

藤森科学技術振興財団
研究実施概要報告書

(西暦) 2024年 8月 29日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 明彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 神戸大学

職名 特命准教授

氏名 PRIHARDI KAHAR



【提出書類】

- (1) 研究実施概要報告書（本紙）
添付書類（A4版3枚以内）：研究状況を示す写真等の資料
- (2) 収支報告書
添付書類：助成金を充当した経費の領収書
領収書を添付しない場合：支払一覧表と支払部門担当者確認署名

(1) テーマ

※スペースが足りない場合は、
枠を追加いただいて構いません。

ロバスト性酵母による高純度なポリ乳酸ポリマーの生産とその多様化

(2) 本研究の期間

(西暦) 2023年4月～2024年3月

(3) 本研究の目的

近年、海洋汚染や土壤汚染による環境問題がクローズアップされており、自然分解が困難な石油系プラスチックの代替材料として、微生物が生産する生分解性プラスチック、その中でポリ乳酸が注目されている。しかし、微生物が生産するポリ乳酸の物性多様化には大きな技術的障壁があり、完全にバイオ技術(オールバイオ)では対応できず、材料の多様化は最終的に化学合成に依存しているのが現状である。これまで使用してきた宿主のほとんどはバクテリアであり、多様化に必要な反応、特に重合反応の中間体である CoA 化合物(プロピオン酸 CoA、乳酸 CoA など)の生成はバクテリアにとって極めて毒性が高いと言われている。そこで、申請者は、①毒性のある反応を含む様々な発酵ストレスに強い宿主としてロバスト性酵母を用い、②様々な CoA 中間体化合物の生成に関わる CoA 転移酵素の探索を行い、③得られた CoA 化合物の *in vivo* 重合によりポリ乳酸を生産し材料化してその物性を評価してみた。

(4) 本研究の概要

プラスチックは古くから人類社会に役立ってきたが、近年のマイクロプラスチックによる海洋プラスチック問題に見られるように、環境中で短・中期的に分解されないものは深刻な環境汚染物質となっている。PET、PP、PS およびそれらの共重合体は、広く使用されている非生分解性プラスチック材料であり、これらに代わる生分解性プラスチックが望まれている。しかし、多様性生分解性プラスチックの製造にはコストがかかり、石油化学由来プラスチックの代替にはならない。そのため、本研究では、生分解性プラスチックである PLA の合成と多様化、およびロバスト性酵母を用いた大量培養を可能にすることで、上記の問題を解決し、現在の地球規模課題に対する具体的な解決策として社会ニーズに貢献することに意義があるとして当研究の実施重要性が非常に高い。

本研究は、酵母によるポリ乳酸生産およびその高分子材料としての物性多様化に関するものである。現状のポリ乳酸は、環境にやさしい材料でありながら、製造プロセスは乳酸まで微生物発酵で行われているが、その乳酸を重合するプロセスでは縮合反応を含む化学合成が利用されている。そのため、製造コストがかかり、今まで報告されているポリ乳酸の市販品の分子量(M_w)は 60000 で、ポリラクチドとしてその 3 倍で最高である(Sigma-Aldrich より)。しかし、製品化するためには、材料の超高分子量化や様々な多様性をもつ共重合体ポリマーの製造が産業応用において重要である。そこで、本研究で進めている課題の達成により、オールバイオでのポリ乳酸が可能となり、遺伝子組換え技術により幅広いポリ乳酸材料の多様化とその応用が期待できる。さらに、カギ酵素である PCT や PhaC の改変により、多くの新規な物性をもつポリマーの生産が可能になる。

(5) 本研究の内容及び成果

ポリ乳酸は、グルコースから生成したピルビン酸から解糖系を経て乳酸脱水素酵素 (LDH) により乳酸が合成され、図 1 に示すようにプロピオニン酸 CoA 転移酵素 (Pct) により CoA 乳酸に変換され、ポリヒドロキシアルカン酸重合の中間体とされる。乳酸 CoA 転移酵素 (Lct) はほとんどなく、プロピオニン酸 CoA 転移酵素 (Pct) のみが広く検討されていることから、乳酸 CoA のみならず、プロピオニン酸 CoA を含む他の CoA 体も有機酸から生成できる可能性は高いと考えている。

さらに、ポリ乳酸ポリメラーゼが存在しないため、PhaC は脂肪酸 CoA を含む複数の CoA 中間体からポリマーを合成することになる。最も重要なことは、非 PCT 触媒の CoA 体からのコンタミネーションが、重合ポリマーの物理的特性の効果的な制御を不可能にしていることである。真核細胞である酵母の場合、原核細胞であるバクテリアと異なり、反応場が細胞内小器官によって囲まれている

ため、個々反応の制御が容易で

ある。本研究では、乳酸からポリ乳酸への化学的経路が多様であり、多数の高分子が合成されて複雑な特徴を獲得することができるため、酵母を合成場として、様々な種類の PCT と異なるクラスの PhaC を組み合わせて *in vivo* でそのポリ乳酸高分子を種類的、物的に多様化できるように検討を行った。Pct は宿主細胞に毒性を有するため、そこで、我々は、毒性によるストレスに耐性を有するロバスト性酵母におけるポリ乳酸生産を行い、その多様化に必要な Pct 及び PhaC を検討してみた。

具体的に次のように示す。

1. 反応場のためのロバスト性酵母ライブラリーからの宿主評価

我々はすでに NBRC 酵母カルチャーコレクション (NBRC) から複雑な発酵ストレス、特に実バイオマスの酸熱処理から高濃度でかつ大量に生成する発酵阻害物質に対してロバスト性を有する *S. cerevisiae* 100 株を選定しており、その中からユニークな凝集性と発酵ストレスに対してロバスト性をもつ極めて優れた F118 株の獲得に成功している (Kahar et al., 2022, Metabolic Eng., 72, 82–96)。

ポリ乳酸を合成する場合、転移酵素 Pct によって乳酸を乳酸 CoA に変換する必要があり、その CoA はアセチル CoA から供給されている。酵母ではアセチル CoA はミトコンドリアやペルオキシソームに存在するが、それはサイトゾル (細胞質) での解糖系 (ピルビン酸からのピルビン酸デヒドロゲナーゼのバイパス経路から) によって合成されている。ミトコンドリアやペルオキシソームでは他の CoA 様化合物が多く存在する。アセチル CoA からマロニル CoA を経て脂肪酸アシル CoA を合成する場合がある。その脂肪酸アシル CoA は乳酸 CoA の重合反応の際、ポリマー主鎖に組み込まれて共重合体ポリマーになることも考えられるため、脂肪酸アシル CoA の種類によりそのポリ乳酸ベースポリマーの物性、生分解性などが多様化できる。

そこで、F118 株に対して乳酸発酵に必要な遺伝子発現系を同様な方法で導入し、主鎖成分

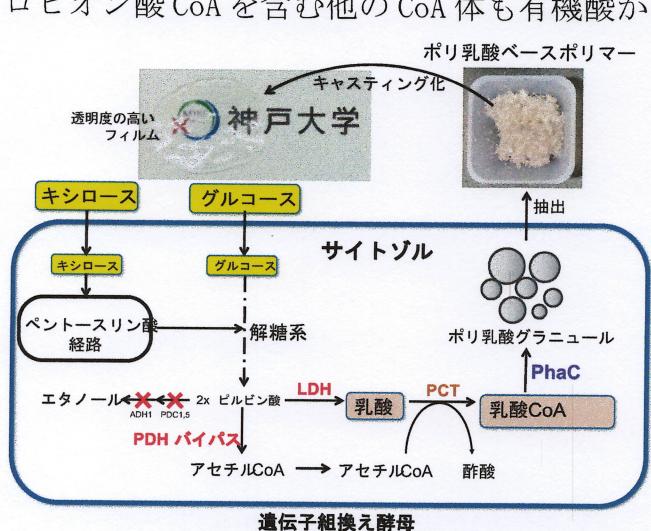


図 1. 遺伝子組換え酵母による糖質からのポリ乳酸生産。

である乳酸の生産能力、すなわち炭素源あたりの乳酸の生産量を評価した。さらに、サイトゾル中の CoA 体の動態を統合型オミックス解析に分析し、CoA 体の菌体内分布に関する情報を収取し、これらの情報からポリ乳酸合成の反応場のための組換え宿主株をバリエーション的に決定できた。今のところ、F118 株は高純度なポリ乳酸ポリマーを合成できているものであるため、シャーシ酵母として利用準備ができた。

2. 様々な CoA 体の生成に関わる CoA 転移酵素の評価

すべての CoA 転移酵素(PCT)はバクテリア由来(*Clostridium sp.*, *Firmicutes sp.*, *Megasphaera sp.*, *Ralstonia sp.*など)ものであり、本研究で検討できるその数は系統的に異なった 18 種類である(図3)。これらの PCT は優良組換え F118 株に導入してオミックス解析を用いて Pct による乳酸 CoA 体の生成、さらにその他の脂肪酸アシル CoA 体の生成を確認した。Pct の導入により、多くの微生物生産宿主に増殖・発酵性の阻害を与えるため、当株は様々な Pct の導入でも増殖阻害を受けない組換え酵母株として選定でき、ポリ乳酸生産株として利用が可能である。ここで、ポリ乳酸生産に適しているロバストな酵母株の代謝設計の情報を獲得することができた。

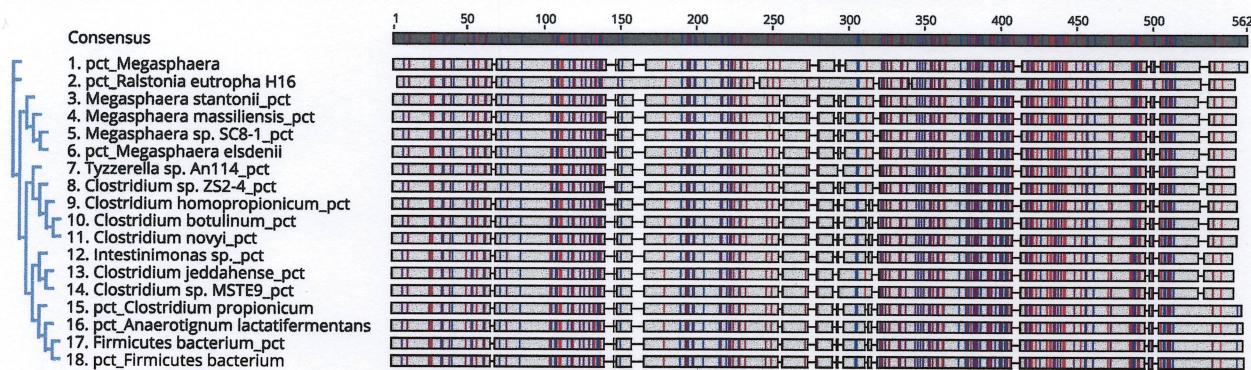


図2. 18種類のバクテリア由来 CoA 転移酵素のアラインメント

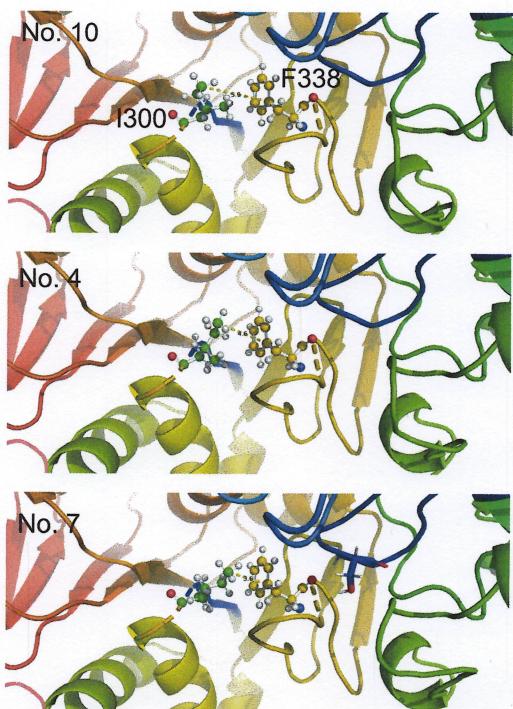


図2のように、様々なバクテリアから 18 種類の PCT を特定し、その系統解析を行った結果、それぞれ異なったアミノ酸配列を特有の部分に有しており、その機能の多様性を示している。最も大きな変化しているのは *Ralstonia eutropha* H16 株由来の Pct である。図3は株 No.10, No. 4, No. 7 の PCT のタンパク構造から抽出された活性中心の重要なアミノ酸残基 I300 と F338 の変化を示している。基本的には F338 は基質である乳酸を活性中心区間に維持し、I300 はそのアセチル CoA から CoA を奪って乳酸に転移させる役割を理解した。図4のように、由来の異なる Pct のタンパク質の活性中心の変化が大きいのため、乳酸から乳酸 CoA への反応効率、また宿主への毒性効果にも差違がみられた。

図3. CoA 転移酵素(Pct)の活性中心の変化

3. ポリ乳酸生産およびその物性の評価

ここまで獲得した「ポリ乳酸生産とそのポリマーの物性多様化に適している宿主」によるポリ乳酸合成を行った。合成するためには、図4に示している PhaC のクラス I (C_6 以下の CoA 体に有効)を中心とし、さらに *Pseudomonas* sp. 変異体 PhaC のクラス II (C_6-C_{10} の CoA 体に有効)を導入してみた。ポリマーの生産性および NMR などによる物性・構造性の評価を行った。ポリ乳酸の物性多様化に適する CoA 転移酵素および PhaC との優位性のある組み合わせを決定した。



図4. 10種類のバクテリア由来重合酵素(クラスI)のアラインメント



図5. 異なった遺伝子発現系を有する凝集性組換え F118 株によるポリ乳酸生産。

我々は、F118 株においてポリ乳酸生産の検討を実施した。F118 株は凝集性とストレス耐性が強い酵母であり、Class I の PhaC (Re)、ClassII の PhaC (STQK)に色々 *Clostridium* 由来 Pct(CP)、*Firmicutes* 由来 Pct(FB)、*Megasphaera* 由来 Pct (ME)と組み合わせて酵母の染色体にその発現系を導入してみた。その結果、クラスの異なる PhaC によって凝集性の変化が見られなかったが、導入した Pct によって凝集性の変化が顕著に観察された。Pct(CP)に関しては変化が見られないものの、Pct(FB)と Pct(ME)に関しては凝集性が弱くなっていることがわかった。

さらに、得られたポリマー(今回クラスIIの PCT と *Firmicutes* 由来 Pct を導入した組換え株から)の GPC による分子量を測定したところ、本研究で得られたポリ乳酸ベースポリマーとして化学合成でできたもとに近い分子量であることがわかった。今後、得られたポリマーは土壤中の生分解試験 JIS K 6955 (ISO 17556) と併せて海水中での生分解試験 ASTM D6691 にかけて評価する予定である。

(6) 本研究の考察

本研究ではポリマー生合成に適しているロバスト性酵母 F118 株の選定ができたことにより、酵母にとって非常に代謝ストレスを与える今回のポリマー合成は可能になった。また、ポリマー合成に必要とされる CoA 転移酵素と重合酵素 PhaC の組合せは宿主によって異なるが、F118 株にその組合せ幅が広いため、ポリマー物性の多様化も可能になった。今後、CoA 体の供給と CoA 慣化合物による毒性に強い F118 株を利用されればポリ乳酸様ポリマーの大量生産にも挑戦できる。

(7) 共同研究者(所属機関名、役職、氏名)

神戸大学大学院工学研究科、教授、荻野千秋

(8) 本研究の成果の公表先

なし(準備中)

[注] この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。