

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	配列制御型重合酵素を導入した <i>Ralstonia eutropha</i> 改変株 によるポリヒドロキシアルカン酸ブロック共重合体の生合成
Title(English)	Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate block copolymer by engineered <i>Ralstonia eutropha</i> strains harboring sequence-regulating PHA synthase
著者(和文)	石原 静流
Author(English)	Shizuru Ishihara
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第328号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:福居 俊昭,平沢 敬,松田 知子,八波 利恵,柘植 丈治
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第328号, Conferred date:2025/3/26, 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

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)	Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	石原 静流		審査員主査： Chief Examiner	福居 俊昭

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

微生物産生のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、海洋を含む様々な自然環境で優れた生分解性を示す環境調和型高分子素材である。2024 年現在、いくつかの PHA 共重合体がストローなどのシングルユース製品として一部実用化されているが、さらなる普及拡大が求められている。そこで、PHA 合成の鍵酵素である PHA シンターゼ(PhaC) のタンパク質工学的改変や宿主株の代謝改変による PHA 共重合体生合成の拡張や組成制御など、様々な研究がなされてきた。 PhaC による PHA 重合は鋳型非依存的な末端伸長で進行するため、従来の PHA 共重合体はランダム共重合となる制約があった。一方で、近年開発されたキメラ型 PHA シンターゼ PhaCAR は PHA ブロック共重合体を生合成可能であると報告された。一般にブロック共重合体は特徴的な高次構造とそれに起因した特異な物性を示すため、PhaCAR による PHA ブロック共重合体の生合成は新規 PHA の開発手段として期待される。本研究では、天然の PHA 生産菌である <i>Ralstonia eutropha</i> (<i>Cupriavidus necator</i>) H16 株を宿主とし、PhaCAR によるブロック共重合現象の再現性を含む新たな知見を得ることを目的とした。ここではポリ (3-ヒドロキシブタン酸-<i>block</i>-2-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB-<i>block</i>-2HB)] の生合成を対象として研究を行った。 <i>R. eutropha</i> H16 グルコース資化性改変株を親株として、PhaCAR 発現株 (IF001 株) を構築した。Ile 生合成の代謝中間体である 2-ケトブタン酸 (2KB) からの (R)-2HB-CoA 供給経路を導入するために <i>Clostridioides difficile</i> 由来 2-ヒドロキシイソカプロン酸デヒドロゲナーゼ LdhACd および 2-ヒドロキシイソカプロン酸 CoA トランスフェラーゼ HadACd の遺伝子を IF001 株染色体 1 上の高発現領域に挿入し、(R)-2HB-CoA 供給経路導入株 (IF002 株) とした。 IF001 株と IF002 株について (RS)-2HB 添加培養に供したところ、菌体生育が著しく阻害されること、および Val またはピルビン酸の添加により生育阻害を回避できることを見出した。2KB の添加によっても同様に強い生育阻害が見られたことから、(R/S)-2HB に由来する 2KB により Ile 生合成が優先して Val 欠乏に陥っているためと結論した。<i>R. eutropha</i> における複数の乳酸デヒドロゲナーゼホモログの欠失株の構築と培養の結果から、乳酸のピルビン酸への酸化および 2HB の 2KB への酸化を担う酵素として、シトクロム依存型 D-乳酸/(R)-2HB デヒドロゲナーゼ Dld および [Fe-S] クラスタータンパク質依存型 L-乳酸/(S)-2HB デヒドロゲナーゼ LutACB を新たに同定した。 生育阻害を回避したグルコース・(RS)-2HB・Val 培養を行ったところ、IF002 株では 2HB ユニットを 8 mol% 含有した PHA が生合成された。さらに Dld の欠失と PhaCAR の過剰発現により 2HB ユニット分率は 35 mol% まで増加した。構造解析および溶媒分別から、生合成 PHA は P[(3HB-<i>random</i>-3HV)-<i>block</i>-2HB] であることが強く示唆された。また、実海域にて良好な生分解性が確認された。 次に、グルコース・Thr 共添加培養による 2HB ユニット含有 PHA の生合成を検討した。しかし、IF002 株生合成 PHA 中の 2HB 分率は 0.1 mol% 以下であり、Thr から (R)-2HB-CoA に至る代謝経路の改良が必要であった。そこで、Thr デヒドラターゼ (Td) への Ile フィードバック阻害解除の二重アミノ酸変異を導入したところ、PHA 中の 2HB 分率が 1.0~1.7 mol% に増加した。さらに Thr から Gly への分解代謝を欠失することで 2HB ユニット分率が 2.5 mol% にまで増加した。 グルコースを単一炭素源とする 2HB 含有 PHA の生合成に向けて Thr 過剰生産株を宿主とすることを目的し、Thr アナログ耐性株のスクリーニングを実施した。しかし、目的改変体を得ることができず、Thr を経由したグルコースからの (R)-2HB-CoA 生合成の改良には至らなかった。そこで異なる戦略として、ピルビン酸とアセチル-CoA から 2KB を生成するシトラマル酸経路を検討した。鍵酵素であるシトラマル酸シンターゼとして <i>M. jannaschii</i> 由来 CimA の高活性・Ile フィードバック阻害耐性変異体 CimA3.7 を導入した <i>R. eutropha</i> 改変株では、グルコース単一炭素源培養で生合成された PHA 中の 2HB ユニット分率は 0.8 mol% 程度にまで増加し、シトラマル酸経路の有効性が示された。

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 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東京科学大学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 Science Tokyo Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	石原 静流		審査員主査： Chief Examiner	福居 俊昭	

要旨（英文 300 語程度）

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bio-based biodegradable polyesters, making them environmentally friendly polymeric materials. The wider utilization of PHAs is expected to contribute establishment of a sustainable society. It has been suggested that a newly engineered chimeric PHA synthase, PhaCAR, has a unique sequence-regulated copolymerization ability unlike conventional PHA synthases.

This study focused on biosynthesis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate-*block*-(R)-2-hydroxybutyrate] [P(3HB-*block*-2HB)] using PhaCAR in *Ralstonia eutropha* H16, a well-studied natural PHA producer. *R. eutropha* was engineered by replacing the original *phaC* by *phaCAR*, and then, two heterologous genes were inserted into the chromosome for formation of (R)-2HB-CoA from 2-ketobutyrate (2KB). The cultivation of the strains demonstrated that the growth of *R. eutropha* was severely inhibited by (R/S)-2HB supplementation, probably due to Val depletion caused by excess 2KB formed from (RS)-2HB. Cytochrome-dependent D-lactate dehydrogenase and [Fe-S] cluster protein-dependent L-lactate dehydrogenase were identified as endogenous enzymes responding to the dehydrogenation (R)- and (S)-2HB, respectively.

The cultivation of the strains in a medium containing glucose and (RS)-2HB with addition of Val resulted in biosynthesis of PHA containing 8 mol% 2HB. The 2HB fraction was increased up to 35 mol% by deleting *dld* and overexpressing *phaCAR*. ¹H-/¹³C-NMR and solvent fractionation analyses strongly suggested actual formation of block copolymers. This PHA was confirmed to exhibit high biodegradability in deep-sea environments.

Further investigations were done for biosynthesis of the 2HB-containing PHAs from glucose-Thr or solely from glucose. Introduction a feedback-resistant mutation into Thr dehydratase and modifications in pathways for Thr metabolisms increased the 2HB content to 2.5 mol%. While enhancement of Thr biosynthesis by mutagenesis was failed unfortunately, introduction of citramalate pathway allowed us to synthesize PHA with 0.8 mol% 2HB fraction from glucose.

In conclusion, this study indicated that *R. eutropha* is a promising host for producing not only usual random copolymer but also sequence-regulated PHA block copolymers from biomass feedstocks.

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、東京科学大学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 Science Tokyo Research Repository Website (T2R2).