA）は乳酸の化学重合により合成される透明なプラスチックであるが、乳酸（LA）ユニットを含む LA ベースポリマー（LA を含む PHA）は透明性を有する。

このような高性能PHAを合成するためには、短鎖長から中鎖長の3HAユニットやLAユニットを基質として利用できる低基質特異性PHA重合酵素を用いて代謝制御を行うことである。それにより、モノマー組成が異なるさまざまな高性能PHAを合成することができる。本研究では、野生株由来PHAの物性面の欠点を改良して実用的な高性能のPHAを生合成する微生物の分子育種を行うことを目的とした。

2. 研究成果および考察

これまでに、*Pseudomonas* sp. 61-3のセルフクローニング系や大腸菌を宿主とした遺伝子組換え株において、グルコースを唯一の炭素源としてP(94% 3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの合成に成功しており、このポリエステルは低密度ポリエチレン（LDPE）と同等な性質を示す（Matsusaki H. et al. Biomacromolecules 2000; Hokamura et al. J. Biosci. Bioeng. 2015）。また、大腸菌を宿主としたLAベースポリマーの合成にも成功している（Goto et al. J. Gen. Appl. Microbiol. 2019; Goto et al. J. Biosci. Bioeng. 2019）。それらの知見より、本研究では*Cupriavidus necator*（旧名*Ralstonia eutropha*）を宿主として、P(3HB-co-3HA)およびLAベースポリマーのような高性能バイオポリマーを生合成することを目指した。水素細菌*C. necator*は二酸化炭素を利用できるため、それをプラットホームとする微生物育種を行うことにより、高性能な生分解性バイオポリマーを二酸化炭素を原料として

3. 将来展望

本研究において、*C. necator*の組換え株を作製し、糖を唯一の炭素源として培養を行った結果、P(3HB-co-3HA) およびLAベースポリマーP(LA-co-3HB)の生合成に成功した。今後の課題は、P(3HB-co-3HA)の合成におけるPHA蓄積率を向上させること、LAベースポリマーのLA分率を高めることである。そのため、導入遺伝子の発現量および発現したタンパク質の状態（活性型か不活性型か）を調べ、適切なコピー数のプラスミドベクター、発現強度を考慮したプロモーター、コドン最適化などを検討し、*C. necator*の分子育種をさらに進める予定である。将来的には温室効果ガスの二酸化炭素を炭素源として利用した実用的かつ高性能な生分解性プラスチック（バイオポリマー）の生合成を目指す。

4. 研究発表

- 1) 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. 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. 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, 2020 年) (開催中止)
- 2) 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. 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. 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), 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, 2020 年)
- 3) 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. 組換え微生物による高性能バイオポリエステル生合成. 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 (仙台市) Zoom によるリモート開催, 3 月 18 日-3 月 21 日, 2021 年)

表 3 *C. necator* H16C1STQK 組換え株による LA ベースポリマーの合成 (二段培養)

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.