

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第		号	学位申請者氏名	宮原 佑宜	
論文審査 審査員		氏 名	職 名		氏 名	職 名
	主査	柘植 丈治	准教授	審査員	福居 俊昭	教授
	審査員	北本 仁孝	教授		阿部 英喜	特定教授
		和田 裕之	准教授			
		林 智広	准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「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」と題し日本語で書かれ、全五章から構成されている。

第一章「序論」では、本研究の背景として、生分解性プラスチック素材であるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の特徴や微生物を用いた生産方法について概観している。また、PHA 生合成においては多くの還元力を必要とするものの、還元力をもたらす補酵素 NADPH が十分には供給されておらず、PHA 生産を制限している可能性について言及している。そして本研究の目的として、NADPH の供給酵素である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 生産を行うための新規手法を開発することと述べている。

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、*in vitro* にて補酵素再生系を構築し、PHA の一種であるポリ (3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] の重合と組み合わせることで、NADPH 再生を介してお互いの反応が進行するのかを調べている。まずはじめに、PtxD_{EAAR} による NADPH 生成反応について、化学量論解析および速度論解析を行っている。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ほぼ等モルの NADPH が生成することを確認している。さらに、PtxD_{EAAR} は NADP⁺ に対して高い親和性を有し、NAD⁺ と比較して触媒効率が 3.1 倍に向上したことを確認している。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について調べている。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、これを用いて P(3HB) 重合が可能であることを示している。

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ている。PtxD_{EAAR} を発現させた大腸菌において、培養液中の亜リン酸消費およびリン酸生成を確認しており、細胞内で PtxD_{EAAR} を用いた酵素反応が正しく機能することを示している。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ている。その結果、二段培養法を用いた際に P(3HB) 生産収率を 3.2 倍強化することに成功している。

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-3-ヒドロキシヘキサン酸) [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_{EAAR} による補酵素再生系を、大腸菌を宿主とした共重合 PHA 生産へ適用している。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多量の酢酸合成が確認され、菌体生育においてエネルギー不足になっている可能性を指摘している。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) 生合成を行っている。結果、補酵素供給とポリマー合成とをリンクさせることで、P(3HB-co-3HHx) 生産を 1.5 倍、3HHx モノマー分率を 2.2 倍増加することに成功している。これにより、PtxD_{EAAR} を用いた補酵素供給強化は P(3HB) 生産だけでなく、柔軟性を有し実用的な共重合体である P(3HB-co-3HHx) 生合成にも適用が可能であることを示している。

第五章「総括」では、本研究で得られた結果を要約するとともに、今後の展望を述べている。

これを要するに本論文は、実用的な環境低負荷型高分子材料を創成する観点から、PHA の微生物生産における還元力供給に着目して研究を行い、亜リン酸デヒドロゲナーゼ二重変異体を活用することで効率的な PHA 生産が可能であることを示したものであり、工学上貢献するところが大きい。よって、本論文は、博士 (工学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。