

新規酵素探索による未利用資源を利用した 生分解性プラスチックの微生物合成系の構築

岩手大学 農学部 山田美和

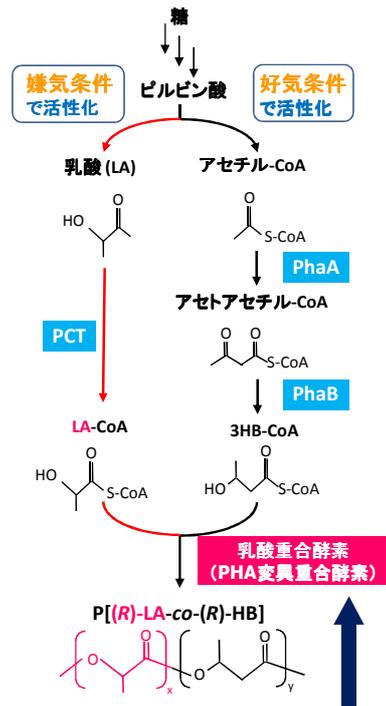


はじめに

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。バイオプラスチックは、植物由来の原料から合成できるため、石油を原料としないことや、生分解性を持つものが多いことから、これらの問題を解決できると期待できる。しかし、ポリ乳酸 (PLA)をはじめとした多くのバイオプラスチックの原料は、植物由来ではあるが、プラスチックを合成する際に、準備したモノマーをポリマーへと重合する化学重合のステップが必要である。化学重合では、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、本研究では、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 polyhydroxyalkanoate (PHA)の合成系に注目した。本プロセスでは、モノマー供給からポリマー重合というプラスチックを合成する際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、化学重合で必要な重金属触媒を必要としない。本研究では、市場で最も出回っており、従来化学重合されている PLA のオールバイオプロセス合成を目指してきた。

乳酸モノマーユニット重合酵素の探索と発見

乳酸ポリマーの合成を実現するため、PHA の微生物合成経路をモデルとして、図 1 のような代謝系をデザインした。これまでに乳酸モノマーを重合可能な重合酵素(乳酸重合酵素)の報告は一切なかったため、はじめに、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て、天然および変異 PHA 重合酵素を対象とした乳酸重合酵素の探索を行った。結果、筆者が博士課程で所属していた北海道大学工学研究科の田口精一教授が、これまでの研究で作製してきた膨大な数の PHA 重合酵素変異体ライブラリーより、ひとつの PHA 重合酵素変異体を乳酸重合酵素として見出した。得られた乳酸重合酵素遺伝子と、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 ユニットが 6 mol% 導入された共重合ポリマーP(LA-co-3HB)の生合成に成功した[1]。



培養条件の検討および新規乳酸重合酵素の創製による多様なLA分率の乳酸ポリマー合成

最初に合成した乳酸ポリマー中の LA 分率は、6 mol% と低かったため、LA ユニット分率を増加させるために、嫌気条件下で菌体を培養し、図 1 の代謝経路における乳酸の供給量を増加するという方法で、モノマーである LA-CoA の供給量増加を促した。結果、共重合ポリマー中の LA ユニット分率が飛躍的に上昇した P(47 mol% LA-co-3HB)を合成した[2]。

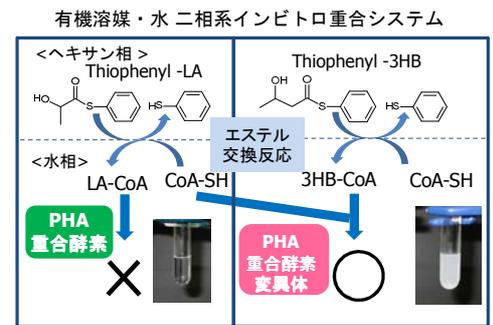


図 1. 乳酸ポリマーの生合成経路および乳酸重合酵素のアッセイ系

次いで、乳酸重合酵素に焦点を当て、乳酸重合酵素に新たな変異を導入し、LA 重合能力の高い乳酸重合酵素を創製することを目指した。これまでに、唯一見つかった乳酸重合酵素は、野生型 PHA 重合酵素の 3HB-CoA 重合能を向上させる変異を導入した重変異体であった。そこで、本知見から PHA 重合酵素における 3HB-CoA 重合能力をさらに向上させれば、LA-CoA 重合能力の増強につながるのではないかと考え、3HB-CoA 重合能を向上させると報告されていた変異を乳酸重合酵素に導入した。結果、従来の乳酸重合酵素よりも、LA 分率が向上した新規乳酸重合酵素を創製することに成功した。本重合酵素と嫌気培養を組み合わせることで、62 mol% まで向上した乳酸ポリマーの合成に成功した(図 2)。さらに、新規変異点におけるアミノ酸飽和変異導入を行うことで、16~45 mol%と幅広い範囲で LA 分率が調節された P(LA-co-3HB)を合成することができた。

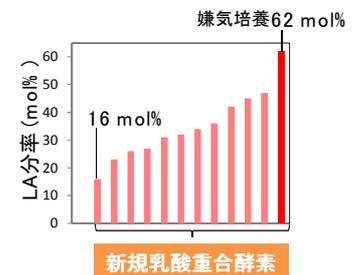


図 2. 新規乳酸重合酵素による多様な LA 分率の乳酸ポリマー合成

合成された乳酸ポリマーの性質

本ポリマーの NMR による構造分析の結果、LA-LA-LA の連鎖配列が確認され、発見した乳酸重合酵素が LA と LA を連続重合する能力を持つことが示された[2]。さらに、構成モノマーの光学異性について、ポリマーをモノマー単位にまで加水分解して分析し、本ポリマーが、100% (R)体の LA からなることを明らかとした。この結果によって、酵素触媒を利用した本プロセスは、光学純度の極めて高いポリマーが合成可能であることを示すことができた[2, 3]。また、これまで PLA の性質として、硬さが課題であったが、熱的性質分析から、本ポリマーが柔軟性を持つポリマーである可能性を示唆することができた[3]。実際、機械的性質を調査した結果、期待通りに、P(LA-co-3HB)は、PLA および P(3HB)と比較して、柔軟性の向上が示された[4]。さらに、PLA の特徴的な長所として、透明性の高さが上げられるが、乳酸ポリマーのフィルムを作製し、透明度を比較した結果、P(LA-co-3HB)は、P(3HB)よりも高い透明度を示し、半透明性を示した(図 3)。

今後は、これまでの研究ノウハウを生かして、従来化学合成されてきた乳酸モノマーユニット以外の化学構造を有するバイオプラスチックの微生物合成系の構築を目指している。特に、未利用資源を利用した系の構築を念頭に置いて、現在必要な酵素の探索を進めている。

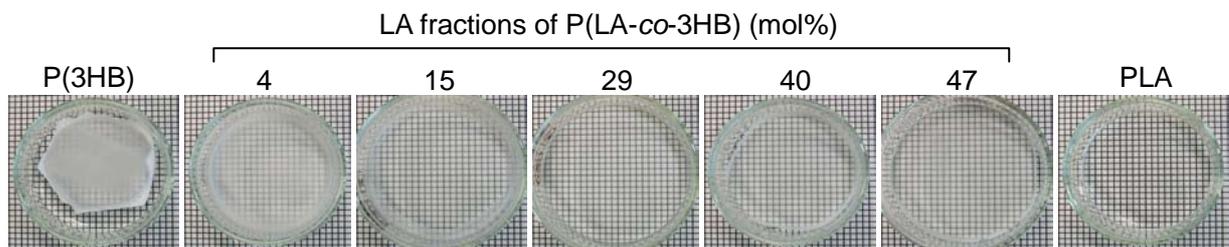


図 3. LA 分率の乳酸ポリマーと P(3HB)および PLA フィルムとの透明性の差

[参考文献]

1. Taguchi, S.; Yamada, M.; Matsumoto, K.; Tajima, K.; Satoh, Y.; Munekata, M.; Ohno, K.; Kohda, K.; Shimamura, T.; Kambe, H.; Obata, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, 105, 17323-17327.
2. Yamada, M.; Matsumoto, K.; Nakai, T.; Taguchi, S., *Biomacromolecules* **2009**, 10, 677-681.
3. Yamada, M.; Matsumoto, K.; Shimizu, K.; Uramoto, S.; Nakai, T.; Shozui, F.; Taguchi, S., *Biomacromolecules* **2010**, 11, 815-819.
4. Yamada, M.; Matsumoto, K.; Uramoto, S.; Motohashi, R.; Abe, H.; Taguchi, S., *J. Biotechnol.* **2011**, 154, 255-260.