



岩手大学農学部 山田美和

微生物による生分解性プラスチック合成および微生物由来有用酵素に関する研究

はじめに

筆者はこれまで、応用微生物学を研究の主幹とし、微生物細胞もしくは酵素による有用物質合成に関する研究を行ってきた。微生物によるバイオプラスチック合成研究には、学生、研究員時代に携わり、研究のイロハを学びつつ、組換え微生物における代謝経路の構築や、鍵酵素の機能改変を通して、ものづくりにおける微生物の可能性を実感した。その後、岩手大学で微生物由来有用酵素の研究と出会い、広大な自然界から目的酵素を産生する微生物を探索して、見出した微生物から一握りの酵素を精製し、諸性質解明、応用へと展開する微生物酵素研究の醍醐味を味わいつつ、見識を広めることができた。本講演では、多くのことが学べたこれまでの研究の中でも、筆者が特に汗水を流した思い入れの深いものをご紹介します。

1. 微生物によるバイオプラスチックの生合成

1-1. 微生物が合成するバイオプラスチック polyhydroxyalkanoate (PHA)

石油資源の枯渇やプラスチック廃棄物による環境汚染問題は、我々が早急に対処しなければならない課題のひとつであるが、バイオプラスチックは、植物由来の原料から合成し石油を用いない点や、生分解性を有するものが多いことから、諸問題を解決できる材料と期待されている。しかし、バイオプラスチックの多くは、原料は植物由来だが、植物由来のモノマーをプラスチックへと重合する際、化学重合のステップが必要となる(図1)。化学重合では、有機溶媒を用いた高温高压の反応条件や、重金属触媒を必要とするため、環境へ負荷をかける恐れがある。そこで、著者らの研究では、微生物がエネルギー源として体内に貯蔵するバイオプラスチックであるPHAに注目した。本プロセスでは、モノマー供給とポリマー重合というプラスチック合成に必要な全ての反応を、細胞内において生体触媒である酵素が行うため、常温常圧の温和な条件で反応が進み、かつ重金属触媒を必要としない利点がある。しかしながら、材料としての性質に寄与するPHAモノマーの化学構造は限られており、機能性にも限界があった。そこで、本研究では、微生物が合成するバイオプラスチックの可能性を広げるため、新たな化学構造を有するポリマーの微生物合成を目指した。

1-2. 乳酸(LA)モノマーを有する新規PHAの微生物合成

最初のターゲットとして、市場で最も出回っている polylactate (PLA) に注目した。PLAは、透明性が高く、ガラス転移温度( $T_g$ )が室温よりも高く安定性が高いといった、PHAにはない優れた性質を有する。微生物細胞内で、LAポリマーを合成する際、LAモノマーを細胞内で供給し、重合することが必要となる。LAモノマーを重合可能な酵素(LA重合酵素)の報告はこれまでになかったが、筆者らはモノマーである lactyl-CoA (LA-CoA) と 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA) (最も基本的なPHAのモノマー) を供給したインビトロでの重合活性試験系を利用し、天然およびPHA重合酵素変異体を対象としてLA重合酵素を探索した。結果、研究室で作製された膨大なPHA重合酵素変異体ライブラリーより、LA重合酵素を見出した。得られたLA重合酵素遺伝子と、LA-CoA供給酵素(PCT)および3HB-CoA供給酵素(PhaAB)遺伝子を組換え大腸菌で共発現させ、LAユニットを6mol%有する poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) [P(LA-co-3HB)] の生合成に初めて成功した(図2)。さらに、LAモノマー取り込み能力を向上させたLA重合酵素変異体の作製やLA供給量が向上する嫌気培養の検討により、LA分率を最大で67mol%まで向上させた。得られた多様なLA分率のP(LA-co-3HB)の性質を調べ、ポリマー中のLA分率の向上は、ポリマーの柔軟性、透明性、 $T_g$ を上昇させると示した。

1-3. 長鎖モノマーを有する新規PHAの微生物合成

続いて、生体材料としての利用に特化したPHAの創製を目指し、主鎖の炭素数が多い長鎖モノマーユニットを有するPHAに注目した。宿主とする微生物や導入するPHA重合酵素および培養時の単一炭素源の種類を検討した結果、*Ralstonia eutropha* 由来PHA重合酵素を導入した *R. eutropha* PHB-4株を用い、sodium 5-hydroxyvalerate もしくは  $\omega$ -pentadecalactone を炭素源としてポリマー蓄積を行った際に5~32mol%の5-hydroxyvalerate ユニットを有する新規組成の poly[3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate-co-5-hydroxyvalerate] を合成した。さらに、合成したPHAの生体材料としての評価を行い、生体適合性を有することを明らかとした。

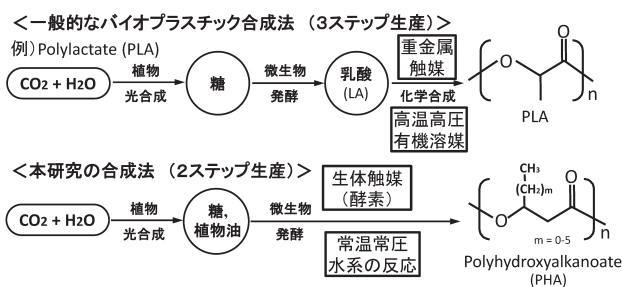
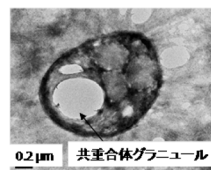


図1 バイオプラスチックの合成法



微生物細胞内における P(LA-co-3HB) 合成経路

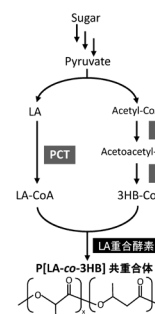


図2 微生物細胞内における P(LA-co-3HB) 合成経路

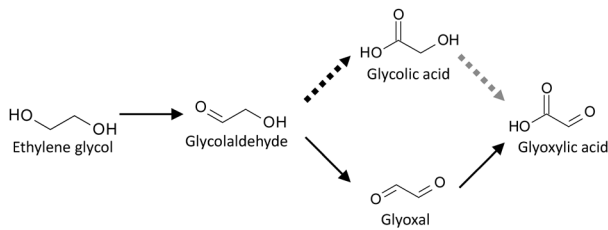


図3 エチレングリコールからのグリオキシル酸合成経路

## 2. 新規な微生物オキシダーゼによるグリオキシル酸合成

### 2-1. 微生物酵素を利用したグリオキシル酸合成

岩手大学の応用微生物学研究室では、安価なエチレングリコールを出発原料とし、医薬品や香料の原料として有用なグリオキシル酸の合成を目指して、グリコールアルデヒド、グリオキサール、もしくはグリコール酸を経由した3段階の微生物酵素の酸化反応によるグリオキシル酸合成を考案してきた(図3)。本酵素法は、一般的な化学合成法で使用する硝酸と金属触媒が不必要なため処理の問題が生じない。さらに、基質特異性の高い酵素を上手く利用すれば、化学合成法で問題となる副反応生成物の合成が克服可能と期待できる。グリオキサールを経由したグリオキシル酸合成経路に関わる微生物酵素は、すでにいくつか研究室で見出されていたが、グリコール酸を経由する合成系については、本系に適した性質を有するグリコールアルデヒドを酸化する酵素(図3黒点線)とグリコール酸を酸化する酵素(図3薄点線)がまだ見出されていなかった。そこで、筆者らは新たに上記2つの酵素の探索を試みた。

### 2-2. グリコールアルデヒド酸化能を有するアルデヒドオキシダーゼ

グリコールアルデヒド酸化能を有する酵素について、数種のアルデヒドオキシダーゼやデヒドロゲナーゼが報告されていたが、さらに活性の高い酵素の取得を目指し、目的酵素を産生する微生物の探索を行った。本研究では、2-methoxyethanolを主な炭素源とした培地による集積培養と、菌株のコロニーに基質と発色液の混合液を滴下し、赤呈したものを候補菌として選抜するプレートアッセイを組み合わせてスクリーニングを行い、グリコールアルデヒド酸化能を有するアルデヒドオキシダーゼを産生する *Burkholderia* sp. AIU 129 を見出した。得られた菌株より目的酵素の精製を行い、諸性質を明らかとした。結果、本酵素はこれまでにグリコールアルデヒド酸化能が報告されている3種のアルデヒドオキシダーゼと比較して、2番目にグリコールアルデヒドへの活性が高いことが示された。さらに、本酵素はグリコールアルデヒドに対して活性を示すが、グリコール酸およびグリオキシル酸には活性を示さなかったため、本研究で目指しているグリオキシル酸合成において副反応生成物を合成せず、有効であることがわかった。また、本酵素のようにヘテロ三量体構造を有するアルデヒドオキシダーゼが、グリコールアルデヒドに活性を示す報告はなく、本酵素は新規酵素であると推定された。

### 2-3. グリコール酸酸化能を有するアルコールオキシダーゼ

一方で、グリコール酸酸化能を有する酵素については、これまでに多くのグリコール酸オキシダーゼが報告されており、*Spinacia oleracea* (ホウレンソウ) 由来のグリコール酸オキシダーゼを利用し、グリコール酸を原料としたグリオキシル酸合成法の報告もある。しかし、これまでに報告されているグリ

コール酸オキシダーゼは、グリオキシル酸にもわずかに活性を示すため、副反応生成物としてシュウ酸を生成する問題があった。そこで、基質特異性が厳密なグリコール酸オキシダーゼを探すために、1,2-propanediolを主な炭素源とする培地を用いた集積培養とプレートアッセイにより *Ochrobactrum* sp. AIU 033 を選抜した。選抜した菌体から目的酵素を精製し、基質特異性を検討した結果、本酵素はグリコール酸、乳酸、およびC2-C10の炭素鎖を有する第一級アルコールに作用したが、グリオキシル酸には作用せず、本酵素もまた、グリオキシル酸合成系に有効と確認できた。また、本酵素のグリコール酸に対する  $K_m$  値は、第一級アルコールに対する  $K_m$  値よりも著しく高いことから、本酵素は当初考えていたグリコール酸オキシダーゼではなく、アルコールオキシダーゼに分類されると推定された。本結果はN末端アミノ酸配列情報からも支持されるものであった。さらに、本酵素のサブユニット構造や補因子は、既知のアルコールオキシダーゼだけでなくグリコール酸オキシダーゼとも異なっており、本酵素についても、目的の物質生産に有用であるのみでなく、新規酵素であると示唆された。

### おわりに

これまで、日々目の実験結果から次の実験は何をしよう、と考えることばかりに必死だったが、今回自身の研究を振り返る機会をいただき、微生物の潜在能力に驚かされるばかりのこれまでだったと改めて思える。現在は、本講演で紹介した研究に関して、新たな微生物探し(宝石の原石探し)や酵素遺伝子の異宿主における発現検討、酵素の高機能化等を試み、有用性の高い技術構築を目指している。これまでの研究を通して学んだ新規な有用酵素の見出し方、組換え微生物における代謝経路構築、酵素の機能改良等の経験を活かして、新たな微生物を見つけ、その可能性を最大限活用したものづくりへと昇華できるよう、今後も七転び八起きしながら宝探しを続けていきたい。

**謝辞** 本研究は、北海道大学大学院工学研究科生物機能高分子専攻バイオ分子工学研究室、独立行政法人理化学研究所バイオマス工学研究プログラム酵素研究チーム、ならびに岩手大学農学部応用生物化学科応用微生物学研究室において実施されました。学生時代、LAユニットを有するPHAの微生物合成という非常に挑戦的なテーマを下さり、本研究を通して研究のイロハからその魅力まで、丁寧にご指導くださった北海道大学田口精一先生、大井俊彦先生、松本謙一郎先生、研究員時、長主鎖モノマーユニットを有するPHAの微生物合成研究を通して、高分子の分析技術や研究全般へのご助言を下された理化学研究所土肥義治先生、沼田圭司先生、阿部英喜先生、岩手大学へ異動後、新たな分野に携わる機会を下さり、微生物スクリーニング、酵素精製技術、酵素の応用法について基礎からご指導くださった岩手大学磯部公安先生、得られた酵素のN末端アミノ酸配列解析やICP分析を行ってくださった京都大学小川順先生、岸野重信先生、研究のまとめにご助言をくださった大阪府立大学片岡道彦先生、京都学園大学清水昌先生をはじめ、これまでの研究に関わり多大なるご助力を賜りました全ての先生方、先輩、同輩、後輩、岩手大学応用微生物学研究室の学生の皆様、共同研究者の皆様へ、心より御礼申し上げます。最後に、日頃から研究に関するご助言を下さり、本賞にご推薦下さいました岩手大学下飯仁先生に厚く御礼申し上げます。