

Microbial Plastic Factory —ポリ乳酸から多元ポリ乳酸の時代へ—

松本謙一郎・田口 精一*

最近、微生物機能を拡大して自然界では合成されない付加価値の高い化合物・燃料・ポリマーを生産する「合成生物学」という新しい分野が注目されている。微生物をプラットフォームとして、目的物質を合成するための代謝経路を合理的にデザインし、微生物工場 (microbial factory) を建築するのが主流である。この微生物工場という言葉には、天然を超える機能を付与するという意味合いが込められている^{1,2)}。

本稿では、筆者らの研究グループが、はじめて創成した乳酸ベースポリマー合成用の微生物工場について述べる^{3,4)}。微生物が乳酸を合成することはよく知られた事実である。しかし、筆者らの知る限り、筆者らの研究以前に細胞内で乳酸がポリエステルとして重合されるという事実は報告されていなかった。それでは、微生物細胞中に乳酸ポリマーを創れないか？この興味本位のチャレンジは、いつの間にか当研究室の主要テーマとなっていた。

ある種の微生物がポリエステルを合成することは以前から知られており、最初の報告例は、1926年にパスツール研究所で発見された polyhydroxybutyrate (PHB) である。PHBのモノマー 3-hydroxybutyrate (3HB) と乳酸は、「ヒドロキシ酸」という基本化学構造を共有しており、主鎖炭素に結合する水酸基の位置が異なっている。微生物ポリエステル構成ユニットは、現在に至るまで 3HB を含む 150 種類以上が報告されており、PHA (polyhydroxyalkanoate) と総称されている⁵⁾。化学構造から考えれば、乳酸 (2-hydroxypropionate) が PHA ファミリーに属す資格十分と考えられるが、近くて遠い存在であった。

なぜ、乳酸が重合される事が重要なのかというと、乳酸ポリマーがバイオポリマーの中でも透明性や加工性に優れ、もっとも実用化されている材料だからである⁶⁾。実際、PHAの生合成機構を応用してポリ乳酸を合成しようとする研究は、以前から世界の著名な研究機関で行われていた⁷⁾。その中で、筆者らが手掛けた乳酸を重合させるシステム作りの過程には、いくつかの“偶然の発見”があった。

乳酸重合酵素 (LPE) の発見から 乳酸ポリマー微生物工場誕生まで

PHA 合成酵素は、3HB-CoA を重合してポリエステルを合成する。もし、乳酸の CoA 体であるラクチル CoA (LA-CoA) を同様に重合できれば、細胞内でポリ乳酸が生合成されるであろう (図1)。この可能性を検証するには、PHA 合成酵素を精製し、*in vitro*での LA-CoA との反応を測定すればよい。しかし、前述したように、この方法では乳酸の重合は見られなかった。そこで、筆者らは学内共同研究で一つの工夫をした。それは、LA-CoA だけでなく、本来の天然基質である 3HB-CoA が共存した条件で活性を評価したことである。すると、たちまち試験管の中が白濁しだした。早速、生成したポリマーを分析してみると、3HB ポリマー鎖中に乳酸モノマーが組み込まれていることが判明した。つまり、“ある”

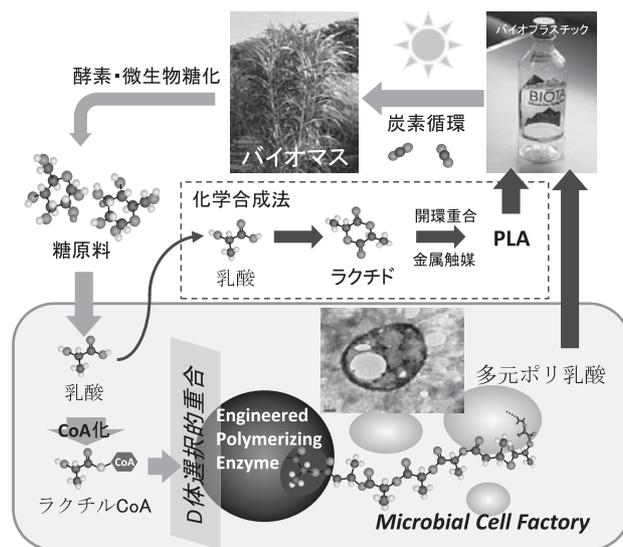


図1. 乳酸ポリマーの合成と炭素循環。従来法では、乳酸発酵により得られる乳酸を化学的に重合させてポリ乳酸 (PLA) が合成される。微生物工場によって合成される乳酸ポリマーは、炭素源から1段階のプロセスで合成されることに加え、D乳酸 CoA を特異的に認識する重合酵素により、光学純度が極めて高くなる。さらに、複数のモノマーを組み合わせる事により合成される多元ポリ乳酸は、ポリ乳酸とは異なるさまざまな物性を示しうる。

* 著者紹介 北海道大学大学院工学研究院生物機能高分子部門 (教授) E-mail: staguchi@eng.hokudai.ac.jp

PHA合成酵素は、乳酸モノマーを単体では重合しないが、共重合体であれば合成できたのである^{2,8)}。

もっとも重要な点は、“ある”PHA合成酵素が、進化工学的に改変された高活性変異体であったことである。当時6年間かけ、PHA合成酵素のいくつかの高活性変異体を作製していた^{9,10)}。これらの変異体は乳酸を重合する事を目的に作製されたわけではなかった。しかし、結果的に、この中の一つの変異体のみが、前述した共重合体の合成条件で、乳酸重合活性を示し、これまで誰も達成できなかった乳酸重合酵素 (lactate-polymerizing enzyme: LPEと命名) の発見につながったのである。

早速、微生物工場内(大腸菌)に構築したモノマー供給ルートに加え、今回発見したLPEを遺伝子導入し作動するかを調べた²⁾。まず、図2に示すような乳酸ポリマーの生合成経路を大腸菌内に設計した。構成反応ステップは、(1)乳酸合成、(2)モノマー供給酵素によるモノマー(LA-CoA)の合成、および(3)LPEによる重合である。LA-CoAモノマーは、乳酸脱水素酵素の反応から得る乳酸がプロピオニルCoA転移酵素(PCT)によってCoAが付加されることで合成される経路を設計した。実際に外来PCT遺伝子を大腸菌内で発現して、LA-CoAをCE/MS分析で検出することにより、新規モノマー供給経路の構築を確認した。また、ペアとなる3HB-CoA供給経路としては、これまでの供給酵素遺伝子を用いた反応を利用した。これら供給されたモノマーを最終的に乳酸重合酵素が重合するというデザインである。

はたして、大腸菌体内で合成されたポリマーを抽出し分析した結果、LAユニットが6mol%導入されたP(LA-co-3HB)コポリマーであることが明らかとなった。設計通りに、微生物工場が駆動し出したのである。水系で

温和に重合反応が進む本プロセスは、化学合成での重合反応時に用いる有害な重金属触媒や有機溶媒を使用しないで済むことや、高温高压条件を要求しないことから合成過程での環境負荷の軽減が期待される。

「多元ポリ乳酸」とは？

プロトタイプ微生物工場では、コポリマー中に存在するLA分率が6mol%に留まっていたが、さらに分率を向上させることが可能であろうか？当初筆者らは、モノマー前駆体である乳酸の合成量が、乳酸分率を高める因子になると考えた。実際、嫌気培養による乳酸合成の促進や、乳酸を高生産する代謝改変株などを利用することにより、乳酸分率を50mol%近くまで上昇させることに成功した¹¹⁾。しかし、合成されたポリマー中の乳酸・3HBモノマーの量を調べてみると、乳酸分率の向上には、むしろ3HBモノマーの供給量を減らす事の方が効果的であることが分かった。これは、LPEの乳酸重合活性が律速になっていることを示唆していた。そこで筆者らは、過去に取得した重合活性を向上させる変異を組み合わせて新たな進化型LPEを創出し、さらに60mol%まで乳酸分率を上昇させることに成功した¹²⁾。しかしながら、この酵素を用いても、ポリ乳酸を合成しようとすると、ポリマーが得られないことから、乳酸の重合にその他のユニットが必要であることが強く示唆された。

さて、このようにして合成されたP(LA-co-3HB)は、ポリ乳酸ともPHBとも異なる新たなバイオポリマーである。では、このポリマーはどのような性質を持っているだろうか？筆者らは、ファーメンターで培養生産したポリマーをフィルム化し、機械的性質を調べた。その結果、図3に示すような透明なフィルムができ、さらに

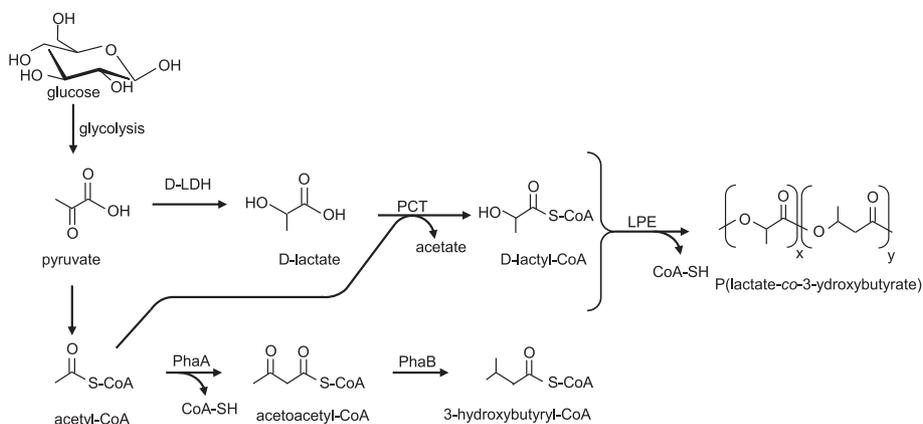


図2. 乳酸ポリマーの生合成経路。LPEにより乳酸と3HBモノマーが共重合化され、乳酸ポリマーが合成される。D-lactyl-CoAは、PCTによってacetyl-CoAから乳酸にCoAが転移されて供給される。PhaAは2分子のacetyl-CoAを縮合2量化し、PhaBの還元反応によって3HB-CoAモノマーが供給される。



図3. 微生物合成乳酸ポリマーの透明度 P (LA-co-3HB) はP (3HB) と対照的に透明なフィルムになり、さらに柔軟性が付与される事がわかった。

このフィルムは、引っ張ると伸長する柔軟性を持っていた¹³⁾。この性質は、PLAとP (3HB) がほとんど伸張性を持たないのと対照的であった。この結果は、乳酸ポリマー合成微生物が、単に化学合成プロセスからの置き換えに留まらず、新たな材料を生み出すことができることを示している。ここから、「ポリ乳酸」から「多元ポリ乳酸」という新たなカテゴリーが生まれてきた。すなわち、LPEの幅広い基質特異性を利用して、乳酸をベースに多様なモノマーが共重合化されたポリマーの合成が可能となる。実際、3HB以外の他種モノマーとの共重合体の創製にも成功している²⁾。

コリネ菌による超高分率乳酸ポリマーの生産

これまでの実験では、モデル微生物である大腸菌を用いて行ってきた。しかし筆者らは、コリネ菌を宿主としたPHBの合成系も構築していた¹⁴⁾。コリネ菌は、実用アミノ酸生産菌として安全性が確立しているほか、高濃度の糖液を効率よく資化し、また高密度培養が可能であるなどのメリットがある。では、コリネ菌を使っても同様な乳酸ポリマーの生産ができるのだろうか？ 当初は、この単純な動機で研究を開始したが、得られた結果は驚くべきものだった。なんと乳酸分率が99mol%を超えるポリマーが合成されたのである¹⁵⁾。最初、実験をした学生は、3HBのピークが見られないため、「ポリ乳酸が合成できました！」と報告してきた。しかし、3HBモノマーの必要性を強く認識していた筆者らは、さらに高い感度で分析するように指示した。その結果、極微量ではあるが、やはり3HBが含まれている事が分かった。このような高乳酸分率のポリマーは、少なくとも熱的性質に関しては、ステレオコンプレックス形成による融点を含め、化学合成PLAとほぼ同等の値を示した。したがって、材料科学の観点からは、ポリ乳酸が生合成できたと言ってよい。しかし、このポリマーには、依然として3HBが含まれているのである。3HBモノマーが必要とされる理由を解明することは、今後の重要な基礎研究課題の一つだと考えている。

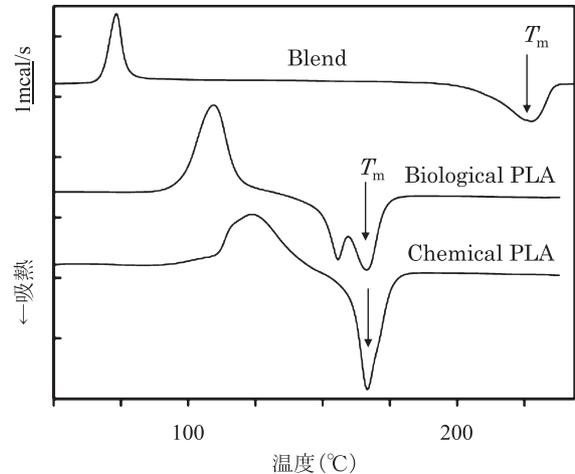


図4. 生合成PDLA (に近いポリマー) と化学合成PLLAとの混合によるステレオコンプレックス形成。ブレンドでは、大幅に融点 (T_m) が上昇している。

超高光学純度キラルポリマー合成

微生物工場による物質生産の大きなアドバンテージの一つに、立体異性体を非常に高い精度で選択的に合成可能であることが挙げられる。とくにポリ乳酸には、PLLAとPDLAの両光学異性ポリマーを等モル混在して共結晶化させることでステレオコンプレックスを形成し、熱融解温度が向上することが知られており(図4)、光学異性体の作り分けが重要である。筆者らが合成した乳酸ポリマーを加水分解して分析したところ、L-乳酸は検出されなかった¹¹⁾。ポリエステル重合酵素は非常に厳密なD体選択性を有している事が知られるが、この性質は乳酸の重合にも継承されていた。これは、基質の構造、すなわち水酸基の位置が異なる事を考えるとかなり興味深い事である。現在、産業的に生産されているPLAはほぼPLLAであり、微生物工場で生産されるPDLA (に近いポリマー) はステレオコンプレックスのパートナーとしての利用も期待できるだろう¹⁶⁾。

おわりに

LPEの発見により、初の乳酸ポリマー生産用の微生物工場が創成された。このプロセスはコリネ菌に移植可能であったことから、おそらく幅広いプラットフォームに適用できるだろう。今後は原料となるバイオマス資源との組み合わせも考慮し、バイオマス資化性を強化した宿主との組み合わせにより、再生可能な炭素源から高付加価値なバイオポリマーを生産することが目標である。

謝辞 本稿で紹介した研究成果の多くは、北大内共同研究およびトヨタ自動車・豊田中研との産学連携共同研究によって得られたものである。本稿の実験成果は、主に当研究室の山田美和博士（現岩手大学農学部助教）、正瑞文博士（現味の素社研究員）、宋育陽（当研究室博士課程学生）によるものである。

文 献

- 1) Carothers, J. M. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 498 (2009).
- 2) 渡辺剛志ら：合成生物学の隆起－有用物質の新たな生産法構築を目指して－（植田充美編），p.215，シーエムシー出版（2012）.
- 3) Taguchi, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 17323 (2008).
- 4) Matsumoto, K. and Taguchi, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 921 (2010).
- 5) 田口精一：蛋白質核酸酵素, **50**, 262 (2005).
- 6) Tsuji, H.: *Biopolymers*, Edt. Wiley-VCH, **4**, 129 (2002).
- 7) Yuan, W. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **394**, 87 (2001).
- 8) Tajima, K. *et al.*: *Macromolecules*, **42**, 1985 (2009).
- 9) Taguchi, S. *et al.*: *Macromol. Biosci.*, **4**, 145 (2004).
- 10) 田口精一：バイオサイエンスとインダストリー, **69**, 375 (2011).
- 11) Yamada, M. *et al.*: *Biomacromolecules*, **110**, 677 (2009).
- 12) Yamada, M. *et al.*: *Biomacromolecules*, **11**, 815 (2010).
- 13) Yamada, M. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **154**, 255 (2011).
- 14) Jo, S. J. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 233 (2006).
- 15) Song, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1917 (2012).
- 16) Shozui, F. *et al.*: *Polym. Deg. Stabil.*, **96**, 499 (2010).