

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	補酵素再生系の強化によるポリヒドロキシアルカン酸の生合成
Title(English)	
著者(和文)	宮原佑宜
Author(English)	Yuki Miyahara
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10976号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:柘植 丈治,北本 仁孝,和田 裕之,林 智広,福居 俊昭,阿部 英喜
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10976号, Conferred date:2018/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

# 論文の要約

やむを得ない事由により論文全文を公表できないため、要約を以下のとおり提出いたします。

専攻： Department of	物質科学創造	専攻	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	工学
学生氏名： Student's Name	宮原 佑宜		指導教員 (主)： Academic Advisor(main)	柘植 丈治	
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)	阿部 英喜	

## [研究論文の概要]

論文題目：補酵素再生系の強化によるポリヒドロキシアルカン酸の生合成

現在、プラスチック製品の多くは石油から製造されており、化石資源由来の二酸化炭素に起因する地球温暖化や難分解性プラスチックによる海洋汚染など、プラスチックの使用により深刻な環境問題が引き起こされている。そこで、再生可能資源な植物バイオマスから合成が可能なバイオプラスチックへの転換が求められている。なかでも、微生物によって合成でき、優れた生分解性を有するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、炭素循環サイクルに完全に組み込まれた高分子材料であるため、その利用と普及が期待されている。一方で、PHA の更なる普及のためには、効率的な生産手法を開発することが必要であり、これまでに重合酵素の改良や培養方法に着目した研究が数多く行われてきた。最も典型的な PHA であるポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] の生合成では、モノマー合成に還元力を必要とし、補酵素 NADPH の供給がポリマー生産を制限していると提唱されている。さらに、柔軟性に富み、より実用的な PHA であるポリ(3HB-co-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-co-3HHx)] においては、3HHx モノマーを合成するために P(3HB)生合成よりも多くの還元力を必要とする。もし、生体内の還元力である NAD(P)H の供給により P(3HB)や P(3HB-co-3HHx)の生産が制限されているのであれば、NAD(P)H を何らかの方法で細胞内へと供給することで、ポリマー生産の強化および 3HHx モノマー分率の高い P(3HB-co-3HHx)の生合成が期待される。

そこで本論文では、亜リン酸デヒドロゲナーゼ二重変異体 (PtxD<sub>EAAR</sub>) に着目し、細胞内における補酵素再生系を強化することで、効率的な PHA 生産および 3HHx モノマー導入を行うための新規手法の開発を目的とした。以下、全五章からなる本論文の概要について述べる。

第一章「序論」では、研究背景および研究意義について概説し、本論文の目的を示した。

第二章「亜リン酸デヒドロゲナーゼ二重変異体 (PtxD<sub>EAAR</sub>) を利用した P(3HB)の *in vitro* 重合」では、*in vitro* 重合系を用いて、補酵素再生系が機能することで P(3HB)が重合されるのかを調べた。まずはじめに、PtxD<sub>EAAR</sub> による NADPH 生成反応を化学量論解析および速度論解析を行い評価した。これにより、PtxD<sub>EAAR</sub> を用いた酵素反応では、酸化した亜リン酸と等モルの補酵素 NADPH を生成することを確認した。さらに、PtxD<sub>EAAR</sub> は NADP<sup>+</sup>に対して高い親和性を有しており、NAD<sup>+</sup>と比較して 3.1 倍高い触媒効率を示すことが分かった。続いて、PtxD<sub>EAAR</sub> と P(3HB)重合に必要なアセトアセチル CoA レダクターゼ (PhaB) および PHA 重合酵素 (PhaC) を用いて、P(3HB)重合と補酵素再生系の連動を調べた。その結果、*in vitro* 系において PtxD<sub>EAAR</sub> を用いた補酵素再生系は十分に機能し、P(3HB)重合への応用が可能であることが分かった。

第三章「補酵素再生系強化による P(3HB)の生合成」では、組換え大腸菌を用いた P(3HB)生合成への応用を目的として、*in vivo* 系における PtxD<sub>EAAR</sub> の利用について調査した。PtxD<sub>EAAR</sub> による補酵素再生系を導入するにあたって、まずはじめに、亜リン酸が大腸菌の生育に与える影響を調査した。亜リン酸は大腸菌へ生育阻害を有しており、亜リン酸濃度 5 g/L において 38%程度の比増殖速度の減少を確認した。その一方で、PtxD<sub>EAAR</sub> を発現した大腸菌では、亜リン酸による生育阻害は僅かであり、一方で、培養液中の亜リン酸消費およびリン酸生成が確認された。このことから、細胞内で PtxD<sub>EAAR</sub> を用いた酵素反応が機能していることが分かった。次いで、*in vitro* 系で構築した PtxD<sub>EAAR</sub> による補酵素再生系を用いて P(3HB)生合成を行い、NAD(P)H 供給強化がポリマー生産へ与える影響を調べた。その結果、二段培養法を用いた際に、獲得した NAD(P)H の 43 mol%が P(3HB)生合成へと使用され、ポリマー生産収率を 3.2 倍強化することに成功した。以上のことから、PtxD<sub>EAAR</sub> を用いた補酵素再生系による NAD(P)H 供給と P(3HB)合成とをリンクさせることで、効率的な P(3HB)生産が可能であることが分かった。

第四章「補酵素再生系強化による P(3HB-co-3HHx)生合成」では、P(3HB-co-3HHx)生産の強化および共重合 PHA に含まれる 3HHx モノマー分率の向上を目的とし、PtxD<sub>EAAR</sub> による補酵素再生系を大腸菌を宿主とした共重合 PHA 生産へと応用した。完全培地を用いた一段培養では、亜リン酸の添加によって 4.4 g/L の酢酸合成が確認され、菌体生育において ATP 不足になっている可能性が考えられた。そこで、細胞合成とポリマー合成を切り分けるために、生育を止めた菌体を用いて P(3HB-co-3HHx)生合成を行った。その結果、補酵素供給とポリマー合成とをリンクさせると、ポリマー生産収率を 1.9 倍、3HHx モノマー分率を 2.2 倍強化することが可能であった。この結果から、PtxD<sub>EAAR</sub> を用いた補酵素供給強化は P(3HB)生産だけでなく、より実用的なポリマーである P(3HB-co-3HHx)生合成にも応用が可能であることが示された。

第五章「総括」では、本研究で得られた知見をまとめ、将来の展望について言及した。