

酵素進化学による多様なバイオプラスチックの創製

Biosynthesis of bioplastics with desired properties by enzyme directed evolution

北海道大学大学院工学研究科

田口 精一 Seiichi TAGUCHI

Key words: polyhydroxyalkanoate; bioplastic; directed evolution; copolymerization; substrate specificity

1. はじめに

“水の惑星”地球ができるだけみずみずしく長生きできるように、再生可能バイオマスから環境・生体に調和するバイオプラスチックの創製に取り組んでいる。筆者らが研究開発しているバイオプラスチックは、微生物が合成し分解するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) で、環境に優しい資源循環型材料である^{1), 2)}。PHA の生産プロセスは、PHA 生産天然微生物の培養工学 (第一世代)、遺伝子組換え微生物の分子育種 (第二世代)、そして PHA 合成酵素群の進化学 (第三世代) と、変遷して発展してきた^{3), 4)}。筆者らは、従来の汎用合成プラスチックが化学触媒の改良によって大きく進展してきたアナロジーで、生体触媒「酵素」の進化学を通じて、バイオプラスチックの高性能化・高生産化を実現しようとしている。本稿では、PHA 合成酵素を進化学とタンパク質工学によって“磨き”、PHA 生産に有効利用するという最近の取り組みについて紹介する。

2. バイオプラスチック合成に必要な酵素群

図1に示すように、微生物細胞内での PHA の生合成は、モノマー供給系酵素と重合酵素の2種類の酵素の連携によって成立し、両酵素の活性・基質特異性によって生成するポリマーの蓄積量・モノマー組成比 (プラスチックの物性に反映) が規定される⁵⁾。モノマー供給系酵素には、アセチル CoA を2量化 (PhaA) し還元 (PhaB) する酵素群、脂肪酸分解中間体をチャネリングする水和酵素 (PhaJ)、*de novo* 脂肪酸合成系から供給する酵素 (PhaG) などが同定されている。重合酵素は、1次構造と基質特異性から三つのタイプに分類されており、50種類以上の遺伝子配列が明らかにされている¹⁾。これら酵素遺伝子を合理的に組み合わせ、PHA 代謝経路をプラスチック生産微生物細胞内に構築することになる。

3. モノマー供給酵素のタンパク質工学

モノマー供給系酵素としてβ脂肪酸酸化系に見いだされた水和酵素 (R 体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ, PhaJ) は、分解能 1.5 Å で X 線結晶構造解析に成功し

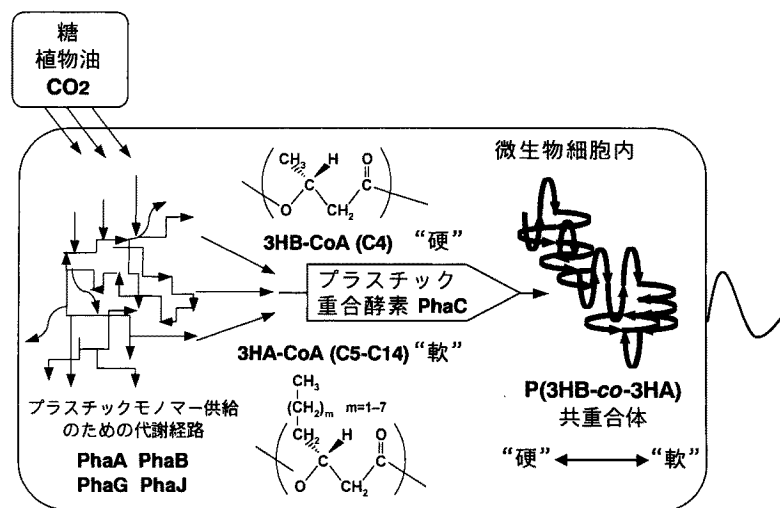


図1 微生物細胞内でのバイオプラスチック PHA の生合成
再生可能炭素資源を取り込んだ後、各種代謝経路によって生成した各種モノマーユニットが最終的に重合酵素によって共重合化される。

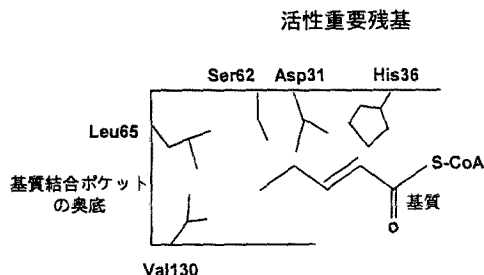


図2 モノマー供給酵素 PhaJ (R 体特異的エノイル CoA 水和酵素) の基質結合ポケットの模式図

た⁶⁾。精密立体構造から、基質結合ポケットの最も深い部分には、65 番目の Leu と 130 番目の Val が位置していることが推定された (図2)。本酵素は、本来基質特異性が狭く、炭素鎖数 4 と 6 の基質に対しては高い活性を示すが、それ以上の炭素鎖数の基質に対してほとんど活性を示さない。そこで、基質挿入の立体障害を考慮して、各部位において小さなアミノ酸へ変換した変異酵素 (L65A と V130G) を遺伝子工学的に作製し、*in vitro* および *in vivo* での基質特異性の変化を調べた。その結果、いずれの変異酵素も期待どおりより長鎖のモノマー基質をも取り込めるようになることが、合成基質を使用した反応速度論解析 (*in vitro*) および PHA 共重合組成の分析 (*in vivo*) によって実証された⁷⁾。この立体構造に立脚した分子設計は、PHA 合成酵素のタンパク質工学研究の先駆的な例である。

4. 重合酵素の進化学

まず、最も生化学的解析が進められている *Ralstonia eutropha* 由来重合酵素をモデルターゲットに選定した。進化分子工学⁸⁾の手順を簡単に述べる。最初に、重合酵素遺伝子のみランダム変異を誘発し、P(3HB) 合成用のモノマー酵素遺伝子群とセットにした形で大腸菌を用いて変異

体ライブラリーを作製する。次いで、細胞内のポリエステルを特異的に染色する色素を利用したプレートアッセイ (1 次スクリーニング) と多検体処理可能な定量的 HPLC 分析 (2 次スクリーニング) に、変異体集団を順次投入し、目的の変異クローンをハイスループットスクリーニングするというものである。最終的に、P(3HB) の細胞内蓄積率と P(3HB) 重合酵素活性との間に相関性が成立し、微生物の PHA 蓄積率をモニタリングするだけで目的の高活性酵素を選抜できる「インビボモニタリングシステム」を確立することができた⁹⁾。最近、あるトリックを取り入れて野生型酵素よりも高活性な変異体 (2.4 倍) を取得することに初めて成功した¹⁰⁾。通常、野生型酵素から直接進化させる場合、野生型酵素の活性がある程度高いので、野生型酵素と高活性変異酵素の活性を識別することが困難なことが多い。微生物体内で PHA 生産させる場合には、「モノマー供給律速」と「細胞内ポリマー蓄積の物理的制約」という二つの課題を克服する必要があった。そこで、野生型酵素から一度意図的に活性低下させ (“先祖返り”), そこから新たに野生型活性を超越する人工進化 (活性復帰変異) を実施することで、positive selection の形で優良変異を特定するという方法論を採用した¹¹⁾。

次に、P(3HB-co-3HHx) 共重合体を合成できる *Aeromonas caviae* 由来重合酵素をターゲットとした。先に確立したインビボモニタリングシステムを基盤としてさらに改良した点は、P(3HB) ホモポリマーの生産性で多くの変異体の酵素活性レベルを評価した後、β酸化系に変異を有する大腸菌 LS5218 株で、P(3HB-co-3HHx) 共重合体を脂肪酸から合成させる系に連動させることである。したがって、使用した遺伝子発現ベクター中には、P(3HB) ホモポリマー合成用と P(3HB-co-3HHx) 合成用の 2 種類の遺伝子発現セットが搭載してある。この改良型進化分子工学シス

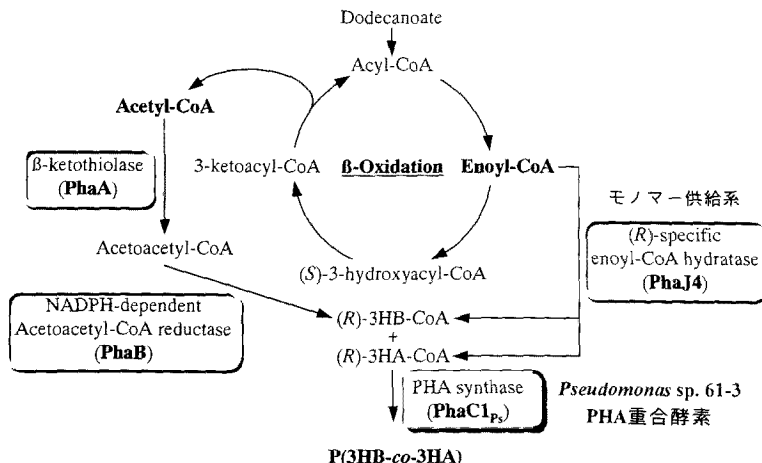


図3 P(3HB-co-3HA) 共重合体を合成するための代謝経路
脂肪酸β酸化経路を基盤としたモノマー供給系を大腸菌内に構築した。

テムによって、高活性変異体そして基質特異性が変化したと推定される変異体が獲得でき、これら進化酵素を用いて P(3HB-co-3HHx) の生産性が増強され、また 3HB ユニットと 3HHx ユニットの組成比がさまざまに変化した共重合体を作製することができた⁴⁾。

さらに、3HB をベースとした多成分モノマーユニットを含む PHA 共重合体を合成できる *Pseudomonas* sp. 61-3 重合酵素を対象に、望みの共重合組成 (3HB とそれ以外のモノマーユニットとのモル比) を有する PHA の合成を実現する進化酵素の創成を目指した。本酵素は、3HB 基質取り込み能力が微弱であるという課題があったので、この性質を逆に利用して、3HB だけからなる P(3HB) ホモポリマーの蓄積能力が向上する (3HB に対する基質特異性向上あるいは全活性の向上) ということを指標としたスクリーニング系を構築した。この人工進化実験の特徴は、野生型酵素だと微量のポリマーしか蓄積できないことを利用して、より多くポリマー蓄積する進化酵素保有大腸菌株を精度高く識別できるという点にある (ポジティブセレクション)。人工進化実験により複数特定された各優良変異点において、総アミノ酸置換を実施した。その結果、3HB を含む短鎖基質特異性に関与する部位、または基質鎖長に依存せず全活性上昇に貢献する部位を浮き彫りにすることができた^{12), 13)}。

以上のことから、ある物性を発現するための共重合 PHA の特定モノマー組成比が要請された場合、“カスタムメイド的”に提供できる変異重合酵素を品揃いすることがたいへん威力を発揮することがわかる¹⁴⁾。現在、同時にポリマーの分子量制御を可能にする進化酵素も単離されつつあり、この路線で多様な性質を有する変異重合酵素の「バンク作り」を精力的に行っている。

おわりに

今回紹介した研究は、いずれ二酸化炭素と水から光合成能力をもつらん藻や植物で直接バイオプラスチックを作らせる「究極の PHA 生産リサイクルシステム」の基盤になると期待される¹⁵⁾。その実現のために本稿で紹介した進化分子工学研究が寄与できればと願っている。本研究は、科学技術振興事業団の基礎的研究発展プロジェクト「高性能バイオプラスチック生産システムの確立」(統括責任者: 土肥義治東京工業大学大学院教授・理化学研究所招聘主任研究員)の一環として行われた。

- 1) 松崎弘美, 田口精一, 土肥義治: 日本油化学会誌, **48**, 1353-1364 (1999).
- 2) 田口精一, 田口一徳, 土肥義治: プラスチックエージ (進歩編), 131-138 (2000).
- 3) 田口精一, 土肥義治: 化学工業, **53**, 22-28 (2002).
- 4) 田口精一: バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 30-31 (2002).
- 5) K. Taguchi, S. Taguchi, K. Sudesh, A. Maehara, T. Tsuge, and Y. Doi: *Biopolymers*, **3a**, 217-247 (2002).
- 6) T. Hisano, T. Tsuge, T. Fukui, T. Iwata, K. Miki, and Y. Doi: *J. Biol. Chem.*, **278**, 617-624 (2002).
- 7) T. Tsuge, T. Hisano, S. Taguchi, and Y. Doi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4830-4836 (2003).
- 8) 田口精一: 生命工学, 第五章 進化学, 共立出版, 2000, pp. 134-154.
- 9) S. Taguchi, A. Maehara, K. Takase, M. Nakahara, and Y. Doi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **198**, 65-71 (2001).
- 10) S. Taguchi, H. Nakamura, T. Hiraishi, I. Yamato, and Y. Doi: *J. Biochem.*, **131**, 801-806 (2002).
- 11) T. Kichise, S. Taguchi, and Y. Doi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2411-2419 (2002).
- 12) K. Takase, S. Taguchi, and Y. Doi: *J. Biochem.*, **133**, 139-145 (2003).
- 13) K. Takase, K. Matsumoto, S. Taguchi, and Y. Doi: *Biomacromolecules*, **5**, 480-485 (2004).
- 14) S. Taguchi and Y. Doi: *Macromol. Biosci.*, **4**, 145-156 (2004).
- 15) 田口精一, 柘植丈治, 土肥義治: 化学経済, **51**, 32-38 (2004).