



Regulation of 3-hydroxyhexanoate composition in PHBH synthesized by recombinant *Cupriavidus necator* H16 from plant oil by using butyrate as a co-substrate

C. necator H16株を用いたPHBH生産における油脂と酪酸の併用による3HHx組成制御

(JBB, Vol. 120, No. 3, 246–251, 2015)

佐藤 俊輔^{1*}・丸山 裕之¹・藤木 哲也¹・松本 圭司²

1900年代に石油由来のプラスチックが商業化されたことにより、人々の生活は飛躍的に便利になった。たとえばレジ袋、PETボトル、車のバンパー、光ディスクなど、身の回りには多くのプラスチック製品が使われ、日々、恩恵を受け取っている。一方で、正しく処分されずに廃棄されたプラスチックによる環境汚染問題は深刻な社会問題となっている。特に近年、プラスチックによる海洋汚染問題が世界的に大きく取り上げられている。プラスチックを海生生物が誤飲、誤食したことによる死亡事故に加え、紫外線や波力によって断片化した小粒子（マイクロプラスチック）による環境汚染物質の生物濃縮などの問題も近年クローズアップされてきている。

このような環境問題を解決する手段の一つとして、自然環境中で分解するプラスチック（生分解性プラスチック）の実用化が望まれている。

当社は、1991年に *Aeromonas caviae* FA440株が(R)-3-ヒドロキシ酪酸（以下、3HB）と(R)-3-ヒドロキシヘキサノ酸（以下、3HHx）から成る共重合ポリエステル（以下、PHBH）を生産することを見いだした¹⁾。PHBHは高い生分解性を示すとともに、その3HHx組成比が10 mol%を超えると柔軟な性質を示すようになり、ポリ乳酸、ポリヒドロキシ酪酸（PHB）と比較して物性が飛躍的に向上し、さまざまなアプリケーションへの展開が期待できる。そのため、商業化には3HHx比率が10 mol%を超える軟質PHBHを安価に発酵生産する技術開発が必須であった。

筆者らは、PHBを高生産する *Cupriavidus necator* を宿主としたPHBH生産株の分子育種を開始した。最初に、*C. necator*のPHA合成酵素遺伝子を *A. caviae*のPHBH合成遺伝子²⁾に置換した株を育種し、安価なパーム油を炭素源としたPHBH発酵生産技術を確立した。しかしながら、3HHx組成比は4~7 mol%を示し、実用化に必要な10 mol%は達成できなかった。このため、入社間もない筆者が3HHx組成比向上の技術開発を担当することになった。

PHBHは3HB-CoAと3HHx-CoAを基質として酵素合成される。これらの基質はβ酸化中間体から供給され

るが、前者はアセチル-CoAの二酸化酵素（β-ケトチオラーゼ:PhaA）と3HB-CoAへの還元酵素（PhaB）によっても合成される。筆者は、3HHx組成比を向上させるため、1) 3HB-CoA供給経路の抑制、2) 新たな3HHx-CoA供給経路の構築、について検討した。1)に関しては *phaB*の発現抑制により比較的容易に軟質PHBHの生産が可能となった。しかしながら、肝心の生産性が大きく低下してしまった。

今振り返ると、ポリマーの90 mol%以上を占める3HBの基質供給量を低下させることによる生産性の低下は当然の結果であったと反省している。

そこで、戦略2)によって高生産性と高3HHx組成比を両立させることを強く決意した。代謝経路を眺めると、アセチル-CoAの二酸化経路にブチリル-CoAを導入できれば3HHx-CoAが生成することに気づいた。そこで、油脂の資化過程で生じるブチリル-CoAプール増強のために、酪酸を添加した油脂を炭素源に用いた。しかしながら、3HHx組成比は7.2 mol%から4.2 mol%へと予想外の低下を示した。この原因はPhaAの基質特異性がアセチル-CoAに偏っていることで、酪酸の添加が2アセチル-CoAからアセトアセチル-CoAへの代謝の流れを大きくした結果であろうと推測した。そこで *phaA*破壊株を育種した。この株を油脂と酪酸で培養した結果を見たときの興奮は今でもよく覚えている。3HHx組成比が7.2 mol%から8.2 mol%に上昇したのである。その後、C6を認識する酵素がBktBであることを確認し、本酵素の発現調節を中心に研究を進め、3HHx組成比10.7~13.0 mol%の軟質PHBHが高生産可能となった。

2004年以降、R体基質のメタボローム解析など困難な時代に多くの試行錯誤を重ねたが、本結果は、筆者らに大きな勇気と可能性を与えてくれた。

現在、PHBHの実用化に向け、さらなる研究開発を継続している。

1) Shimamura, E. et al.: *Macromolecules*, **27** 878 (1993).

2) Fukui, T. et al.: *J. Bacteriol.*, **179**, 4821 (1997).

*著者紹介 (株) カネカ R&D 企画部 GP グループ E-mail: Shunsuke.sato@kaneka.co.jp

¹ (株) カネカ, ² 大阪大学大学院工学研究科カネカ基盤技術協働研究所