T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

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 Supervisor(main)	柘植 丈治
		指導教員（副）： Academic Supervisor (sub)	阿部 英喜

要旨（和文 2000 字程度）
Thesis Summary（approx.2000 Japanese Characters ）

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や生分解性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、その利用と普及に期待が集まっている。一方で、PHA を広く普及させるためには、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可能性が提唱されている。さらに、柔軟性に富み、実用的な物性を備えた 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より多くの還元力を必要とする。もし、生体内の還元力である NADPH 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、NADPH 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)を生合成することが期待できる。

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（$PtxD_{EAAR}$）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 モノマー供給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（$PtxD_{EAAR}$）を利用した P(3HB)の *in vitro* 重合」では、P(3HB)の *in virto* 重合系を用いて、補酵素再生系が機能するのかを調べた。まずはじめに、$PtxD_{EAAR}$ 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、$PtxD_{EAAR}$ 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 が生成することを確認した。さらに、$PtxD_{EAAR}$ は $NADP^+$に対して高い親和性を有しており、NAD^+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、$PtxD_{EAAR}$ 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 $PtxD_{EAAR}$ 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、組換え大腸菌での P(3HB)生合成への応用を目的として、*in vivo* 系における $PtxD_{EAAR}$ の利用について調査した。$PtxD_{EAAR}$ 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。$PtxD_{EAAR}$ を発現した大腸菌では、亜リン酸による生育阻害はほとんど観察されなかった。一方で、培養液中にはリン酸が生成していたことから、細胞内で $PtxD_{EAAR}$ 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、$PtxD_{EAAR}$ による補酵素再生系を用いて P(3HB)生合成を行い、NADPH 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 NADPH 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、$PtxD_{EAAR}$ を用いた補酵素再生系による NADPH 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を示した。

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 3HHx モノマー分率の向上を目的とし、$PtxD_{EAAR}$ による補酵素再生系を大腸菌による共重合 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、$PtxD_{EAAR}$ を用いた補酵素供給強化は P(3HB)生産だけでなく、共重合体である P(3HB-*co*-3HHx)生合成にも応用が可能であることを示した。

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。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

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 Supervisor(main)	柘植 丈治
		指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)	阿部 英喜

要旨（英文 300 語程度）
Thesis Summary（approx.300 English Words ）

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable and biocompatible plastics which synthesized by bacteria from renewable biomass such as sugars and plant oils. Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] is the most typical PHA, which biosynthesized from acetyl-CoA via three enzymatic reactions catalyzed by 3-ketothiolase (PhaA), NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (PhaB), and PHA synthase (PhaC). It has been proposed that the bottleneck in P(3HB) biosynthesis is the supply of cofactor NADPH, which is necessary as a reducing agent for PhaB's catalyzed reaction. On the other hand, poly(3HB-*co*-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-*co*-3HHx)] is flexible and practical PHA. To synthesize 3HHx monomer, more NADPH is required than synthesizing 3HB monomer. In this study, in order to efficiently synthesize P(3HB) and P(3HB-*co*-3HHx) with high 3HHx fraction, NADPH supply in cytosol was enhanced by using phisphite dehydrogenase double mutant ($PtxD_{EAAR}$), which catalyzes oxidation of phosphite with generation of NADPH.

In Chapter 2, the kinetic analysis of $PtxD_{EAAR}$ and its parent enzyme was carried out. The catalytic efficiency (V_{max}/K_m) of $PtxD_{EAAR}$ for $NADP^+$ substrate was 3.1-fold higher than that for NAD^+. In an *in vitro* assay using purified $PtxD_{EAAR}$, PhaB, and PhaC, P(3HB) polymerization was observed when phosphite and $PtxD_{EAAR}$ were present, confirming that NADPH was supplied to PhaB.

In Chapter 3, $PtxD_{EAAR}$ was introduced in an *Escherichia coli*, to enhance the NADPH regeneration system *in vivo*. P(3HB) was biosynthesized from glucose by using two-stage cultivation. By coupling the enzymatic oxidation of phosphite, the polymer yield was increased 3.2-fold versus the non-coupling condition.

In Chapter 4, in order to enhance 3HHx monomer fraction in P(3HB-*co*-3HHx), $PtxD_{EAAR}$ was introduced in P(3HB-*co*-3HHx)-producing *E. coli*. During the cultivation, phosphite consumption in the culture supernatant and P(3HB-*co*-3HHx) copolymer formation were observed. 3HHx monomer fraction and polymer yield in $PtxD_{EAAR}$-expressing strain were increased 2.2-fold and 1.9-fold, respectively, versus control strain.

In conclusion, this study demonstrated the feasibility of using $PtxD_{EAAR}$ for excess supply of NADPH during P(3HB) and P(3HB-*co*-3HHx) biosynthesis.

備考 ： 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).