

バイオプラスチック生産のための微生物工場

Microbial Factory for the Production of Bioplastics

山田 美和・松本 謙一郎・田口 精一

1. はじめに

生物の最小単位である細胞は、化学反応の「総合デパート」と呼ばれることがある。細胞の中をのぞき、いろいろと調べてみると、多彩な生体分子群によって精妙に繰り広げられる多種多様な化学反応に圧倒される。一番驚くのは、それぞれの化学反応が互いに事故を起こさずに、調和的に運用されて、生命システムを恒常的に支えていることである。まさに、マイクロオーダーの精密工場である。今、世界的に地球環境保全に対する関心が急速に高まり、石油などの化石燃料依存の化学産業は、微生物などの生体触媒を用いた産業「ホワイトテクノロジー」へと技術革新を迫られている。「微生物によるものづくり」を重要課題として取り組む時代に突入しているのである。

従来、微生物は発酵とセットで語られ、発酵醸造に基礎を置く食品産業や抗生物質生産をはじめとする医療分野と密接に関係してきた。ところが、微生物発酵の現象や代謝産物にのみ焦点が当てられ、微生物細胞内の分子の動きに関してはブラックボックスの部分が多かった。そこで、最近、遺伝子工学技術の発展、ゲノム解析情報の集積、そして生体触媒である酵素の機能解明に伴い、不透明な中身が大分明らかになり、さながらガラス張りのオルゴールを見るような視線で、そのマイクロ微生物工場を解剖・俯瞰できるようになってきた。システムの理解は、システムのコントロールそして利用へと技術発展するのは必然である。

本稿では、微生物によって合成され、分解されるバイオプラスチックについて話題提供する。今からおよそ80年前に、微生物学研究のメッカ、仏国ルイパスツール研究所で発見された微生物プラスチックが、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)である。本来エネルギー貯蔵物質として自らの生命維持に必要と考えられている非常食ポリマーが、ひとたび人間の手にかかると便利なプラスチックに変身するとは、自然の恵みに感謝である。その後、ポリマーとしての構造機能研究が進み、(1)PHA生産菌によるポリマー生産の培養工学的最適化(第一世代)、(2)遺伝子工学技術の導入による、PHA合成の仕組み(代謝経路という)の解明と効率的生産(第二世代)、(3)酵素進化工学によるPHAの生産性強化および物性改変(第三世代)、というバイオテクノロジー貢献の変遷を経ている。このような背景と研究基盤をもつPHA生産研究を、「PHA微生物工場」という観点から、各要素技術の解説から生産最適化に貢献するシステム構築のあり方に至るまで紹介する。

2. バイオプラスチック「PHA」とは

PHAは、図1に示すように、糖や油脂などのバイオマスから微生物によって合成されるバイオプラスチックである^{1,2,3}。PHAの合成プロセスは、ポリ乳酸(PLA)など化学合成プロセスを経て合成されるバイオプラスチックとは異なり、微生物細胞中で合成が全て行われる「オールバイオプロセス」で生産される事が大きな特徴である。よって、PLA等の他のバイオプラスチックと比べて、生産ステップが少なくなることに加え、原料となる炭素源を高純度に精製する必要がないことから、プロセスエネルギーの削減が期待できる。また、PHAは、生体触媒である酵素を利用しているため、PLAの化学重合プロセスで使用される有害な金属触媒を使用しないで済む。微生物発酵により生産されたPHAは、菌体から抽出・精製され、様々な用途



MIWA YAMADA
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
博士課程2年 修士(工学)
〒060-8628 北海道札幌市北区北13条
西8丁目
Tel: 011-706-6612
E-mail: mi1118wa@eng.hokudai.ac.jp
〈専門〉分子生物学、微生物学
〈趣味〉格闘技観戦、温泉



KEN-ICHIRO MATSUMOTO
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
助教 博士(工学)
〒060-8628 北海道札幌市北区北13条
西8丁目
Tel: 011-706-6612
E-mail: mken@eng.hokudai.ac.jp
〈専門〉分子生物学、植物科学
〈趣味〉アクアリウム



SEIICHI TAGUCHI
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
教授 博士(工学)
〒060-8628 北海道札幌市北区北13条
西8丁目
Tel: 011-706-6610 Fax: 011-706-6610
E-mail: staguchi@eng.hokudai.ac.jp
〈専門〉分子生物学、生化学、学生ス
ウィッチ学
〈趣味〉Wii Fit

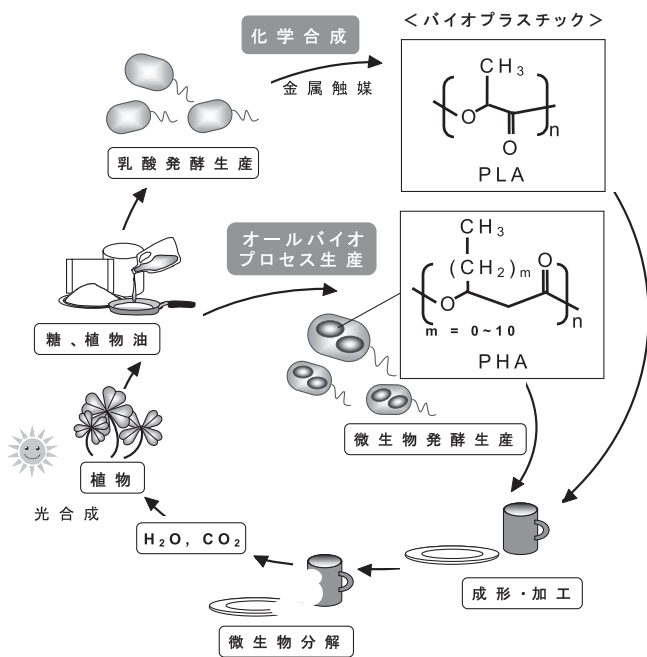


図1 バイオプラスチックの合成プロセス

に応じた形成加工が可能である。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、植物の光合成により再び糖へと還元される。よって、PHAは、資源循環型の環境調和素材であるといえる。現在、石油系プラスチックの焼却処理によって大気中の二酸化炭素濃度が上昇することが問題視されていることから、PHAを石油系プラスチックの代替品として利用すれば、プラスチック産業で生じる環境負荷を軽減できると期待される。

3. PHA 微生物工場とその利用技術

微生物工場におけるPHA生産過程は、図2に示すように、「①原料の資化」→「②各代謝経路からのモノマー供給」→「③重合酵素によるモノマーの重合」の各段階からなる。

微生物工場で炭素源として利用するバイオマスは、食糧生産と競合せず、安価で入手が容易なものが望ましいため、廃棄バイオマスの利用が有力視されている。さらに、効率

的なPHA生産のためには、その炭素源を利用して菌が良く増殖する必要がある。したがって、微生物工場では使用する原料と微生物とのマッチングが非常に重要である。たとえば、水素細菌 *Ralstonia eutropha* や *Pseudomonas* 属の土壌細菌は油を資化する能力が高いため、廃調理油や、バイオディーゼルの生産時に発生する廃油など、脂質や脂肪酸を炭素源としたPHA生産に用いることができる³⁾。また、後述するように、最近我々が注目しているコリネ菌 (*Corynebacterium glutamicum*) は、糖の資化能力が非常に高く、糖を含む廃バイオマスを利用した物質生産に利用されている。

典型的なPHAのモノマーには、炭素鎖の短いヒドロキシブチリル(HB)CoAと炭素鎖の長いヒドロキシアシル(HA)CoAがある³⁾。これらのモノマーの供給経路は、類似の化学構造を有する脂肪酸からβ酸化系によって供給される経路と、アセチルCoAから *de novo* 合成される経路に大別される。多くのPHA生産菌はアセチルCoAから二段階の反応でHB-CoAモノマーを供給する経路を持ち、HBのホモポリマーであるポリヒドロキシブタン酸(PHB)を合成する。アセチルCoAは微生物体内に普遍的に存在するため、この経路は多くの宿主で利用できる。一方、*R. eutropha* や *Pseudomonas* 属のPHA生産細菌は脂肪酸β酸化系の中間体からHA-CoA(およびHB-CoA)を供給する酵素を有しているため、脂肪酸やその誘導体を炭素源として、HAモノマーを含むPHAを合成することができる。側鎖のアルキル基に官能基を有する脂肪酸を炭素源とすると、その官能基を側鎖に有するPHAを合成できる。後述するように、この経路は様々な構造のポリマーを合成するために利用できる。

最終段階では、供給されたモノマーがPHA重合酵素の重合反応によってポリマーに変換される。HB-CoAに対してのみ基質特異性を有するPHA重合酵素はPHBを合成し、幅広い基質特異性を有する酵素はHBとHAの共重合体を合成する。共重合体においては、PHA重合酵素の基質特異性がHBとHAの分率に強く影響する^{2,3)}。共重合体のモノマー組成は、材料の物性を左右する因子の一つであ

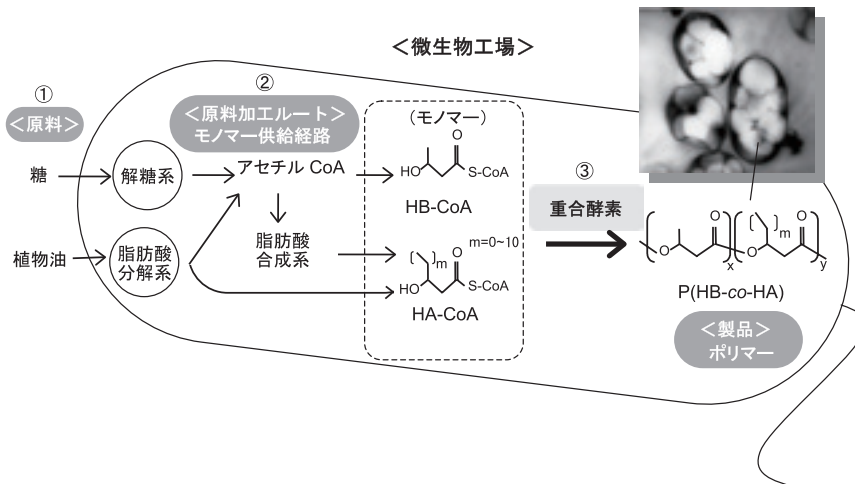


図2 微生物工場におけるPHA生産過程

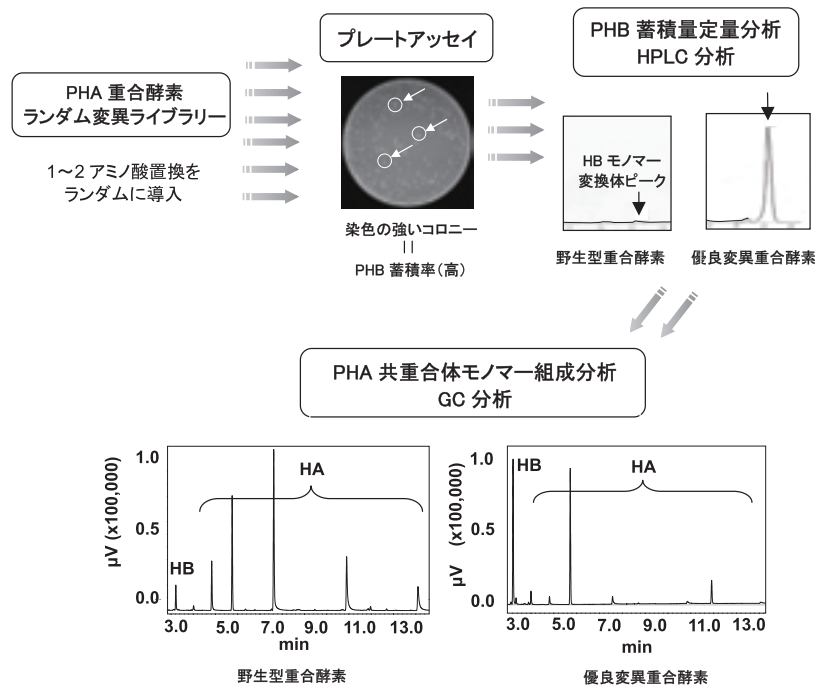


図3 PHA 重合酵素の分子進化実験

るため、重合酵素の基質特異性は応用上極めて重要である。さらに PHA 重合酵素の活性は、PHA の生産量に影響する。そのため、PHA 重合酵素は微生物工場の性能を決定するキーファクターであるといえる。

先に述べたように、微生物工場を設計する上では、インフラに相当する微生物宿主と、工場に導入する機械に相当する酵素の選択が重要である。遺伝子工学技術の発展に伴い、微生物工場内に使用したい機械を選びこむことが可能となっている。このとき、性能の高い機械を用いれば、工場の生産性および製品の品質を高くできることは自明のことである。PHA の合成系遺伝子群が同定されて以降、天然から優れた性質を持つ酵素を探索する研究が盛んに行われてきたが、工業生産に適した酵素を発見することは困難であった。そこでわれわれは、「分子進化」の手法を用いて、天然の酵素をより使いやすいものに改良する手法を開発した^{4,5)}。この機械の「改良」により、微生物工場の性能を向上させることを目指したのである。

4. 進化型重合酵素でポリマーの生産性と物性を向上させる

PHA は、結晶性が高く硬さに寄与する HB ユニットと、結晶性が低く柔らかさに寄与する HA ユニットとの比率を変えて共重合化することにより、結晶性の高いプラスチックから弾性に富むゴムまで、多様な物性を示す PHA を合成できることが知られている。モノマー組成を支配する PHA 重合酵素の基質特異性を調節することができれば、合成される PHA の物性をコントロールすることが可能となる。

われわれが使用している野生型の PHA 重合酵素は、幅広い基質特異性を有する反面、HB ユニットの重合能力が微弱なため、HB ユニットの主成分とする共重合体の合成

に限界があった。そこで、酵素の分子進化により HB 重合能力を改善することを目指した^{4,5)}。酵素機能を改変する手法としては、酵素の立体構造をもとに、改変酵素の分子設計を試みる方法が一般的であるが、PHA 重合酵素の立体構造が未解明であったため、酵素遺伝子のランダム変異体ライブラリーの中から、優良変異体を選抜する方法をとった^{6,7)}。ライブラリーを導入した大腸菌が合成した PHB の蓄積率を指標としてスクリーニングを行うことで、HB の重合能力の高い変異酵素を選抜することを検討した。その結果、多くの優良変異体を取得することができ、PHB の蓄積率を野生型と比較して 720 倍まで上昇させることができた(図 4A)⁷⁾。次に、これらの変異酵素を用いて、共重合体を合成した。野生型酵素が合成する共重合ポリマー中の HB 分率が 14% であるのに対して、HB 分率が 70% まで幅広く増加した共重合体が合成された(図 4B)⁷⁾。PHA 重合酵素の分子進化により、酵素の基質特異性を変換し、共重合 PHA のモノマー組成を広範囲かつ微細に変化させることができた。

さらに興味深いことに、変異酵素によって合成された PHA の分子量を測定すると、野生型重合酵素と比べて重量平均分子量が 1 桁以上変化していたことが明らかとなった(図 4C)^{8,9)}。分子量は材料の強度に影響する因子である。PHA フィルムや繊維の強度を上げるための加工法には、延伸操作による方法があるが、この際、分子量の大きな PHA は、高い延伸率に耐えられるため、力学的強度を大幅に改善できる。分子量が変化するメカニズムはまだ解明されていないが、PHA 重合酵素の改変により、分子量が制御できれば、非常に強靱な材料の合成も可能になるかもしれない。

ここまで述べてきたように、これらの変異酵素(進化型

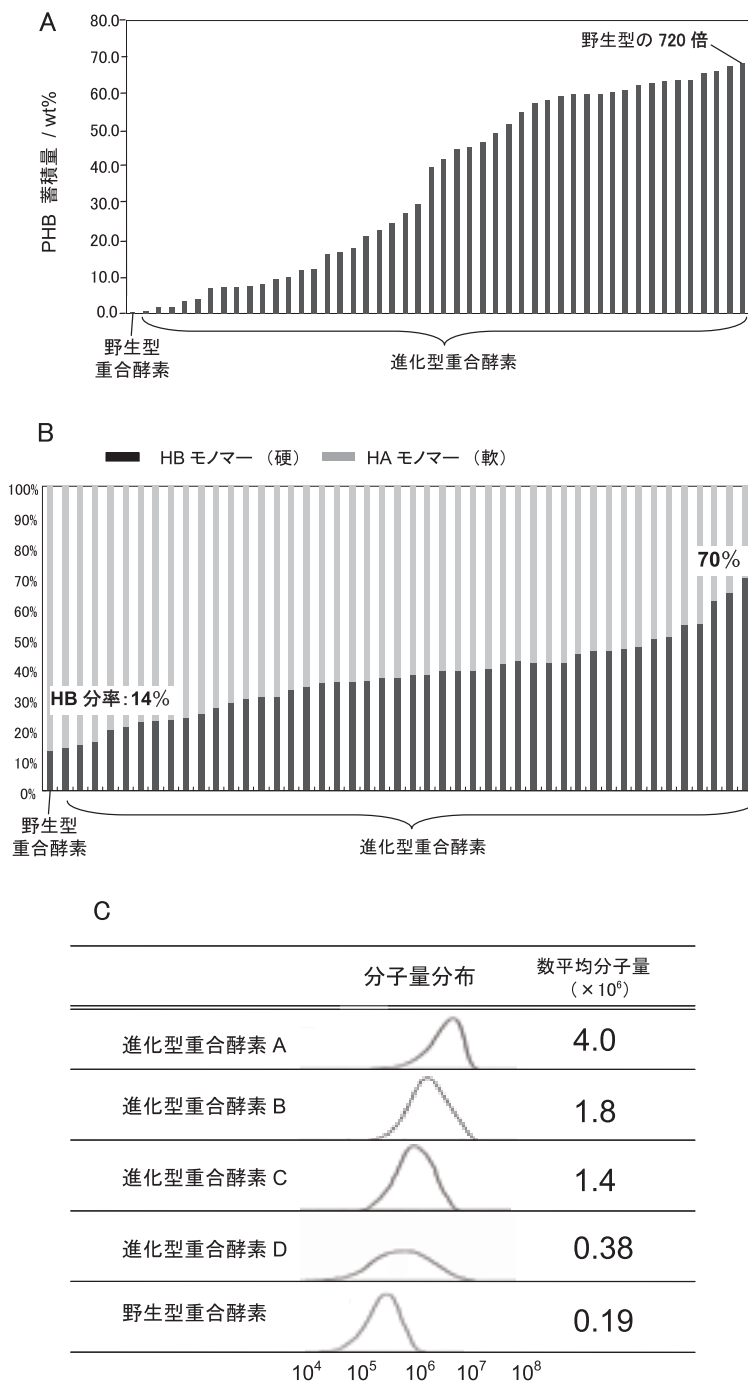


図4 進化型重合酵素による PHA の生産性(A)、共重合組成(B)、分子量(C)の制御

重合酵素)は、利用ニーズにキメ細かく対応可能な PHA の「テーラーメイド生産」を可能にする。少しずつ異なる特性を持つ進化型重合酵素をライブラリー化し、いつでも提供できるようにしておけば、用途に応じて生産される PHA の組成(将来的には分子量も)をチューニングし、適した物性を有する PHA 生産をすることができるだろう。

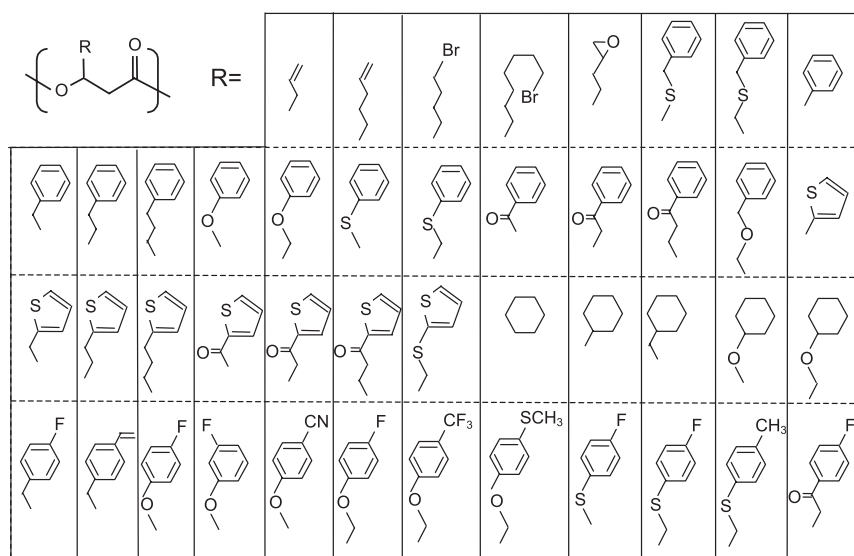
5. 新規 PHA の微生物生産

上述の PHA のモノマー組成の精密なコントロールに加え、微生物生産できるポリマーの化学構造の多様性を増やすことは、従来の PHA にはない様々な特性や機能を付加できることから、バイオプラスチックの用途拡大や付加価値

増大を目指す上で極めて重要である。

図6に、現在までに報告されている微生物が合成可能なバイオプラスチックのモノマーユニット構造を示す。3位の炭素を起点とした側鎖が、単純なアルキル基以外の多様な置換基(芳香環やその誘導体、不飽和炭化水素、シアノ基、ハロゲン化炭化水素、ビニル基など)を有することができる。これらの多彩なモノマーユニットは、その基本骨格を有する前駆体として菌体外から添加され、菌体内で CoA 化された後、重合酵素の基質特異性に合致するものが重合される¹⁰⁾。たとえば、本間らはベンゾイル吉草酸を原料として、ヒドロキシベンゾイル吉草酸ユニットを含む PHA を微生物合成した¹⁰⁾。この PHA は、PHB と比較して

<PHAと側鎖構造の異なるユニット>



<主鎖構造の異なるユニット>

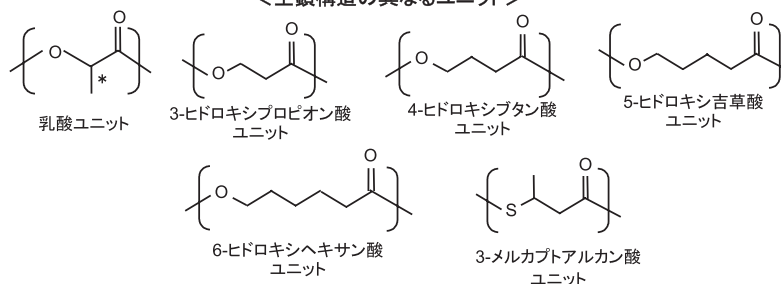


図5 微生物によって生産可能なバイオプラスチックの化学構造

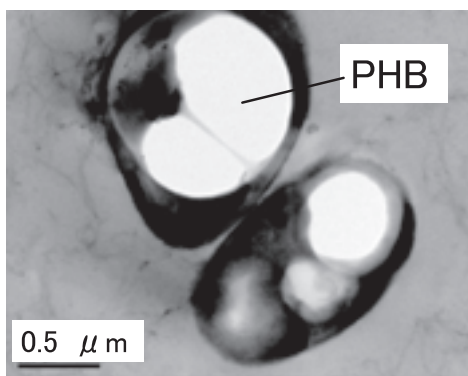


図6 コリネ菌における PHB 蓄積^{16,17)}

T_g が上昇している(5°C付近から約36°Cまで)のが特徴である。これらの官能基はHBユニットと共通の主鎖構造を持つポリエステル側鎖に導入されるものであるが、主鎖が異なるユニットを導入したPHAも知られている^{11,12,13,14)}。たとえば、*R. eutropha*は、主鎖の炭素数が4の4-ヒドロキシブタン酸を導入したPHAを生産する¹³⁾。さらに、メルカプトプロピオン酸やメルカプトブタン酸を原料として主鎖に硫黄が導入されたポリチオエステルの生合成も報告されている¹⁴⁾。このように多様なバイオプラスチックの性質を調べ、有用な材料を見つけていくのは今後の課題だろう。

最近著者らは、乳酸(LA)ユニットの取り込みが可能な進化型重合酵素を発見し、大腸菌におけるP(LA-co-HB)共重合体の生産システムを構築した¹⁵⁾。PLAは、PHAと比べて T_g が高く加工しやすいため、最も実用が進んでいるバイオプラスチックである。よって、このようなLAユニットが入った共重合ポリマーは、熱的性質の改善をはじめとし、PHAの物性強化における新たな展開が期待される。この例が示すように、PHA重合酵素の改変により、将来的には、今まで化学合成のみで合成されていた他のバイオプラスチックも微生物工場で生産できるようになると期待される。多様な機能を有する進化型重合酵素は、工場内の機械をリニューアルして新製品を生産するように、微生物工場の機能を拡張することができるだろう。

6. 実用生物工場におけるPHA生産

先に述べたように、バイオマスを有効に利用するためには、PHAを生産する宿主の選択が非常に重要である。著者らは、糖の資化能力が高く、アミノ酸発酵菌として活躍しているコリネ菌でのPHB生産システムを構築した(図6)¹⁶⁾。グラム陽性菌であるコリネ菌は、内毒素であるエンドトキシンを含まない。将来的にPHAが生体医療材料や食品梱包剤に利用されることを考慮すると、安全性が確認され、かつ発酵産業において利用されている実績を持つコ

リネ菌を使用するメリットは非常に高い。現在、コリネ菌で58%のPHB蓄積が達成されている¹⁷⁾。本菌は、脂肪酸をほとんど資化しないため、共重合体の合成には不利だと考えられていたが、筆者らは、培地中にプロピオン酸を添加することにより、ヒドロキシ吉草酸をモノマーユニットとして含む共重合体の合成にも成功している。今後は、モノマー供給酵素の改良により、コリネ菌で合成可能なPHA組成のバラエティを増やすことを目指している。

また、より低コストなPHA生産を目指して、光合成によって二酸化炭素と水から直接原料を調達できる植物でPHAを生産することも試みられている。筆者らは、本稿で紹介した進化型のPHA重合酵素が、細胞環境の異なる植物細胞内でも高い活性を有し、PHA蓄積率を増加させることを見出している¹⁸⁾。このことは、前述した多様なポリマーの合成技術を植物へと組み込むことが可能であることを示唆している。植物では、遺伝子の発現量を極端に高くすると、サイレンシングと呼ばれる機構により、遺伝子が不活性化される確率が高まることが知られている。遺伝子の発現量ではなく、酵素そのものを改変する分子進化技術は、植物での生産性向上と相性がよく、“畑でプラスチックを作る”という夢の技術実現に大きく寄与するものと考えている。

7. おわりに

本稿で敢えて「微生物工場」という言葉を使ってバイオプラスチック生産の現状を解説した最も大きな理由は、単なる比喩に留まらず、微生物システムを本格的に運用できる時代に到来しているからである。微生物の自然変異からはじまり、細胞全体への人工ランダム変異、染色体DNA上へのターゲット変異、の系譜をもつ有用物質生産のための分子育種技術は成熟期を迎えている。さらには近年進展著しいゲノム工学は、有用物質の生産最適化のために、生育に必須でない遺伝子の削除を効果的に後押しし、「ミニマムゲノムファクトリー」をモデル微生物で創成することも可能となってきた。すなわち省エネルギー化されたシステム構築を徹底的に追求した工場そのものの再建築である。実際、このリモデリングされた工場を利用して、木質セルロースを糖化し、バイオエタノールやバイオプラスチックに微生物変換できる、セルラーゼなどのバイオマス変換酵素の高効率生産に成功している。今回紹介したバイオプラスチック生産用微生物工場は、まだ駆け出しのプロトタイプであり、今後このようなりモデリングされた微生物工場に移し替えていくことで劇的な高効率生産が可能になると

期待される。われわれも、先駆けとして大腸菌でのモデルケースを実用微生物であるコリネ菌に移植したり、植物体に応用しはじめていることはすでに述べた通りである。微生物工場は、英語では「Microbial factory」であり、日本オリジナルの言葉で輸出したのか、はたまた輸入したのかは定かではない。実は、今回乳酸ベースのバイオプラスチックを微生物生産できるようになった内容を報告した論文¹⁵⁾は、この単語が入ったタイトルで掲載されることになっており、掲載雑誌では記念すべき第1号である。

参考文献

- 1) 田口精一ほか、グリーンプラスチック材料技術と動向、p. 16、シーエムシー出版(2005)。
- 2) 田口精一、蛋白質核酸酵素、50(3)、262-269(2005)。
- 3) 山田美和ほか、日本油化学誌(オレオサイエンス)、5(11)、523-532(2005)。
- 4) S. Taguchi et al., *Macromol. Biosci.*, 4(3), 146-156(2004)。
- 5) C. T. Nomura et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73(5), 969-979(2007)。
- 6) K. Takase et al., *J. Biochem.*, 133(1), 139-145(2003)。
- 7) K. Takase et al., *Biomacromolecules*, 5(2), 480-485(2004)。
- 8) K. Matsumoto et al., *Biomacromolecules*, 6(1), 99-104(2005)。
- 9) K. Matsumoto et al., *Biomacromolecules*, 7(8), 2436-2442(2006)。
- 10) 本間務、バイオプロセスハンドブック、p. 497、エヌ・ティー・エス出版(2007)。
- 11) G.W. Haywood et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, 13(2), 83-88(1991)。
- 12) K. Tajima et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 95(1), 77-81(2003)。
- 13) A. Steinbüchel et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 128(3), 219-228(1995)。
- 14) T. Lütke-Eversloh et al., *Macromol. Biosci.*, 4(3), 166-174(2004)。
- 15) S. Taguchi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105(45), 17323-17327(2008)。
- 16) S.J. Jo et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 102(3), 233-236(2006)。
- 17) S.J. Jo et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 104(6), 457-463(2007)。
- 18) K. Matsumoto et al., *Biomacromolecules*, 6(4), 2126-2130(2005)。