



燃費よくバイオプラスチックを高生産する「風船型」微生物工場の開発

研究成果のポイント

- ・微生物の形態形成を担うペプチドグリカンの合成に関わる一酵素の機能不全が功を奏して、合成されるバイオプラスチックの内圧によって膨張する「風船」の機能を獲得した大腸菌（微生物工場）を開発することに成功した。
- ・この「風船型」微生物工場は、バイオプラスチックを合成しない時は野生型微生物工場と全く同じ振る舞いをするが、バイオプラスチック合成に連動してより高い対糖収率（高効率燃費）でバイオプラスチック収量が向上する機能も獲得していた。

研究成果の概要

微生物を用いたバイオプラスチック生産は、次のような変遷を経て進化してきました。まず、バイオプラスチック天然生産菌の培養条件の最適化（第一世代）を経て、組換え生産系に移行することでその生産力価を向上させ安定化させてきました（第二世代）。さらに、バイオプラスチック生産に関与する酵素の分子改変（酵素進化学）や代謝工学を適用することでグレードアップしています（第三世代）。今回のアプローチは、第四世代ともいべき新たなバイオプラスチック生産法となります。

当研究グループでは、すでに乳酸重合酵素の開発を端緒に、代表的なバイオプラスチックであるポリ乳酸¹⁾あるいは乳酸コポリマー（多元ポリ乳酸と総称）（図1）を合成できる大腸菌微生物工場の開発に成功していました。本研究では、ゲノムワイドにトランスポゾン²⁾変異を導入したところ、バイオプラスチックを高生産する大腸菌変異株を取得し、ペプチドグリカン³⁾合成に関与する MtgA (mono-functional peptidoglycan glycosyltransferase) 遺伝子の欠損変異であることを特定しました。ペプチドグリカンは細胞壁構築の屋台骨に相当し細胞の形態形成の中樞を担いますが、本変異は通常の培養条件では見かけ上、微生物工場の稼働に影響はありません。しかしながら、細胞内部からバイオプラスチックが合成され一定以上蓄積すると、あたかも内圧をかけられた「風船」のように細胞の膨張現象が観察されました（図2,3）。しかも、炭素源であるグルコースの消費も促進し、高い対糖収率でバイオプラスチック合成し、バイオプラスチックの最終収量は約4割増大しました。

今回の新発見は、微生物を用いたバイオプラスチック生産の新たな戦略として「宿主微生物ゲノム改変によるバイオプラスチックの高生産化」と位置づけることができると考えられます。ゲノムワイドの本改変アプローチは、酵素進化学など他のアプローチと組み合わせることにより、さらにバイオプラスチック高生産用微生物工場のモデルチェンジに大きく寄与すると期待されます。

なお、本研究は、科学技術振興機構のCREST研究（二酸化炭素資源化領域）「植物バイオマス原料を利活用した微生物工場による新規バイオポリマーの創製および高機能部材化」プロジェクト（研究代表者：田口精一）の一環として行われました。

(http://www.jst.go.jp/presto/plantsci/crest/h24_04taguchi.html)

論文発表の概要

研究論文名：MtgA deletion-triggered cell enlargement of *Escherichia coli* for enhanced intracellular polyester accumulation (MtgA 酵素遺伝子欠損によって誘起された大腸菌の大型化は、ポリエステル細胞内蓄積量を増大させる)

著者：門屋亨介（北海道大学大学院工学研究院 CREST 博士研究員）、松本謙一郎（北海道大学大学院工学研究院 准教授）、大井俊彦（北海道大学大学院工学研究院 准教授）、田口精一（北海道大学大学院工学研究院 教授）

公表雑誌：PLoS ONE (open access journal)

公表日：日本時間（現地時間）2015年6月4日（木）午前3時（米国太平洋時間2015年6月3日（水）午前11時（オンライン公開）

研究成果の概要

（背景）

再生可能バイオマス原料から高付加価値化成品の創成を目指し、二酸化炭素の資源化やホワイトバイオテクノロジー⁴⁾に資する研究として、当研究グループでは、すでに乳酸重合酵素の開発を端緒に、「多元ポリ乳酸」を合成できる微生物工場の開発に成功していました。今回、全く新しい発想・原理でバイオプラスチック合成量を向上できるアプローチを見出しました。

（研究手法）

本研究では、従来のバイオプラスチック合成に直接関与する遺伝子改変に留まらず、ゲノムワイドに網羅的なトランスポゾン変異を導入したところ、バイオプラスチックを高生産する大腸菌変異株を複数取得できました。そのうち、ペプチドグリカン合成に関与するMtgA (mono-functional peptidoglycan glycosyltransferase) 遺伝子の欠損変異株をターゲットにその詳細を調べました。

（研究成果）

バイオプラスチック合成の向上に寄与するMtgA変異は、細胞の形態形成の中枢を担うペプチドグリカンの合成・構築に関与しますが、微生物工場は正常に稼働します。しかしながら、図2と3で示すように、細胞内部からバイオプラスチックが合成され一定以上蓄積すると、あたかも内圧をかけられた「風船」のように細胞の膨張が観察されました。加えて、細胞の溶菌等の不利な要因も見つけられず、安定した生産を示しています。さらに、炭素源として使用したグルコースの消費も促進し、高い対糖収率で（燃費よく）バイオプラスチック合成できることがわかりました。

（今後への期待）

今回開発した燃費の良い「風船型」微生物工場は、細胞内蓄積タイプ用の物質生産プラットフォームとして汎用性があり、物質生産力の強化に大変有効です。今後は、この優良形質を発現するメカニ

ズムを，形態形成および糖代謝の観点から詳細に解明する予定です。また，ゲノムワイドな本改変アプローチは，酵素進化学など他のアプローチとの組み合わせにより，さらにバイオプラスチック高生産用微生物工場のモデルチェンジに大きく寄与すると期待されます。

お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院工学研究院 教授 田口 精一（たぐち せいいち）
博士研究員 門屋 亨介（かどや りょうすけ）
TEL：011-706-6610 FAX：011-706-6610 E-mail：staguchi@eng.hokudai.ac.jp（田口）
E-mail：kadoyar@eng.hokudai.ac.jp（門屋）
ホームページ：http://labs.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/

【用語解説】

- 1) ポリ乳酸：乳酸が重合して長くつながった高分子で，最も実用化が進んでいるバイオプラスチックである。また，乳酸と他の単量体（モノマー）が鎖状につながった高分子を乳酸コポリマーと呼ぶ。図1は微生物から得られた乳酸コポリマーをフィルム化したもの。
- 2) トランスポゾン：微生物染色体上の遺伝子にランダムに変異を導入する際に用いられる因子。トランスポゾンが挿入された遺伝子は機能を失う。
- 3) ペプチドグリカン：細菌の細胞内膜の外側に層を形成する細胞壁の主要物質であり，ペプチドと糖で構成される。細胞形態の維持に重要な役割を果たす。
- 4) ホワイトバイオテクノロジー：バイオテクノロジーの工業的利用のことを指す。主として遺伝子組換え微生物を作製して，アルコールやバイオプラスチック等の工業原料，ビタミン，産業酵素，燃料などを生産する。石油などの化石燃料の使用を減らすため，環境負荷の少ない地球にやさしい技術と言われる。

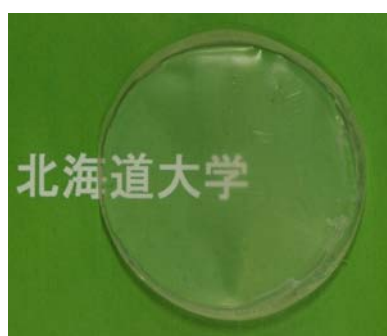


図1 大腸菌細胞内で合成・抽出されたバイオプラスチックを用いて成型されたフィルム
細胞内から抽出したバイオプラスチックは透明性と伸縮性に優れたフィルムに成型できる。

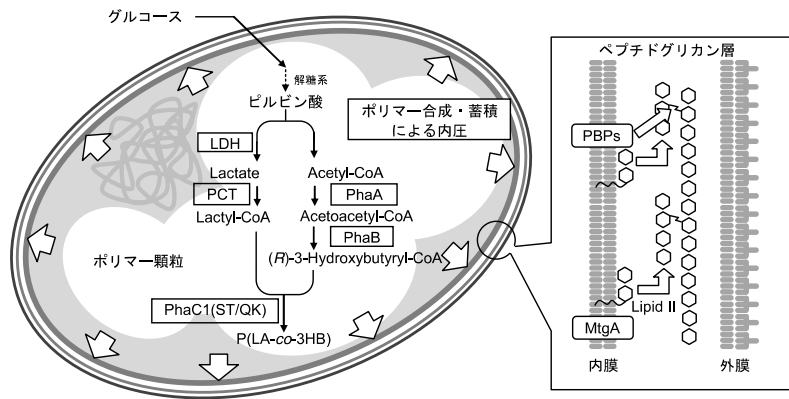


図2 「風船型」大腸菌の細胞内バイオプラスチック蓄積のモデル図

野生型大腸菌では、細胞形態はその骨格因子であるペプチドグリカンによって一定の大きさに保たれている。したがって、細胞内に蓄積する形で生合成されるバイオプラスチックは細胞体積以上に合成することができない。しかし、ペプチドグリカン合成に関与する MtgA の遺伝子欠損変異株では、細胞内部でポリマーが合成し一定以上蓄積すると、あたかも内圧をかけられた「風船」のように細胞が膨張し、これまで以上に生産性が向上した。

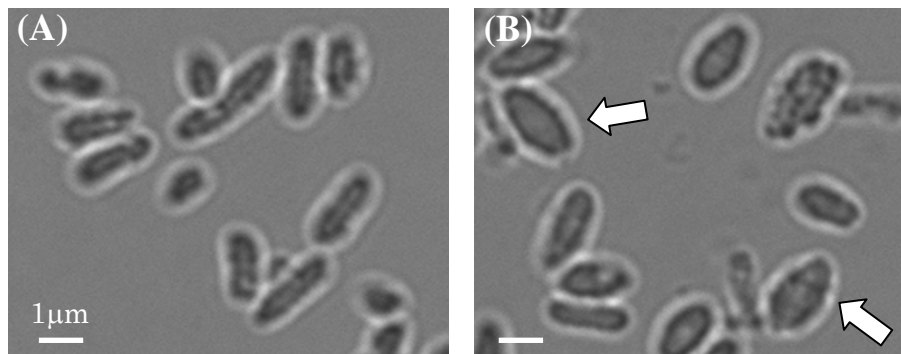


図3 バイオプラスチックを蓄積している野生型大腸菌 (A) と「風船型」大腸菌 (B) の顕微鏡写真
矢印で示したように、風船のように膨らんだ細胞が観察される。