

研究終了報告書

「環境調和型材料の低コスト生産を目指した末端構造設計」

研究期間：2022 年 10 月～2023 年 3 月

研究者：百武 真奈美

1. 研究のねらい

糖や植物油といった再生可能なバイオマスを原料に、自然界の一部の微生物はエネルギー貯蔵物質としてポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を合成し、細胞内に蓄積する。PHA は生分解性ポリエステルであり、生体適合性や海洋分解性といった特徴も有することから、環境調和型材料として広範な分野での利用が期待されている。

PHA の生合成過程においてモノマーからポリマーへの重合過程を触媒するのが重合酵素である。PHA の生合成時にアルコールが存在すると、重合酵素は連鎖移動反応やアルコリススといった反応を触媒し、分子鎖のカルボキシ末端にアルコールが付加されたきわめて低分子量のエステル重合体を合成する。その両末端はそれぞれヒドロキシ基と、カルボキシ基にアルコールが付加された構造となっている。アルコールがヒドロキシ基に加え他にも官能基を有する場合、低分子量体は両末端に官能基を有するためマクロモノマーとして利用できるようになり、これを反応点とした新たな環境調和型材料の創出に利用できる。しかしながら、この手法における材料合成の課題としては、マクロモノマー自体の高性能化と、化石資源由来プラスチックと競合できるような低コスト化があげられる。

本研究では、これらの課題の解決を目指し、分子鎖末端への付加に適する構造としてフェノール基に着目した。フェノール基の末端付加の効果としては、芳香環の導入による材料物性の向上と、フェノール基を介した反応によって低コストな材料回収法確立の足掛かりとなることが期待できる。しかしながら既存の生産系ではこの構造を末端に有する低分子量PHAの生産は実現できていない。したがって本研究では、まず、PHAの分子鎖末端にアルコールを付加する反応であるアルコリススに関与する酵素に着目し、末端にフェノール基を有する低分子量PHAを生産できる重合酵素の創製を第一の目的とした。そして、それを用いて目的構造の低分子量体を合成し、新たな回収法を試みることで、環境調和型材料の低コスト化に寄与すること、および最終的に合成される材料の評価を行うことを目指した。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、低分子量 PHA の末端構造としてフェノール基に着目したが、これを末端に有する低分子量体の生産はこれまで達成されていない。したがってまず、末端にフェノール基を有する低分子量PHAを生産可能な重合酵素の創製を試みた。具体的には、芳香環をPHA 末端に導入できることが分かっているバチルス属細菌由来の重合酵素 PhaRC に着目し、遺伝子上にランダムな変異を導入することで酵素改変を行い、多段階のスクリーニングを実施することで有用な改変酵素の選抜を試みた。スクリーニング方法としては、プレート上のカラーセレクションにより活性のある酵素のみを選抜し、続く HPLC を用いたスクリーニングにより芳香環を含むアルコールを用いたアルコリスス活性が高まった酵素を選抜した。こ

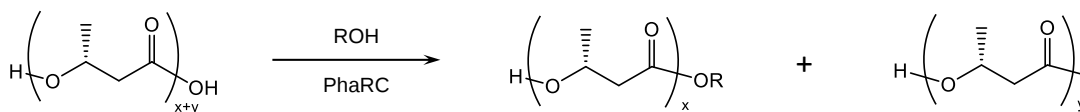


これらの手法により、多数のランダム変異体から有望な変異体を絞り込んだ。その後スクリーニングの最終段階では、フラスコスケールの培養を行い、生産される PHA について詳細な分析を行った。その結果、作製した変異酵素の一つが目的の末端構造を有する低分子量体を生産可能であることを確認した。この変異酵素では芳香環を有するアルコールを用いたアルコリスの効率が野生型酵素よりも高まっており、さらに、ターゲットであるフェノール基を有するアルコールを用いたアルコリスも可能であった。取得した変異酵素について遺伝子解読を行ったところ複数の変異が導入されており、個々のアミノ酸変異について部位特異的に変異導入した酵素を作製し各変異による影響を調査した結果、1 つの変異が目的物の生産実現に重要であったことが分かった。すなわち、この変異部位が PhaRC によるアルコリスにおいて重要なアミノ酸部位であったと言える。作製した点変異酵素によって合成される低分子量体について構造解析を行ったところ、3-ヒドロキシアルカン酸からなる繰り返し構造の末端にフェノール基含有アルコールが付加されていることを確認した。なお、野生型酵素を用いた場合には、同様な条件下で培養を行っても目的物の生産は確認されなかった。このように本研究では、第一の目的であるフェノール基を分子鎖末端に有する低分子量 PHA の生産を実現できる改変酵素の創製を達成し、また、関与するアミノ酸部位を特定した。

(2) 詳細

研究テーマ A「フェノール基を末端に有する低分子量 PHA を生産可能な改変酵素の創製」

分子鎖末端にフェノール基を有する低分子量体の生産実現に向け、まずフェノール基含有アルコールを分子鎖末端に付加可能な重合酵素の創製を試みた。重合酵素の特性は由来する微生物の種類によって大きく異なることが報告されており、PHA の生産性に関しても、重合酵素によって異なることが既に分かっている。本研究では、バチルス属細菌由来の重合酵素 PhaRC に着目し、フェノール基を末端に有する低分子量 PHA の生産実現を目指した。PhaRC は PHA 重合能に加え、他の多くの重合酵素とは異なりアルコリス能を有しており、分子鎖末端にアルコールが付加された PHA を高効率で生産することができる(図)。これまでの研究において PhaRC は芳香環を有するアルコールもアルコリスに利用できることが分かっており、末端に芳香環を有する PHA を生産できる。しかしながら野生型の PhaRC を用いた場合には、より嵩高いフェノール基を含有するアルコールを供給しても低分子量体は生産されず、本研究で着目しているフェノール基を分子鎖末端に有する構造の生産は実現できていなかった。したがってフェノール基を末端に有する低分子量体の生産実現に向けて、まず PhaRC 変異体の作製とそのスクリーニングを行うことで、目的に適う酵素の取得を試みた。



図： PhaRC によるアルコリス

変異酵素の作製に関して、PhaRC の立体構造は未解明であることや、構造に関する知見のある他の微生物由来の重合酵素との相同性があまり高くないことから、変異導入は部位を限定せず重合酵素遺伝子上にランダムに行うこととした。スクリーニングはプレート上でのカラーセレクション、HPLC 分析による大まかな選抜、個別のフラスコ培養によるフェノール基の末端導入確認、という 3 段階に分けて実施した。低分子量 PHA の生産には、PhaRC による PHA 重合能とアルコリス能の両方が重要となるため、まず、カラーセレクションによって PHA 重合能を欠損または著しく低下した変異体を排除した。次いで、HPLC によるスクリーニングは、研究者が以前に構築した分析系をベースに改変を加えて行い、芳香環を有するアルコールを用いた PHA のアルコリス効率が生産型酵素に比べて高まった改変型 PhaRC を選抜した。この HPLC 分析では、細胞内に蓄積された PHA を細胞ごとモノマー化し、モノマー由来成分と末端構造由来成分の強度を比較することでアルコリス効率の変化を判断した。個々の変異体によって合成される PHA の末端構造を解析するには、有機溶媒を用いた抽出、精製ののち、1 サンプル毎に数十分かかる分析を行う必要があり非常に手間と時間がかかるが、これらの実験系の利用により多数のランダム変異体を効率的に分析することができた。

続いて、選抜した変異体について、フラスコスケールでの個別の培養を行い、生産される PHA の詳細な分析を行った。先の HPLC 分析系は多数の変異体を簡便に処理、分析する事に長けるが、精度の点ではやや劣る部分があるため、フラスコスケールでの実験を最終的なスクリーニングと位置付けた。まず、HPLC スクリーニングにて取得した変異酵素から、芳香環を有するアルコールを用いたアルコリス効率が野生型酵素より高まったものを選抜した。次いで、ターゲットであるフェノール基を有するアルコールを供給して合成される PHA の構造について核磁気共鳴装置を用いて解析した。その結果、変異体の 1 つが合成した PHA では、その分子鎖末端にこのアルコールが付加されていることを確認した。ここから、この変異体ではフェノール基含有アルコールを用いたアルコリスが可能であることが分かった。先行研究を参考に、この変異体を用いてきわめて分子量の低いエステル重合体の生産を試み、先と同様のフェノール基含有アルコールを供給したところ、末端にフェノール基を有する低分子量体を細胞外に生産できることが分かった。

研究テーマ B「取得した変異酵素の解析」

先のテーマ A にて取得した酵素に導入された変異について解析を行った。本研究の手法で得られる変異体には、ランダムに複数の変異が導入されている。したがってここでは、どの変異が本成果に重要であったか特定することを目指した。この変異は PhaRC によるアルコリスに関与しており、部位特定は PHA の生合成における最終段階を担う重合酵素に関する知見の獲得としても有益である。

遺伝子解読を行ったところ、取得した変異酵素では遺伝子上の 5 つの塩基に置換が生じており、そのうちの 2 つはアミノ酸配列にも変異を与えるもので、他はサイレントな変異であ

った。導入された 2 つのアミノ酸変異のうちいずれがフェノール末端を用いたアルコリスに重要であったかを明らかにするため、変異部位を含むプライマーを用いた PCR 法にて PhaRC に各変異を 1 つずつ部位特異的に導入した点変異酵素を作製した。それぞれの酵素を用いてフラスコスケールでの培養を行ったところ、一方の点変異酵素においてフェノール基を末端に有する低分子量PHAの生産を確認でき、この変異が目的物の生産に重要であることが分かった。この変異部位が PhaRC のアルコリスに関与するアミノ酸部位であるといえる。なお、野生型酵素では、同様な条件にて培養を行ってもフェノール基を末端に有する低分子量体は生産できていない。作成した点変異酵素を用いて、先ほどと同様に先行研究を参考にきわめて分子量の低いエステル重合体の生産を試みたところ、分子鎖末端にフェノール基を有する低分子量体が細胞外に生産されることを確認した。以上の通り、PhaRC をベースとした酵素改変により、本研究で着目した構造を末端に有する低分子量体を生産可能な酵素を創製することができた。

3. 今後の展開

今後の展開としてはまず、取得した改変酵素をベースにさらに改変を行い、目的構造の低分子量体をより高効率で生産することを目指す。本研究で取得した酵素は、末端にフェノール基を有する低分子量 PHA の生産を初めて実現したが、実用化を目指すにあたっては生産性を高めることが必要である。その後、フェノール基を介した反応により低分子量体同士を結合させ、分子量を増大させることにより、析出による新たな回収法の実現を試みる。また、フェノール基を介して反応させた多量化物をマクロモノマーとして高分子材料を合成、物性測定し、有用性を評価する。また、これまでの成果についても論文化し報告する予定であり、現在準備を進めている。

さらに発展的には、現状は市販試薬の添加により付与しているフェノール基を、バイオマス由来で供給し付加することで、100%バイオマス由来の材料とすることを検討する。この実施にはバイオマス利用に詳しい研究者の協力を得ることや宿主微生物の代謝改変など新たな知見、技術獲得が必要になるため、更に 5-10 年ほど必要になると予想される。

4. 自己評価

研究目的の達成状況としては、末端にフェノール基を有する低分子量PHAを生産できる重合酵素の創製について達成した。本課題は当初の研究期間より前倒しでの終了をさせて頂くこととなり、フェノール基を用いた新たな回収法と、合成される材料の評価については達成することが出来なかったが、先述の通り有用な変異酵素の獲得と評価を実施することができた。酵素獲得は本研究の出発点となる重要な項目であり、これを達成できたことは大きな進展であると捉えている。研究の進め方としては、当初の計画に沿った実施体制・研究費執行に沿って研究を実施できた。研究成果の科学技術および社会、経済への波及効果としては、要となる改変酵素の取得と評価を達成でき、PHA の生産において重要な役割を担う重合酵素に関する新たな知見も獲得することができた。研究成果については現在論文化の準備を進めている。さらに ACT-X のご支援による研究実施を出来たことにより、これまでに交流

のなかった先生方と新たに交流することができ、知見の獲得のほか、専門が完全には一致しないからこそその視点での今後の展開の可能性など、貴重な意見やご助言を頂戴することができた。研究を進めるうえでの視野が広がったと感じており、今後も生かしてゆきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(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)

なし