

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Study on biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with diverse structures
著者(和文)	MRAMAMOORTHY Sivashankari
Author(English)	M Ramamoorthi Sivashankari
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12577号, 授与年月日:2023年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:柘植 丈治,曾根 正人,林 智広,田中 祐圭,福居 俊昭
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12577号, Conferred date:2023/9/22, 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		SIVASHANKARI M RAMAMOORTHY	
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	曾根 正人	教授			
		林 智広	准教授			
		田中 祐圭	准教授			

論文審査の要旨（2000 字程度）

本論文は“Study on biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with diverse structures”（多様な構造を有するポリヒドロキシアルカン酸の生合成に関する研究）と題し英語で書かれ、全 5 章から構成されている。

Chapter 1 “General introduction” では、プラスチックの社会的背景や生分解性プラスチック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。なかでも、優れた材料物性を示しながらも、まだ効率的な生合成法が確立されていない PHA に着目し、これらの生合成法を確立するためには、PHA 重合酵素の基質特異性を広げる必要があることに言及している。また、生分解実験を行う際に安定同位体でラベル化された PHA が利用できれば、分解プロセスの詳細な解析が可能になることにも言及している。そして本論文の目的として、多様な構造を有する PHA や安定同位体でラベル化された PHA の生合成法を確立することで、生分解性材料の普及を促進するとともに、生分解に関する理解を深化させることと述べている。

Chapter 2 “Screening of polyhydroxyalkanoate synthase mutants from random mutagenesis library for an improved polymerization of diverse monomer units” では、*Aeromonas caviae* 由来 PHA 重合酵素に対して、ランダムにアミノ酸置換を導入することで、基質特異性が改変された酵素の取得を試みている。変異導入は、エラー誘発ポリメラーゼ連鎖反応を用いて行い、多数の変異体から最終的に 2 個のクローンを選抜している。塩基配列を解析した結果、これらのクローンには合計 7 個のアミノ酸置換が導入されていることを明らかにしている。そして、それぞれの変異点を分離し、その効果について検証している。最も基質特異性改変に効果があった変異点では、生合成された PHA 共重合体におけるコモノマー分率がこれまでの高活性体改変体よりも更に 3% 増加することを示している。

Chapter 3 “Exploring class I polyhydroxyalkanoate synthases with broad substrate specificities for polymerization of structurally diverse monomer units” では、 α 炭素がメチル化された 3-ヒドロキシ-2-メチルブタン酸（3H2MB）や 3-ヒドロキシピバリン酸（3HPi）ユニットに対して高い重合活性が期待される PHA 重合酵素を、クラス I 重合酵素のデータベースを利用して探索している。*A. caviae* 由来 PHA 重合酵素のアミノ酸配列を用いて相同性検索を行い、ヒットした配列の中から N 末端配列の多様性を基準に 4 つの配列を選択している。そして、これらの遺伝子を実験室のコードで最適化して人工合成を行い、PHA の生合成実験に供している。その結果、*Plesiomonas shigelloides* 由来の PHA 重合酵素が、3H2MB や 3HPi に対して高い重合活性を示すことを見出している。さらに、この重合酵素に対してアミノ酸置換を導入することで、PHA 中の 3H2MB および 3HPi 分率が増加することを示している。また、*P. shigelloides* 由来 PHA 重合酵素にポリ(3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) を合成させると、重量平均分子量が 300 万を超える超高分子量体が見出されている。

Chapter 4 “Biosynthesis of P(3HB) with carbon 13 isotope” では、炭素 13 でラベル化された P(3HB) を合成するために、[U- $^{13}\text{C}_6$]D-グルコースを炭素源として、グルコース資化性 *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 および組換え大腸菌を用いた培養試験を行っている。完全培地を用いた場合、10 g/L を超える ^{13}C ラベル化 P(3HB) を得ることができるが、その ^{13}C ラベル化率は 88~94 atm% とやや低い値であることを示している。一方、最少培地を用いると収量は 1.4~4.7 g/L と低下するものの、97 atm% の ^{13}C ラベル化率が得られることを示している。

Chapter 5 “Summary” では、本研究で得られた知見をまとめ、本論文の結論とともに今後の研究の展望を述べている。

これを要するに本論文は、微生物由来の生分解性プラスチック材料において構造的に多様性を創出することを目的として、PHA 重合酵素の改変、新規 PHA 重合酵素の探索、効率的な同位体ラベル化法について研究を行い、PHA 生合成に関する新たな知見を得たものであり、工学上および工業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。