

Candida maltosaによる生分解性プラスチック (PHBH) の生産

松本 圭司

はじめに

昨年末、地球温暖化対策を巡る国際交渉COP21（気候変動枠組み条約第21回締約国会議）がパリで開催され、すべての国が参加する2020年以降の新たな温暖化対策「パリ協定」が採択された。先進国、途上国など各国の思惑はあるものの温室効果ガス削減に向けた実効ある取組みを期待したい。

プラスチック分野においては温室効果ガス削減ならびに環境問題の解決に向け、バイオプラスチック市場が急速に拡大している。バイオプラスチックとは、使用後は水と二酸化炭素に還る「生分解性プラスチック」と、植物由来などの再生可能原料を用いて生産された「バイオマスプラスチック」の総称である。

European Bioplasticsによれば、2014年の世界におけるバイオプラスチック生産能力は170万トンであり、2018年には680万トンに達すると予測されている。特に成長が著しいのはドロップイン型のバイオマスプラスチックであるバイオポリエチレン (PE)、バイオポリエチレンテレフタレート (PET) であるが、プラスチックによる海洋汚染問題などを背景に生分解性プラスチックも継続した成長が予測されている。表1に欧米における最近の法規制状況の一部を示した。我々が身近に接するレジ袋やパーソナルケアの分野において生分解性の機能を重要視する法制化が進みつつある。

当社は、1991年に *Aeromonas caviae* FA-440が(R)-3-ヒドロキシ酪酸((R)-3-hydroxybutyrate:以下3HBと略す)と(R)-3-ヒドロキシヘキサノ酸((R)-3-hydroxyhexanoate:

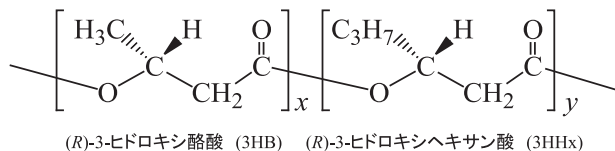


図1. PHBHの構造

以下3HHxと略す)をモノマーとする新規共重合ポリエステル Poly(3HB-co-3HHx) (以下PHBHと略す) (登録商標: AONILEX®)を生産することを見いだした¹⁾。PHBHの構造を図1に示す。PHBHは3HHx共重合比率が10 mol%を超えると柔軟な性質を示すようになる。PHBHはバイオマス由来の原料を炭素源として発酵生産でき、かつ環境中で優れた生分解性を示すことから、温暖化ガス削減ならびに環境問題の両課題を解決できるバイオプラスチックである。

PHBH生産株の育種

1. 宿主の選択 我々は、*Aeromonas caviae*を用いたPHBH発酵生産を試みたが、種々の培養条件検討にもかかわらず、生産性は10 g PHBH/L/60 hr以下と低く、実生産に適用できるレベルではなかった。しかしながら、1997年になってFukuiらによって*A. caviae*よりPHBH合成に関与する遺伝子群 *phaP_{Ac}* (PhaP_{Ac}: Phasin), *phaC_{Ac}* (PhaC_{Ac}: PHA synthase), *phaJ_{Ac}* (PhaJ_{Ac}: enoyl-CoA hydratase) がクローニングされたことから、PHBH高生産株の分子育種が可能となった^{2,3)}。

分子育種において宿主の選択はたいへん重要である。

表1. 最近の欧米における法規制状況

欧州 プラスチックバッグ	EU	軽量（厚さ50 μm未満）キャリアバッグ削減に向け指令発効 ・ Compostableバッグは除外 ・ 対2010年比で2019年末51%、2025年末23%に削減
	仏	2017年以降 fruit & vegetable bagsはhome compostableなどの要件 プラスチック製レジ袋は2016/01以降禁止（生分解性プラスチックを含む）
	伊	Compostable以外のプラスチック製レジ袋は禁止
	独	有機廃棄物分別用バッグはcompostableなどの要件
米国（州） マイクロビーズ	IL	生分解しないビーズを含むパーソナルケア販売は2017/12以降禁止
	CA	プラスチックマイクロビーズを含むパーソナルケア販売は2020/01以降禁止（生分解性プラスチックを含む）

著者紹介 (株)カネカ R&D企画部, 大阪大学大学院工学研究科カネカ基盤技術協働研究所 (特任研究員)
E-mail: keiji.matsumoto@kaneka.co.jp

宿主としてはポリヒドロキシ酪酸 (以下PHBと略す) を高生産する *Ralstonia eutropha*, 遺伝子組換えツールの豊富な *Escherichia coli* や *Saccharomyces cerevisiae* に加えて *Candida maltosa*, *Yarrowia lipolytica* を候補とした。 *Candida* 属や *Yarrowia* 属の酵母は、かつて single cell protein (SCP) の生産を目的として研究され、筆者は入社当時、SCPの培養制御技術開発に携わった。残念ながら安全性の問題が払拭できず、事業化には至らなかったが、これらの酵母の高い菌体生産性、高度な連続培養技術、遠心分離などダウンストリームの容易さなどがPHBH生産に適用できると考え、宿主候補に加えた。

PHBH生産技術開発において特許ポジションは重要な要因である。開発当初、すでに多くの特許が存在していた *E. coli* は候補から外さざるを得なかった。また、PHBHを高生産するためにはポリマー基質 ((*R*)-3HB-CoA, (*R*)-3HHx-CoA) の効率的な供給が必要であり、特にPHBHの物性を左右する (*R*)-3HHx-CoAの供給を自在に調節できることがポイントとなる。3HHxモノマーの供給は脂肪酸代謝経路の中間体を利用するのが有利であり、必然的に炭素源は脂質が適している。このため、油脂を資化できない *S. cerevisiae* は候補から外した。さらに遺伝子操作に必要なツールの開発状況を考慮すると *Y. lipolytica* よりも *C. maltosa* の方がよいと判断した。 *C. maltosa* は遺伝暗号に特徴がありCTGコドンでロイシンではなくセリンに翻訳するが、コドン使用頻度にあわせて遺伝子の全合成を行う際に対応することにし、最終的に *C. maltosa* と PHB 高生産株である *R. eutropha* の2種類に絞り込んだ。本稿では、 *C. maltosa* を宿主とし、植物油脂を原料としたPHBH発酵生産技術について紹介する。

2. 分子育種 安全性の確認されている *C. maltosa* IAM12247⁴⁾ から作製された *C. maltosa* CHA1 (*his5*, *adel1*) (以下CHA1と略す) を用いてPHBH生産が可能かどうか検討した。 *A. caviae* ではβ酸化経路の中間体である enoyl-CoA を enoyl-CoA hydratase (PhaJ_{Ac}) によって (*R*)-3HB-CoA, (*R*)-3HHx-CoA に変換し、これらの

基質をPHA synthase (PhaC_{Ac}) が重合することでPHBHが合成される。一方、酵母のβ酸化は (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA を経由することから、 *phaC_{Ac}* のみの遺伝子導入によってPHBHが生産できることが期待された⁵⁾。そこで、 *ALK1* プロモーターの制御下に *phaC_{Ac}* および *ALK1* ターミネーターを接続した発現カセットを、プラスミドベクター (pUTA1⁶⁾) を用いてCHA1に形質転換した。その結果、ヤシ油を炭素源としてごく微量のPHBH生産が認められた。また、 *phaC_{Ac}* 遺伝子と *phaJ_{Ac}* 遺伝子を導入した場合、乾燥菌体の0.1wt%のPHBHが蓄積されたことから、 *C. maltosa* を用いた生産株の育種を開始した。しかしながら、ここで使用したpUTA1は、選択圧のないYPD培地では培養後の保持率が約60%、パーム油を炭素源としたYNB培地では約80%であり、工業用菌株の育種に課題を残した。

CHA1は突然変異処理によって取得された株であることから、栄養要求に関与する遺伝子以外にも変異が導入されている可能性が高かった。このため *C. maltosa* IAM12247 の *ADE1* を相同組換えによって破壊し *C. maltosa* AC16 ($\Delta ade1$) (以下AC16と略す) を作製した。AC16の培養特性を図2に示す。CHA1はYPD培地では野生株と比べて生育速度の低下は少ないが、工業用培地に近いパーム油を炭素源とした最小培地(アデニン添加)では著しく生育速度が低下した。一方、AC16では同培地において野生株に近い生育を示し、将来の分子育種により導入される *ADE1* により野生株と同等の生育速度が期待された。

C. maltosa において脂肪酸は主にペルオキシソームに存在するβ酸化経路によって代謝されるため、PHBHのモノマー基質である (*R*)-3HB-CoA, (*R*)-3HHx-CoA はペルオキシソーム内で生成する。そこでペルオキシソームターゲティングシグナル (PTS) 配列であるSKLまたはAKIをPhaC_{Ac}のC末端に付加した。各コンストラクトを *ALK1* プロモーターの下流に連結したプラスミドを構築し、AC16を形質転換した。各菌株についてテトラデカンを炭素源として培養したところ、SKL付加ではAKI

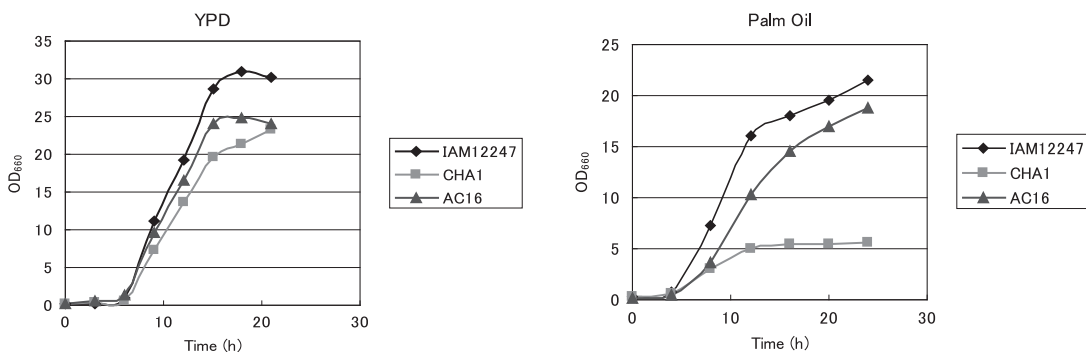


図2. アデニン要求性 *C. maltosa* AC16 の培養特性

付加に比べて約6倍のポリマー蓄積が認められた。この結果から、PTSとしてはSKLが優れていると判断し、以後の導入遺伝子にはすべてSKLを付加することにした。

次に、ポリマー蓄積に及ぼす炭素源の影響を検討した(表2)。ALK1プロモーターは*n*-アルカンによって発現が強く誘導されるが、脂肪酸ではALK2, ALK5, POX2などの発現が誘導される。そこでベクター上での同一配列重複を避けるため、*phaJ_{AC}*の発現にはALK5およびPOX2のプロモーターを用いた。ポリマー含量は油脂を炭素源とした場合に比べてドデカンの方が約4~6倍高く、*phaC_{AC}*と*phaJ_{AC}*の両遺伝子を導入した株ではポリマー含量は9.3wt%に向上した。これは*phaC_{AC}*の発現に使用したALK1プロモーターが油脂よりもドデカンで強力に誘導されるためと考えられる。工業生産では油脂を炭素源にすることを考慮すると、油脂で強力に遺伝子発現できるプロモーターに置き換える必要がある。

このため表3に示す10種類のプロモーターについてPHA生産性を指標にスクリーニングを行った。*phaC_{AC}*

上流に各プロモーターを連結したベクターでAC16を形質転換し、パーム油を炭素源として培養した。その結果、小暮らの開発したARRプロモーター⁷⁾(ARRp : *C. maltosa*のALK2プロモーターの上流にARR (alkane-responsive region) 配列を4個付加)がもっとも強力であることがわかった。本プロモーターを用いた*phaC_{AC}*発現カセットでAC16を形質転換し、パーム油を炭素源として培養した。大幅なポリマー含量の向上を期待したが、発現カセット1コピー導入株のPHA含量は1.85wt%、2コピー導入株でさえ2.94wt%にとどまった。なお、CHA1で懸念されたベクターの脱落はAC16では観察されなかった。

一方、KichiseらによってPhaC_{AC}の改良が進められ、野生型に比べて比活性の向上した変異酵素PhaC_{AC} N149S (以下N149Sと略す)、PhaC_{AC} D171G (以下D171Gと略す)が分離された⁸⁾。ARRpを用いてこれらの変異酵素発現ベクターを作製し、AC16に導入した。パーム油を炭素源とした培養結果を表4に示す。野生型に比べてN149Sではポリマー含量が7.1wt%に向上し、2コピー導入株では12.8wt%であった。D171Gを2コピー導入した株ではポリマー含量が低下したが、この原因は不明である。また、N149S/D171Gの二重変異酵素ではN149Sよりもポリマー生産性はやや増加した。D171Gでは生産性が減少したことから、以後の検討にはPHA合成酵素としてN149Sを用いることにした。一方で、これらの変異酵素を用いて生産されるPHBHの3HHx組成は20%を超え、きわめて軟質な性質を示すことが分かり、硬質(3HHx : 5 mol%)・軟質(3HHx : 10 mol%) PHBHの生産のためには3HHx組成をより低く調節する

表2. 炭素源とポリマー蓄積量

宿主ベクター	発現カセット	炭素源	菌体量 (g/L)	PHBH (wt%)
AC16 pUTA1	<i>P_{Alk1}-phaC-SKL</i>	Dodecane	4.89	5.36
		Coconut oil	5.14	0.95
	<i>P_{Alk1}-phaC-SKL</i>	Dodecane	4.48	9.38
		Coconut oil	5.89	1.47
	<i>P_{Pox2}-phaJ-SKL</i>	Dodecane	5.85	6.15
		Coconut oil	5.58	1.5

表3. パーム油で機能するプロモーター

promoter	DCW (g/L)	PHBH content (wt%)	promoter origin
ALK1	3.9	1.05	<i>C. maltosa</i> <i>n</i> -alkane-inducible cytochrome P450 ALK1
L41	8.6	0.84	<i>C. maltosa</i> ribosomal protein L41
ACT1-1	8.2	0.25	<i>C. maltosa</i> actin
PGK	9.9	0.27	<i>C. maltosa</i> phosphoglycerate kinase
PMA	7.5	0.46	<i>C. maltosa</i> plasma membrane ATPase
ScGAP	10.7	0.06	<i>S. cerevisiae</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
CmGAP	9.3	<0.01	<i>C. maltosa</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
TEF	9.6	0.19	<i>C. maltosa</i> transcription elongation factor-1
GCN	8.7	0.2	<i>C. maltosa</i> transcriptional activator protein GCN4, upstream ORF123 mutated
ARR	8.2	2.1	<i>C. maltosa</i> <i>n</i> -alkane-inducible cytochrome P450 ALK2, modified with alkane responsible region



(ARR : alkane-responsive region)

表4. 変異PHA合成酵素を用いたPHA生産

導入遺伝子	PhaC _{AC}	菌体量 (g/L)	PHBH (wt%)	3HHx (mol%)	分子量 (Mw) (× 1000)	炭素源
ARRp- <i>phaC</i>	Wild	8.2	2.1	15.4	450	パーム油
ARRp- <i>phaC</i> × 2	Wild × 2	11.8	3.0	21.7	260	
ARRp- <i>phaCN149S</i>	N149S	9.6	7.1	23.8	710	
ARRp- <i>phaCN149S</i> × 2	N149S × 2	9.2	12.8	28.4	455	
ARRp- <i>phaCD171G</i>	D171G × 2	11.2	4.5	23.0	330	
ARRp- <i>phaCNS/DG</i> × 2	NS/DG	10.9	14.0	34.1	320	

表5. (R)-3HB-CoA 供給経路の効果

導入遺伝子	PHBH (Wt%)	3HHx (mol%)	分子量 (Mw) (× 1000)
N149S × 2	12.8	28.4	455
N149S × 2 <i>phaA</i>	5.8	22.9	447
N149S × 2 <i>phaB1</i>	14.5	20.6	598
N149S × 2 <i>phaA phaB1</i>	14.2	18.2	843

必要が生じた。また、ポリマー物性に影響する重量平均分子量 (*Mw*) は50万程度であり、ポリマー精製・ペレット化工程などにおける分子量低下を考慮すると培養終了時で少なくとも100万程度必要である。

このためAC16に対して新たに(R)-3HB-CoAの供給経路を構築することで、1) ポリマー基質供給増によるポリマー含量向上、2) (R)-3HB-CoAの供給増による3HHx組成の調整(低下)、3) PHA合成酵素当たりの基質供給量増による分子量 (*Mw*) の増加を試みた。(R)-3HB-CoA供給系としてはPHBを高生産する*C. necator HI16*(*R. eutropha HI16*)のPhaA(β-ketothiolase)、PhaB1(acetoacetyl-CoA reductase)を利用した。両酵素の働きによってacetyl-CoAから(R)-3HB-CoAが供給される。

*C. maltosa*のコドン使用頻度に基づいてPTSを付加した*phaA*、*phaB1*遺伝子を全合成し、ARRp、*ALK1*ターミネーターを接続して発現カセットを構築した。パーム油を炭素源とした培養結果を表5に示す。*phaB1*遺伝子の導入では、予想通りポリマー含量は14.5wt%に向上し、3HHx組成の低下、分子量の増加が認められた。また、*phaA*遺伝子および*phaB1*遺伝子の導入では分子量が増加しているものの、ポリマー生産性、3HHx組成にほとんど変化はなく、*phaA*の効果は低かった。これはペルオキシソーム内在性のチオラーゼが機能しているためと推測しているが、*phaA*遺伝子の導入におけるポリマー生産性低下の原因は不明である。

上記遺伝子の効果をさらに強化するためには各遺伝子の複数導入が必要である。一般的にプラスミドで遺伝子

導入する場合、組込みサイズに限界があり、また遺伝子重複による不安定性もあって多数の遺伝子導入は困難である。このため染色体上への組込みを組み合わせることにした。AC16にはアデニン要求マーカーしかないため、さらに組込み用マーカー(ヒスチジン要求性、ウラシル要求性)の付与を試みた。*C. maltosa*はanuploid(異数体)として知られているが、AC16では*ADE1*が1倍体、*HIS5*、*URA3*はそれぞれ2倍体であることがわかった。ポップアウト用として5'上流、3'下流に宿主の相同配列を配置した*ADE1*を用いて、遺伝子破壊、ナイスタチン濃縮(アデニン要求性の回復)を行い、*URA3*、*HIS5*を順に破壊し、*C. maltosa* AHU-71(*Δade1*、*Δhis5/Δhis5*、*Δura3/Δura3*) (以下、AHU-71と略す)を作製した⁹⁾。このようにして育種したAHU-71はAC16と同等以上の生育速度を有することを確認した。

次に、AHU-71の新たに付与したマーカー(*ura3*、*his5*)を利用してN149Sおよび*phaB1*発現カセットを複数染色体上に導入した。代表的な宿主(BB株、3-1-3株)の遺伝子構造の概略を図3に示した。BB株および3-1-3株に対して、プラスミドベクターを用いてさらに両発現カセットを導入した。両カセットをそれぞれ2コピー以上保有する菌株は高いポリマー生産性を示し、両カセットをそれぞれ4コピー保有する菌株ではポリマー含量50wt%、重量平均分子量 (*Mw*) 92万、3HHx組成12 mol%の軟質PHBHを生産できるようになった(図3)。

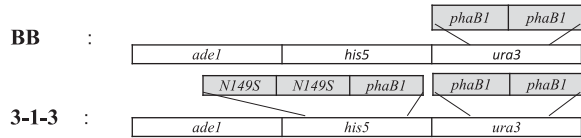
図4に育種株の電子顕微鏡写真(TEM)を示した。PHBHポリマーと考えられる大小の顆粒が一重膜構造に包まれて存在していることが観察される。導入した各酵素にはPTSを付加しているが、当該膜構造がペルオキシソームに由来しているかどうかを確認することは今後の育種に必要な知見である。

育種株のジャー培養結果を図5に示した。培養期間を通してポリマー含量はほぼ一定に保たれており、菌株の生育にあわせてPHBHを高含量で生産していることがわかる。これは、PHBH発酵生産に連続培養が適用できることを示しており、培養槽あたり高いポリマー生産が期待できる。

菌株

AC16 : *C.maltosa* (*ade::D550*)

AHU-71: *C.maltosa* (*ade::D550,ura::D220/ura::ade630 his::ade630/his::ade630*)

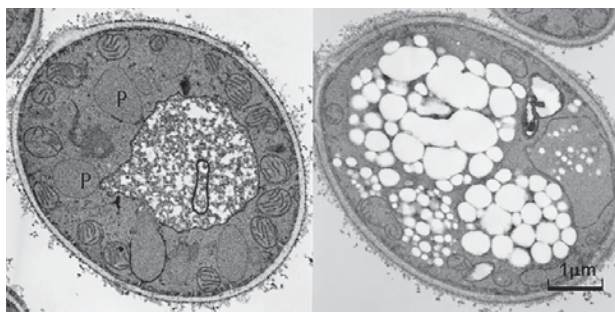


培養条件

フラスコ培養 (300mL/2L), 炭素源2% (PKO: Palm Kernal Oil, Coconut Oil), 30°C, 40~48時間

host	plasmid	expression cassette		DCW (g/L)	PHBH content (%)	3HHx (mol%)	Mw (× 1000)	carbon source
		N149S	phaB1					
AC16	N149S × 2	2	0	9.2	16	22	504	PKO
BB	N149S × 2	2	2	6.5	38	18.3	776	PKO
3-1-3	pUTA	2	3	9.8	45	12.5	1260	coconut
3-1-3	N149S × 2	4	3	10.8	47	14.1	820	coconut
3-1-3	N149S × 2-phaB1	4	4	8.9	49	12.2	920	coconut

図3. 発現カセットの構成とPHBH生産



A) コントロール

B) 育種株

図4. PHBH高生産*Candida maltosa*のTEM画像

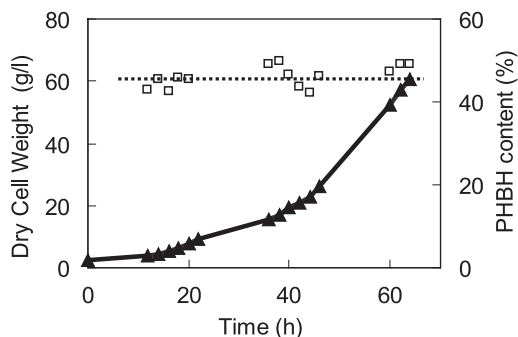


図5. PHBH高生産*C. maltosa* (育種株)のジャー培養結果. 培養は3Lジャーを用いた. 培地は無機塩培地M2⁹⁾を用い, 炭素源としてPKOをフィードした. 実線は乾燥菌体重量(g/L)を, 破線はPHBH含量を示す.

3. 今後の課題と展望 本稿では, *C. maltosa*がPHBH生産のための有望な宿主であることを示したが, 実用株として用いるためには更なるポリマー生産性向上

のみならず, ポリマー物性を決める3HHx組成ならびに分子量を最適化する技術開発が必要である. 各酵素の発現量の調節, 補酵素などのバランス, ポリマー生産とtrade offの関係にあると考えられるペルオキシソーム機能の向上, 炭素源の資化性向上などに着目し, メタボローム解析, フラックス解析などを活用することで実用菌株を育種できると考えている.

また, 事業化には培養技術開発, 精製技術開発に加えて新規樹脂を使いこなす加工技術開発が重要である. 当社はバイオ技術とポリマー技術を併せ持っており, AONILEX[®]の実用化に向けてこれら技術を結集していく.

本研究をご指導いただきました高木正道先生 (新潟薬科大学名誉教授), 太田明德先生 (中部大学副学長, 教授), 土肥義治先生 (高輝度光科学研究センター理事長)をはじめ多くの先生方に深く感謝いたします.

文 献

- 1) 特許第2777757号
- 2) Fukui, T. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **179**, 4821 (1997).
- 3) Fukui, T. *et al.*: *Biomacromolecules*, **2**, 148 (2001).
- 4) Kawai, S. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 59 (1991).
- 5) Hiltunen, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **267**, 6646 (1992).
- 6) Mauersberger, S. *et al.*: in K. Wolf (Eds.), *Nonconventional yeasts in Biotechnology*, p. 411, Springer (1996).
- 7) 小暮高久ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, 191, (2002).
- 8) Kichise, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2411 (2002).
- 9) WO 2005085415