バイオを駆使した環境調和型プラスチックの創製 —微生物生産から植物生産へ— Creation of Eco-friendly Plastics by Biotechnological Application: From Microbial Production to Production in Plants

山田美和

北海道大学大学院工学研究科
生物機能高分子専攻生物学講座
バイオ分子工学研究室
〒060-8628
北海道札幌市北区北13条西8丁目

Miwa YAMADA
Division of Biotechnology and
Macromolecular Chemistry,
Graduate School of Engineering,
Hokkaido University
N13W8, Sapporo 060-8628, JAPAN

松本謙一郎

東京理科大学基礎工学部生物工学科
〒278-8510
千葉県野田市山崎 2641

Ken'ichiro MATSUMOTO
Department of Biological Science and
Technology, Tokyo
University of Science,
Yamazaki 2641, Noda 278-8510, JAPAN

田口精一

北海道大学大学院工学研究科
生物機能高分子専攻生物学講座
バイオ分子工学研究室
〒060-8628
北海道札幌市北区北13条西8丁目

Seiichi TAGUCHI
Division of Biotechnology and
Macromolecular Chemistry,
Graduate School of Engineering,
Hokkaido University
N13W8, Sapporo 060-8628, JAPAN

論文要旨：再生可能資源から合成される生分解性バイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、地球温暖化物質である二酸化炭素放出の軽減に有効な環境調和型高分子素材である。PHA の熱的あるいは機械的物性は、PHA 共重合体を構成するモノマーユニットの分率に依存することから、モノマー組成をうまく制御することで強度のある繊維から弾性を有するフィルムグレードの素材まで加工できる。しかしながら、PHA 生産にかかるコストは、汎用樹脂として普及している石油系プラスチックと比べて割高になるというのが実用化へのネックとなっていた。

本稿では、まず PHA が微生物細胞内で複数のタンパク質によってうまく品質管理される分子メカニズムについて、遺伝子発現調節タンパク質 PhaR の働きを軸に解説する。PHA のモノ作りに関しては、進化分子工学という新しいアプローチを駆使した PHA 生合成関連酵素の改質を通じて、量質ともに最適化されている進捗状況を紹介する。さらに、得られた進化酵素を植物の望みの器官に導入発現させることで、光合成を原動力とした高効率の PHA 生産を実現する新しい戦略についても言及する。

Abstract: Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial polyesters which can be used as bio-based and biodegradable plastic materials. The development of bioplastics which are produced from renewable carbon sources is a very important step for reducing the emission of carbon dioxide. Since the

thermal and physical properties of PHAs are variable depending on their monomer composition, PHAs can be processed to various materials, such as fibers, films and elastomer. Although PHAs are useful and environmentally friendly material, high cost of production has limited widespread use of PHAs. The most proteins involved in PHA biosynthesis, such as PHA synthases, monomer supplying enzymes, coat proteins of PHA inclusion, and their regulators, have been cloned and characterized. PhaR is the regulator of PHA biosynthesis, and has a unique ability to bind to DNA and PHA. Recently, artificially modified PHA biosynthetic enzymes were generated by the *in vitro* evolutionary approach. The modified enzymes enabled us to increase the PHA content and regulate the monomer composition. The photo-synthetic PHA production by the transgenic plants harboring PHA biosynthetic genes has been investigated to reduce the cost of PHA production. The targeting of enzyme into plastid and the application of highly active mutated PHA synthases enhanced PHA accumulation in plants.

Key words: Polyhydroxyalkanoates, PHA Synthase, *in vitro* Evolution, Transgenic Plants

1 はじめに

大気中の二酸化炭素の増加が引き起こす地球温暖化が深刻な環境問題となっている今日、生物資源から生産されるバイオプラスチックの開発が国際的に緊急の課題になっている。バイオプラスチックは、糖や植物油などの生物資源から生産され、使用後は環境中の微生物によって水と二酸化炭素にまで分解される新素材である。自然界では、光合成による二酸化炭素の固定と、微生物分解による二酸化炭素の発生が繰り返され、炭素循環のバランスが保たれている。バイオプラスチックは、この自然界の炭素サイクルに組み込まれるため、石油から合成されるプラスチックと比べ、二酸化炭素の発生量が抑えられ、環境汚染も軽減できると期待されている。このように植物起源の素材は、植物が生育するまでに大気中の二酸化炭素を吸収しているため、プラスチックの製造過程で二酸化炭素を発生させても、環境への影響が少ない「カーボンニュートラル」な材料である。

本稿では、微生物によって合成される代表的なバイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)について、まずその構造多様性、生合成経路、合成調節メカニズムについて解説し、後半で工業的生産に向けた最近の取り組みについて紹介する。特に、最新のPHA生合成関連酵素のタンパク質工学や進化工学を駆使した組換え微生物生産法の研究展開と、さらに次世代技術として育ちつつある植物生産法の新たな戦略について言及する。

2 微生物がつくる生分解性のバイオプラスチック PHA とは

PHA は、微生物によって炭素源・エネルギー源の貯蔵物質として合成される脂肪族ポリエステルである¹⁾。PHA 生産菌は、窒素やリン源などの栄養枯渇条件下で過剰な炭素源が存在すると、PHA を細胞内に蓄積する。そして再び増殖ができる条件になると、PHA を分解し

て炭素源として利用する。PHA は菌体内ではアモルファス状態の顆粒として存在しているが、クロロホルムなどの有機溶媒で抽出・精製すると、半透明のフィルムとして単離される²⁾。また、熱可塑性を有し、熔融成型により繊維やフィルムなど様々な形状に加工でき、石油から作られる汎用樹脂の代替材料として、あるいは特殊用途に使用する事ができる。さらに、自然環境中にはPHAを分解できるエステル分解酵素を分泌する微生物が多く生息しており、PHAを土中、河川水中、または海水中におくと、数ヶ月で完全に分解される。このような生分解性を有する材料は、自然環境中でそのまま生分解されることを指向した農業用のフィルムやレジャー用品などとして、あるいは日常品で使用后コンポスト化に移行できるような製品などとして利用される。PHAは、主にその特性から後者の用途製品として成型加工され普及することが期待されている。

PHAは、そのほとんどが3-ヒドロキシアルカン酸(3-HA)をモノマーユニットとするポリマーで、そのモノマー組成から3種類に分類されている(Fig. 1)。炭素数3~5の短鎖長(short-chain-length, scl)のモノマーユニットから構成されるscl-PHAは結晶性が高く、硬度はあるけれども機械的脆弱さも抱える高分子材料である。scl-PHAには二次結晶化による経時的な強度の低下や、熔融成型時の熱分解による分子量の低下という問題があり、実用化は困難であると長い間考えられていた²⁾。しかし最近、高分子の延伸処理により、非常に高強度を有する安定なscl-PHAの高配向性繊維が作られ、これらの弱点は克服されつつある^{2), 3), 4)}。二つ目は、炭素数6~14の中鎖長(medium-chain-length, mcl)のモノマーユニットから構成されるmcl-PHAである。mcl-PHAは非常に柔らかく、弾性を有するゴムのような物性をもつ。最後に、sclモノマーとmclモノマーの共重合体scl/mcl-PHAは、モノマー組成に依存してscl-PHAとmcl-PHAの中間的な物性を示す。これは、mclモノマーが高分子鎖の結晶成長を妨げ、アモルファ

Polyester	Carbon number	Microorganism	Chemical structure
scl-PHA (short-chain-length)	C3 ~ C5	<i>Ralstonia eutropha</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Chromatium vinosum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Methylobacterium extorquens</i>	
mcl-PHA (medium-chain-length)	C6 ~ C14	<i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>P. putida</i> <i>P. aeruginosa</i>	
scl/mcl-PHA	C3 ~ C14	<i>Aeromonas caviae</i> FA440 <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	

Fig. 1 Variety of Bacterial Polyhydroxyalkanoates.

ス領域を増大させることに起因する。とくに炭素数4の3-ヒドロキシブタン酸(3HB)を主成分とし、少量のmclモノマーユニットを含むscl/mcl共重合体は、ポリプロピレンに近いしなやかで柔軟な物性を有する。scl/mcl共重合体は、scl-PHAに比べ融点が高いことから、溶融時の熱分解が少なく、溶融成型が容易であるという利点もある。scl/mcl-PHAはモノマー組成により物性が変化するため、工業的に生産するためには、モノマー組成の制御が重要な課題になる^{5), 6)}。そこで現在、硬軟多様な3HBベースのPHA共重合体の創製を目指して、3HBモノマーユニットとさまざまな種類の3HAモノマーユニットが多様な混合比で構成されているPHA共重合体を作製する試みがなされている。

3 PHAの生合成

3.1 PHAの生合成経路

では、PHAはどのような代謝経路を経て、細胞内で合成されるのか？PHA生産菌において、これまでに明らかにされたPHA合成に関連する代謝経路をFig. 2に一括して示す。典型的なPHAであるP(3HB)の生合成経路は、水素細菌*Ralstonia eutropha*において最もよく研究されている。P(3HB)はアセチルCoAを出発物質として3段階の酵素反応により合成される。はじめに、2分子のアセチルCoAが、 β -ketothiolase(PhaA)によって縮合し、アセトアセチルCoAとなる。次に、NADPH依存性acetoacetyl-CoA reductase(PhaB)の作用により、(R)-3-ヒドロキシブチリルCoA(3HB-CoA)へと還元される。最後に、PHA synthase(PhaC)が3HB-CoAを重合してP(3HB)が合成される。これらの3つの酵素遺伝子は、*R. eutropha*においては、*phaCAB*オペロンを形成している。多くの微生物

が*R. eutropha*と類似のscl-PHA合成経路を有しているが、遺伝子構成はPHA生産菌によってさまざまである^{5), 6)}。

炭素数6~14の中鎖のモノマーとなるR-3-ヒドロキシアシルCoA(3HA-CoA)は、脂肪酸の β 酸化系とde novo脂肪酸合成系の2つの代謝経路から供給される経路が知られている。脂肪酸の β 酸化系からの代謝経路は、*Aeromonas caviae*^{7), 8)}や*Pseudomonas aeruginosa*⁶⁾

Fig. 2 Pathways of PHA Biosynthesis. PhaA, β -ketothiolase; PhaB, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhaC, PHA synthase; PhaG, 3-hydroxyacyl-ACP/CoA transferase; PhaJ, (R)-specific enoyl-CoA hydratase; FabG, 3-ketoacyl-CoA reductase; CoA, coenzyme A; ACP, acyl carrier protein.

がよく研究されている。これらの菌は *R* 体特異的 enoyl-CoA hydratase (PhaJ) を有し、脂肪酸 β 酸化系の反応中間体生成物であるエノイル CoA を、PHA synthase の基質となる (*R*)-3 HA-CoA へと変換することができる。脂肪酸 β 酸化系を利用して中鎖のモノマーを含む PHA を合成するには、脂肪酸または脂質を炭素源として菌を培養する必要がある。一方 *Pseudomonas* 属細菌は、3 HA-ACP/CoA transferase (PhaG) を有し、*de novo* 脂肪酸合成系中間体である (*R*)-3 HA-ACP から (*R*)-3 HA-CoA へ変換し、モノマーを供給することができる^{9), 10)}。この酵素によって、*Pseudomonas* 属細菌では、糖を炭素源として中鎖のモノマーユニットを含む共重合体を合成することができる。その他、PHA 生合成経路には、主経路以外にもいくつかの副経路が存在することが明らかとなっており、その詳細は文献(6)を参照いただきたい。

3.2 微生物における PHA 合成調節機構

PHA の合成とそれに関与するタンパク質遺伝子群の発現はどのように調節されているのだろうか？著者らは、メタノール資化性細菌である *Paracoccus denitrificans* を題材に PHA 生合成調節機構の研究をしている。微生物細胞内に合成・蓄積される PHA 顆粒上にはいくつかのタンパク質群が特異的に結合している¹¹⁾。これらは、GAP (granule-associated proteins) と呼ばれている。GAP の中で最も多量に存在する PhaP は、phasin と呼ばれている¹²⁾。疎水性に富む PHA 顆粒の表面を覆うことによって、細胞内のその他のタンパク質などが非特異的に PHA 顆粒に結合し、細胞生理に負担をかけるのを防ぐ働きをしていると考えられる。この PhaP の発現時期と分子数を調節しているのが、PhaR という調節タンパク質である。PhaR は、DNA と PHA の両方に結合するユニークなタンパク質である。Fig. 3 には、著者らが提唱する PhaR による *phaP* 遺伝子の発現制御機構¹³⁾を示している。PhaR は、通常、*phaR* 遺伝子自身と *phaP* 遺伝子それぞれのプロモーター領域に結合することによって、自身の遺伝子と *phaP* 遺伝子の発現を負に制御している。菌体内で PHA が蓄積してくると、PhaR が PHA に結合することで *phaP* 遺伝子の転写が抑制解除され、PhaP の合成が開始される。PHA 顆粒表面が PhaP で飽和すると、PhaR は PHA に結合する事ができなくなり、*phaP* 遺伝子のプロモーター領域に再結合する。これにより PhaP の合成は止まり、細胞内には PHA の表面を覆うのに必要十分な量の PhaP だけが存在する事になる。

うまく調節された省エネルギーシステム¹⁴⁾である。これらの研究は、主にインビトロの系に基づいて行なわれ

Fig. 3 The Regulatory Model for PHA Biosynthesis. The detail of molecular mechanism for the regulation of PHA biosynthesis is described in the text.

たものである。一方、*R. eutropha* において、*phaR* 遺伝子や *phaP* 遺伝子の変異株を作製して利用する各遺伝子産物の機能研究（インビボ実験）から、同様の PHA 合成調節メカニズムが働いていることが報告されている¹⁵⁾。現在、筆者らは PhaR と DNA および PHA との分子間相互作用を定量的に解析しており、今後このモデルの実証研究が進むことで、PHA 生合成調節機構が解明されることが期待される。

3.3 PHA 合成酵素の種類

PHA の熱的・機械的物性を左右するモノマーユニットの構造は、PHA synthase の基質特異性によって決定されることから、PHA synthase は PHA 生合成の key enzyme であると言われている。これまでに、さまざまな微生物から、基質特異性の異なる約 55 種類の PHA synthase がクローニングされている。PHA 合成酵素は、その一次構造と基質特異性により、現在 4 つの Class に分類されている¹⁶⁾。

Class I に分類される PHA synthase は、炭素数 3～5 のヒドロキシアシル CoA に基質特異性を示し、*phaC* 遺伝子にコードされた 64 kDa のタンパク質のホモダイマーが活性型だと考えられている¹⁷⁾。Class II の PHA synthase は、炭素数 6～14 のヒドロキシアシル CoA に基質特異性を示し、Class I と同じく *phaC* 遺伝子にコードされた 62 kDa のタンパク質のホモダイマーが活性型である¹⁸⁾。一方、Class III に分類される PHA synthase は、炭素数 3～5 のヒドロキシアシル CoA に基質特異性を示し、*phaC* と *phaE* 遺伝子にコードされたそれぞれ 40 kDa のタンパク質をサブユニットとするヘテロダイマーを形成している¹⁷⁾。最近発見された Class IV に分類される PHA synthase は、炭素数 3～5 のヒドロ

キシアルカン酸 CoA に基質特異性を示し、*phaC* と *phaR* 遺伝子にコードされた、40 kDa, 22 kDa のタンパク質がヘテロダイマーを形成している¹⁹⁾。なお、ここで登場する PhaR (PHA synthase の一部) は、先の PHA 合成調節タンパク質 PhaR と同一の表記をしているので、混乱のないようにしていただきたい。Class III と IV の PHA 合成酵素は、共に 2 つのサブユニットが結合しないと活性をほとんど発現しないことがわかっていて²⁰⁾。一次構造を見てみると、*phaC* 遺伝子には全クラス間で相同性があるものの、それぞれ対となる *phaE* と *phaR* の遺伝子産物間の一次構造にはほとんど相同性が見られない。これらの知見は、PHA 生産菌が進化の過程で PHA synthase を獲得してから、どのような進化の道筋をたどって数種の構造パターンに分歧し、同一の機能を発現してきたかという興味深い題材を与えている。PHA 生産菌群の 16 SrDNA 配列に基づく進化系統関係からは、Class III および IV (サブユニット構造型) の酵素群が他のもの (単一分子型) に比べて早期に出現していたことになる。実際、時系列的にこのような酵素進化を遂げて来たとすると、サブユニット型から単一分子型に移行することになり、その機能的あるいは生理的意義に関心がもたれる。

4 PHA 生合成系酵素の改質による高性能 PHA の高効率生産

これまで述べてきたように、PHA は二酸化炭素の排出量が少ない環境調和型材料であり、その生合成メカニズムについてもかなりの部分が解明されてきた。しかし、PHA を石油から作られる汎用樹脂の代替材料として普及させるためには、さらなる物性の向上と生産コストの削減が不可欠であった。とくに、柔軟な物性を有する scl/mcl-PHA の合成には、scl と mcl のモノマーを供給経路とそれらを重合する PHA synthase が必要で、モノマーのモル分率を正確に制御する必要がある。従来は、自然界からスクリーニングされたさまざまな PHA 生産菌から、より優れた性質を持つ PHA 生合成系酵素をクローニングし、それらを組み合わせることで、PHA の生合成経路の制御及び効率化を行ってきた。しかし、これまでに多くの PHA 生合成系酵素が単離・解析され、さらに優れた酵素を取得することが難しくなっていた。そこで、筆者らは進化分子工学と呼ばれる手法を用いて、天然に存在する PHA 生合成系酵素を人工的に進化させることで、PHA の生合成を効率化し、モノマー組成を制御することを検討した。

進化分子工学は、天然のタンパク質のアミノ酸配列のいくつかを改変することにより、酵素活性や熱的安定性

の上昇、基質特異性の変換などを行う技術である。自然界に存在する酵素は、工業生産に最適化して進化しているわけではないので、いくつかのアミノ酸置換により飛躍的に性能が向上する可能性は十分にある。進化分子工学による酵素の機能改変には、酵素の立体構造が解明されている場合とない場合で、2 つの異なるアプローチがある。酵素の立体構造が分かっている場合には、立体構造に基づいて基質認識に関与しているアミノ酸残基を予測し、その部位を指定して変異を導入する (site-specific mutagenesis) ことにより、基質特異性を変換することができる。構造を重視して機能変換を試みるタンパク質工学と呼ばれている手法である。たとえば、著者らは、C4~C6 のエノイル-CoA に基質特異性を有する *A. caviae* 由来 *R* 体特異的 enoyl-CoA hydratase (PhaJ) の基質特異性変換を行った。この酵素は分解能 1.5 Å で X 線結晶構造解析に成功しており²¹⁾、立体構造から 65 番目のロイシン残基と 130 番目のバリン残基が、基質結合ポケットの最も深い部分に位置していると推定された。そこで、基質結合部位への基質挿入の立体障害を考慮して、65 番目のロイシン残基と 130 番目のバリン残基を、より立体的に小さいアミノ酸残基であるアラニン残基、グリシン残基へとそれぞれ変換したところ、いずれの変異酵素も、C8 以上のエノイル-CoA に対しても活性を示すようになった²²⁾。この変異酵素を用いると、より長鎖のモノマーを含む scl/mcl 共重合 PHA が合成できるようになる。このように、基質結合ポケットの大きさを改変することで、酵素の基質特異性を変換し、合成される PHA のモノマー組成を制御することができる。

同様の手法は、(*R*)-3-ヒドロキシアルカン酸供給系への関与が明らかとなった脂肪酸合成経路の酵素、*Escherichia coli* 由来 3-ketoacyl-ACP synthase III (FabH) にも適用された。この場合、すでに立体構造解明されていた *Mycobacterium tuberculosis* 由来 FabH を参考にして、基質特異性の改変に成功している²³⁾。このように、対象酵素自身あるいは構造類似の酵素の立体構造情報が与えられている場合は、基質特異性変換の設計指針は立てやすい。

一方、立体構造が解明されていないタンパク質の場合には、上記のような方法を用いることはできない。PHA synthase は、PHA 生合成において、PHA の生産性、共重合組成、分子量制御などと量質両方にリンクした最も重要な酵素 (Fig. 4) であり、その立体構造解析が長い間試みられてきた。しかし、酵素の結晶化が難しく、いまだに結晶構造が明らかにされていない。そこで、点変異 (random mutagenesis)、相同配列間の交換 (gene shuffling と呼ばれている)、優良変異点の組み合わせ

Fig. 4 Properties of PHA Related to the PHA Synthase Function.

(recombination) など PHA synthase に遺伝子レベルでの変化を発生させ、比活性向上 (PHA 生産性増強と関連)、基質特異性変換 (PHA モノマー組成制御)、熱安定性向上 (PHA の安定的合成) を発揮する進化型酵素の創出研究がスタートした。進化工学研究の変遷については、変異法および改変した酵素の性質を基準に Table 1 にまとめて示した。

筆者らは、PHA synthase の機能改変のために、酵素遺伝子にランダムに塩基置換 (変異) を導入 (random mutagenesis) したライブラリーを作製し、その中から目的とする優れた性質を持つ変異酵素を選抜する方法を試みた。DNA 増幅反応 (PCR) を正確性を低下させた条件で行うことで、PHA synthase 遺伝子にランダム変

異を導入した。PHA synthase は約 560~590 個ほどのアミノ酸から構成され、一塩基置換により計算上約 4,000 個の変異酵素が可能である (560×19 は約 1 万になるが、すべてのコドンへ変換できるわけではないので、実際に可能な変異は少なくなる)。多数の変異ライブラリーから優良変異を選抜するためには、多検体をまとめて迅速に測定できる分析手法が不可欠である。筆者らは、Nile Red という色素が細胞内に蓄積した PHA のような疎水性物質を赤く染色する性質を利用して優良変異の選抜を行った^{24), 25)}。NileRed を含む寒天培地上で、ライブラリーを導入した大腸菌を培養すると、PHA の蓄積率が高いほど大腸菌コロニーが強く着色され、PHA の蓄積率を可視化することができる。すなわち、PHA synthase の酵素活性を細胞内で合成する PHA の蓄積量 (赤色度合い) に置き換えて評価する方法で、各変異酵素の活性を逐一測定する必要があるシステムである。この段階では、酵素機能のみに着目しており、どのような遺伝子変異 (アミノ酸置換) が生じたかは、変異体を発現させた大腸菌細胞から情報分子 DNA を回収して配列分析することで明らかとなる。

筆者らは、このスクリーニング系を用いて、まず Class I に属する *R. eutropha*²⁵⁾ と *A. caviae*²⁶⁾ 由来 PHA synthase において、数種の高活性 PHA synthase を取得した。ここでは具体的に、Class II に属する *Pseudomonas* sp. 61-3 由来の PHA synthase の変異酵素につ

Table 1 Studies on Molecular Evolutionary Engineering of PHA Synthase.

Year	Enzyme source	Method	Polyester	Changed enzyme property	Reference
2001	<i>Ralstonia eutropha</i>	Random mutagenesis	P(3HB)	Activity	24
2002	<i>Ralstonia eutropha</i>	Random mutagenesis	P(3HB)	Activity, Thermostability	25
	<i>Aeromonas caviae</i>	Random mutagenesis	P(3HB-co-3HHx)	Activity, Substrate specificity	26
	<i>Ralstonia eutropha</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Aeromonas caviae</i> (<i>punctata</i>)	Gene shuffling	P(3HA)	Activity, Substrate specificity	35
2003	<i>Pseudomonas</i> sp.61-3	Random mutagenesis	P(3HB-co-3HHx)	Activity, Substrate specificity	36
		Site-specific saturation mutagenesis	P(3HB-co-3HA)	Activity, Substrate specificity	27
		Recombination	P(3HB-co-3HA)	Activity, Substrate specificity	28
2004	<i>Pseudomonas</i> sp.61-3	Random mutagenesis	P(3HB-co-3HA)	Activity, Substrate specificity	28
	<i>Pseudomonas putida</i> GPo1	Gene shuffling	P(3HA)	Activity, Substrate specificity	38
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Gene shuffling	P(3HA)	Activity, Substrate specificity	39
2005	<i>Ralstonia eutropha</i>	Random mutagenesis	P(3HB)	Expression	40
	<i>Ralstonia eutropha</i> <i>Pseudomonas</i> sp.61-3	Site-specific saturation mutagenesis	P(3HB)	Activity	41
		Recombination	P(3HB)	Activity, Substrate specificity	29

Enzyme evolution studies are summarized in terms of mutation methods, species of polyesters generated and changed enzyme properties.

P(3HB-co-3HHx) is poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) and P(3HB-co-3HA) is poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate).

いて紹介する。この PHA synthase は幅広い基質特異性を持ち scl/mcl を合成することができるが、mcl の基質に対する活性が高く、scl の基質に対してはごく微弱な活性しか持たないため、scl モノマーを主成分とする PHA を合成すると生産性が低くなるのが問題であった。そこで筆者らは、この PHA synthase のランダム変異ライブラリーと scl のモノマー供給系を導入した大腸菌を選抜し、scl の取り込み量が多くなっている変異 PHA synthase をいくつか選抜した。これら変異酵素の P(3 HB) ホモポリマーの合成能力は、最大で野生型の酵素の 400 倍にも達した²⁷⁾。さらに、この変異 PHA synthase を、mcl モノマー供給系を加えた条件で使用すると、PHA の蓄積量が増加するだけでなく、scl/mcl のモル分率もさまざまに変えることができることが分かった^{28), 29)}。PHA synthase の改変によって、モノマー組成が制御できることは、scl/mcl PHA を工業的に生産する上で非常に重要な意味をもつ。全く同じ炭素源、培養条件で、さまざまなモノマー組成の PHA が合成できれば、低コストで幅広い用途に対応できるからである。また、この機能重視の研究を通して、PHA synthase の活性や基質特異性に影響を与えるアミノ酸残基の位置が特定されたことから、酵素の基質結合部位や活性中心の位置が推定できるようになった^{26), 27), 29)}。今後、このように得られた PHA synthase の構造と機能に関する関連データは、酵素の立体構造が解明された際に有意義な議論ができる基礎知見として利用されるであろう (Table. 1)。

PHA 生合成関連酵素の改質による高性能 PHA の効率的生産系の開発研究は、21 世紀になり急展開し、PHA 生産天然菌の培養工学 (第一世代)、遺伝子組換え PHA 生産菌の分子育種 (第二世代) に続く、第三世代の PHA 生産法として位置づけられている^{30), 31), 32)}。また、取得された進化酵素を、*E. coli* だけでなく *R. eutropha*^{33), 34), 35)} や植物 (後述) など他の生物種に導入し、それぞれの生産系で PHA 合成を増強する研究に活用し始められている。

5 遺伝子組換え植物を用いた PHA 生産

前述したように、PHA の実用化への最大の障壁は生産コストである。微生物発酵による PHA 生産では、培養槽の建設費、培養槽の運転エネルギー、培地、PHA の抽出・精製のコストが必要で、現行の技術では 1 kg の PHA を生産するのに 400~500 円ほどかかるようである⁴²⁾。今後、廃バイオマスを炭素源として使用しコストを抑え、培養槽の建設費を原価償却すること等により、200 円/kg 程度までコストを削減することが目標とされ

ている。PHA が 200 円/kg 程度で生産できれば商業化は可能だと言われているが、石油由来のポリエチレンが約 100 円/kg であることと比較すると、まだ 2 倍のコストがかかる計算である。そこで、さらに低コストで PHA を生産する方法として、遺伝子組換え植物を用いた PHA 生産が検討されている。これは微生物から単離した PHA の生合成系遺伝子を植物に導入し、光合成により PHA を植物細胞内で直接 1 ステップで合成させる方法である。遺伝子組換え植物による PHA 生産系は、2 ステップ (原料調達と微生物発酵) からなる微生物発酵と比較して培地と培養槽のコストがかからないため、大幅に生産コストを削減できる可能性がある。その概念を、Fig. 5 に模式的に示した。

植物による PHA 生産の最初の研究は、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて行われた⁴³⁾。2 つの PHA 生合成系酵素遺伝子、*phaB* と *phaC* 遺伝子を、植物細胞内で恒常的に発現する 35 S カリフラワーモザイクウイルスプロモーターの制御下でシロイヌナズナに導入した。シロイヌナズナは細胞質内に β -ketothiolase を有するため、*phaA* 遺伝子を導入しなくても PHA が合成される。このシロイヌナズナの組換え株を GC/MS で分析したところ P(3 HB) のピークが観測され、電子顕微鏡による観察でも、植物細胞内に PHA の顆粒が形成されているのが確認された。この実験により、微生物由来の PHA 生合成系酵素が植物細胞内でも同様の機能を発揮し、PHA を合成できることが明らかとなった。しかし、PHA の蓄積量は、新鮮植物体重量 1 g 当たり約 20 μ g (0.002%) であり、微生物に比べると非常に低かった。モンサント社の試算によると、遺伝子組換え植物を用いた PHA 生産を実用化するためには、PHA の蓄積量が十数%に達する必要がある⁴⁴⁾、工業的な PHA 生産の宿主として植物を用いるためには、PHA の蓄積量を大幅に上昇させる必要があった。

植物における PHA の蓄積量を増加させるために、

Fig. 5 PHA Production in Transgenic Plants Potentially Decreases the Cost of Production.

PHA の合成を色素体内に局在化させる方法が検討された。色素体は脂肪酸の合成を行う重要なオルガネラで、緑葉では葉緑体へと分化し光合成を行っている。色素体ではアセチル CoA の供給量が多いこと、細胞内で占める体積が大きいこと等から、PHA の蓄積量が高くなることが期待された。タンパク質を色素体に局在化するには、目的タンパクの N 末端に色素体へ輸送されるシグナル配列を付加する。*R. eutropha* 由来の PhaABC の 3 つの酵素を色素体に局在化させたシロイヌナズナの組換え株は、最大で新鮮植物体重量 1 g 当たり 7 mg (0.7%) の P(3HB) を蓄積し、色素体内で PHA を合成すると、細胞質内に比べて PHA が高蓄積できることが明らかになった⁴⁵⁾。

色素体への酵素の局在化により PHA の蓄積量は増加させることができたのだが、PHA の蓄積率に逆比例して生育が悪くなり、ある程度以上蓄積率が上がると、矮性、不稔などの表現型が現れる事がわかった。すなわち、PHA の蓄積により植物の生理機能が乱されたためと考えられた。この問題を回避するために、植物の生育に必要な組織と、PHA を蓄積する組織を分けることが試みられた。すなわち、組織特異的なプロモーターを用いて PHA 生合成系遺伝子を発現させ、ある特定の組織だけに PHA を蓄積させれば、植物体の生育阻害が抑えられると考えた。モンサント社ではアブラナの種子特異的に発現するプロモーターを用いて、種子の色素体中に PHA を蓄積させた。この組換え株は最大で新鮮重量の 7% の P(3HB) を蓄積した⁴⁴⁾。植物による組織特異的な PHA 合成はまだ報告例が非常に少なく、効率の良い系を確立するには、まだ多くの試行錯誤が必要になるだろう。

筆者らは、植物の PHA 蓄積率を向上させる新しい方法として、前半で述べた進化分子工学により得られた高活性変異酵素の応用を試みている。PHA の生合成系酵素の活性を増加させる方法としては、強力なプロモーターを使い酵素の発現量を上げることがまず考えられるが、遺伝子の発現量が高いと、gene silencing により発現が抑えられる可能性も高くなってしまう。しかし、高活性変異酵素を用いれば、遺伝子の発現量を変えずに酵素活性を上昇させることができる。筆者らは、いくつかの高活性変異 PHA synthase 遺伝子を植物に導入し、これらの組換え株が PHA を高蓄積することを見出した。たとえば、シロイヌナズナに *Aeromonas caviae* 由来の高活性変異型 PHA synthase 遺伝子を導入した組換え株は、野生型の PHA synthase 遺伝子を導入した組換え株と比較して平均で約 10 倍の PHA を蓄積した⁴⁶⁾。大腸菌の系を用いてスクリーニングされた高活性変異酵素が、

植物細胞内でも PHA の高蓄積を示したことから、人工進化酵素がさまざまな生物の細胞内で高活性を有することが示唆された。また PHA synthase の高活性化により、PHA の蓄積量が増加したことから、PHA synthase による重合反応が植物細胞内の PHA 合成の律速段階の一つであることが示された。人工進化酵素を用いる方法は植物内での PHA 蓄積を増加させる新しい方法であり、既往の研究で報告された方法と組み合わせれば、さらなる効率化が可能になるだろう。

微生物発酵では、脂肪酸・脂質を炭素源として培養することで、中鎖のモノマーを含む共重合体が合成できることは前に述べた (Fig. 2 の代謝経路図参照) が、植物を用いる場合には炭素源を外から与えることができないため、植物細胞内で利用できる中鎖長のモノマーの供給経路は限られている。現在までに報告されている植物細胞内で短鎖・中鎖共重合体を合成する方法は、ペルオキシソーム内の脂肪酸 β 酸化系の代謝中間体を利用した PHA 合成系のみである。植物のペルオキシソームは、老化時と発芽時にグリオキシソームに分化し、脂肪酸の β 酸化を行う。植物の脂肪酸 β 酸化系は大腸菌などの微生物とは異なり、*R* 体の 3-hydroxyacyl-CoA を経て脂肪酸を分解するため、PHA synthase によって短鎖・中鎖のモノマーを含む PHA を合成することができる。ペルオキシソーム内で合成される PHA のモノマー組成は PHA synthase の基質特異性に影響される。*P. aeruginosa* 由来の PHA synthase 遺伝子にペルオキシソーム局在化シグナルを付加した遺伝子を導入したシロイヌナズナは、炭素数が 6~14 のモノマーユニットを含む PHA を合成し⁴⁷⁾、*A. caviae* 由来の PHA synthase を導入した組換え株は、炭素数が 4, 5, 6 のモノマーユニットからなる PHA を合成する⁴⁸⁾。しかし、ペルオキシソーム内に蓄積される PHA 量は最大でも乾燥重量 1 g 当たり 0.2 mg (0.02%) 程度であり、細胞質や葉緑体に蓄積させたときと比べて蓄積量が非常に低くなってしまいう問題点がある。これは、植物の β 酸化経路がごく限られた時期のみに発現すること、ペルオキシソームで代謝される脂肪酸の量が少ないこと、ペルオキシソームの物理的な大きさが小さいことなどが原因として考えられる。植物細胞内でより効率よく短鎖・中鎖共重合体を合成するためには、 β 酸化系以外の代謝経路から、中鎖のモノマーを供給する必要があるだろう。

遺伝子組換え植物による PHA 生産システムは、空気と水と光からプラスチックを生み出す夢の技術であり、実用化するためには蓄積量の増加と共重合体の合成経路の確立が主な課題である。今までに作られた PHA 生産植物のほとんどは、*phaABC* 遺伝子を発現させただけの

単純なもので、今後、代謝経路の改変や新たな宿主の開発、および進化酵素の応用により、PHAを高蓄積できる組換え植物が創出できると期待される。

6 おわりに

炭素循環に組み込まれるPHA生産システムは、再生可能資源を原料に合成するという入口とPHA製品が生分解されるという出口の部分で、環境保全に大きく貢献する。あとは、いかにこの間を繋ぐプロセス技術を磨くかが鍵である。ポリエチレンをはじめとする石油系汎用プラスチックが、長い年月をかけて製造プロセスを進化させてきたかを考えると、焦らずに多くの研究分野の研究者、技術者が結集して取り組むことが大切である。第三世代PHA生産法に位置づけられる酵素進化工学の導入により生産コストの低下と物性の向上に貢献できることを紹介した。第二世代PHA生産法でのライフサイクルアセスメントでは、300円/kg程度のコストで生産でき、かつ石油系プラスチックに比べて環境負荷が少なくと試算されている⁴²⁾ことから、大きく期待できる。さらに、究極のPHA生産法は、太陽エネルギーを利用して二酸化炭素から直接PHAを合成することであり、微生物PHA生産法の発展研究が、そのための試金石となるであろう。本稿で紹介した研究が、このような環境分子科学分野に多くの人から関心をもっていただき、協力いただける端緒となれば幸いである。最後に、紹介した著者らの研究の多くは、科学技術振興事業団基礎的研究発展プロジェクト (SORST)「高性能バイオプラスチックの生産システムの確立」およびNEDO産業技術研究助成事業「バイオポリエステル効率的生産系の開発と高機能化」の一環としておこなわれた。共同研究者の方々に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Y. Doi, *Microbial Polyesters*, VCH Publisher, New York (1990).
- 2) Y. Doi, *Macromol. Symp.*, **98**, 585 (1995).
- 3) 田口精一, 岩田忠久, グリーンプラスチック材料技術と動向, 大島一史監修, シーエムシー出版, pp.16-23 (2005).
- 4) 田口精一, 化学工業, **56**, 468-72 (2004).
- 5) K. Taguchi, *et al.*, *Biopolymers*, (Y. Doi, A. Steinbüchel, ed.), **6**, 217-47, Wiley-VCH, Weinheim (2001).
- 6) 松崎弘美, 田口精一, 土肥義治, 日本油化学会誌, **48**, 1353-64 (1999).
- 7) T. Fukui & Y. Doi, *J. Bacteriol.*, **179**, 4821 (1997).
- 8) T. Fukui, N. Shiomi & Y. Doi, *J. Bacteriol.*, **180**, 667 (1998).
- 9) B.H.A. Rehm, N. Krüger & A. Steinbüchel, *J. Biol. Chem.*, **273**, 24044-51 (1998).
- 10) K. Matsumoto, H. Matsusaki, S. Taguchi, M. Seki & Y. Doi, *Biomacromolecules*, **2**, 142-7 (2001).
- 11) A. Maehara, S. Ueda, H. Nakano & T. Yamane, *J. Bacteriol.*, **181**, 2914-21 (1999).
- 12) U. Piper-Fürst, M.H. Madkour, F. Mayer & A. Steinbüchel, *J. Bacteriol.*, **176**, 4328-37 (1994).
- 13) A. Maehara, S. Taguchi, T. Nishiyama, T. Yamane & Y. Doi, *J. Bacteriol.*, **184**, 3992-4002 (2002).
- 14) 田口精一, 蛋白質 核酸 酵素, 共立出版, **50**, 262-9 (2005).
- 15) G.M. York, J. Stubbe & A.J. Sinskey, *J. Bacteriol.*, **184**, 59-66 (2002).
- 16) B.H.A. Rehm, *Biochem. J.*, **376**, 15-33 (2003).
- 17) W. Tuan, Y. Jia, J. Tian, K. D. Shell, U. Muh, A.J. Sinskey, R. H. Lambalot, C. T. Walsh & J. Stubbe, *Arch. Biochem. Biophys.*, **394**, 87-98 (2001).
- 18) O.P. Peoples & A.J. Sinskey, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15298-303 (1989).
- 19) G.J. Mccool & M.C. Cannon, *J. Bacteriol.*, **183**, 4235-43 (2001).
- 20) Y. Satoh, N. Minamoto, K. Tajima & M. Munekata, *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 343-50 (2002).
- 21) T. Hisano, T. Tsuge, T. Fukui, T. Iwata, K. Miki & Y. Doi, *J. Biol. Chem.*, **278**, 617-24 (2002).
- 22) T. Tsuge, T. Hisano, S. Taguchi & Y. Doi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4830-6 (2003).
- 23) C. Nomura, K. Taguchi, S. Taguchi & Y. Doi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 999-1007 (2003).
- 24) S. Taguchi, A. Maehara, K. Takase, M. Nakahara, H. Nakamura & Y. Doi, *FEMS. Microbiol. Lett.*, **198**, 65-71 (2001).
- 25) S. Taguchi, H. Nakamura, T. Hiraishi, I. Yamato & Y. Doi, *J. Biochem.*, **131**, 801-6 (2002).
- 26) T. Kichise, S. Taguchi & Y. Doi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2411-9 (2002).
- 27) K. Takase, S. Taguchi & Y. Doi, *J. Biochem.*, **133**, 139-45 (2003).
- 28) K. Takase, K. Matsumoto, S. Taguchi & Y. Doi, *Biomacromolecules*, **5**, 480-5 (2004).
- 29) K. Matsumoto, K. Takase, E. Aoki, Y. Doi & S. Taguchi, *Biomacromolecules*, **6**, 99-104 (2005).
- 30) 田口精一, 土肥義治, 化学工業, **53**, 22-8 (2002).
- 31) 田口精一, 日本農芸化学会誌, **78**, 748-50 (2004).
- 32) S. Taguchi & Y. Doi, *Macromol. Biosci.*, **4**, 145-56 (2004).
- 33) T. Tsuge, Y. Saito, Y. Kikkawa, T. Hiraishi & Y. Doi, *Macromol. Biosci.*, **4**, 238-42 (2004).
- 34) T. Tsuge, Y. Saito, M. Narike, K. Muneta, Y.M. Normi, Y. Kikkawa, T. Hiraishi & Y. Doi, *Macromol. Biosci.*, **4**, 963-70 (2004).
- 35) T. Tsuge, K. Yano, S. Imazu, K. Numata, Y. Kikkawa, H. Abe, S. Taguchi & Y. Doi, *Macromol. Biosci.*, **5**, 112-7 (2005).
- 36) B.H.A. Rehm, R.V. Antonio, P. Spiekermann, A.A. Amara & A. Steinbüchel, *Biochim. Biophys. Acta*, **1594**, 178-90 (2002).
- 37) A.A. Amara, A. Steinbüchel & B.H.A. Rehm, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **59**, 477-82 (2002).
- 38) D.S. Shen & C.Y. Lee, *J. Bacteriol.*, **186**, 4177-84 (2004).

- 39) N. Niamsiri, S.C. Delamarre, Y.-R. Kim & C.A. Batt, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6789-99 (2004).
 - 40) Y.M. Normi, T. Hiraishi, S. Taguchi, H. Abe, K. Suresh, N. Najimudin & Y. Doi, *Macromol. Biosci.*, **5**, 197-206 (2005).
 - 41) Y.M. Normi, T. Hiraishi, S. Taguchi, H. Abe, K. Suresh, N. Najimudin & Y. Doi, *Biotech Lett.*, (2005) in press.
 - 42) 田口精一, 柘植丈治, 土肥義治, 化学経済, **51**, 32-8 (2004).
 - 43) Y. Poirier, D. Dennis, K. Klomparens & C. Somerville, *Science*, **256**, 520-3 (1992).
 - 44) H.E. Valentin, *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 303-6 (1999).
 - 45) C. Nawarath, Y. Poirier & C. Somerville, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12760-4 (1994).
 - 46) K. Matsumoto, R. Nagao, T. Murata, Y. Arai, T. Kichise, H. Nakashita, S. Taguchi, H. Shimada & Y. Doi, *Biomacromolecules*, **6**, 2126-30 (2005).
 - 47) V. Mittendorf, E.J. Robertson, R.M. Leech, A. Steinbüchel & Y. Poirier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13397-402 (1998).
 - 48) Y. Arai, H. Nakashita, Y. Suzuki, Y. Kobayashi, T. Shimizu, M. Yasuda, Y. Doi & I. Yamaguchi, *Plant Cell Physiol.*, **43**, 555-62, (2002).
-