

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |                                                                                                                                                                                                |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文)            |                                                                                                                                                                                                |
| Title(English)    | Metabolic engineering of <i>Ralstonia eutropha</i> for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from biomass                                                                |
| 著者(和文)            | CHAYATIPINSOMPHUN                                                                                                                                                                              |
| Author(English)   | Chayatip Insomphun                                                                                                                                                                             |
| 出典(和文)            | 学位:博士(工学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第9482号,<br>授与年月日:2014年3月26日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:福居 俊昭,中村 聡,丹治 保典,和地 正明,柘植 丈治                                                                          |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Engineering),<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第9482号,<br>Conferred date:2014/3/26,<br>Degree Type:Course doctor,<br>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                                                                                                                                                                                   |

(博士課程)

## 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 |  | Chayatip Insomphun |       |     |
|-------------|-----|-------|---|---------|--|--------------------|-------|-----|
| 論文審査<br>審査員 |     | 氏 名   |   | 職 名     |  |                    | 氏 名   | 職 名 |
|             | 主査  | 福居 俊昭 |   | 准教授     |  | 審査員                | 柘植 丈治 | 准教授 |
|             | 審査員 | 中村 聡  |   | 教授      |  |                    |       |     |
|             |     | 丹治 保典 |   | 教授      |  |                    |       |     |
|             |     | 和地 正明 |   | 教授      |  |                    |       |     |

### 論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は英文で書かれ、「Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from biomass」と題し、5章より構成されている。

第1章「General introduction」では本研究の背景として、現代の石油合成プラスチックによる環境問題とバイオプラスチックの研究開発動向、微生物産生の生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の生合成についての先行研究を概説し、本研究の意義と目的について述べている。

第2章「Modification of  $\beta$ -oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from soybean oil」では、柔軟性に優れたポリ (3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-co-3HHx)]共重合体の効率的生合成を目的とし、*R. eutropha* の $\beta$ -酸化経路の改変を行っている。野生株である H16 株ゲノムに見いだされた3つのエノイル-CoA ヒドラターゼ/3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (FadB) ホモログについて単独および多重遺伝子破壊を行い、FadB1 と FadB'が本菌の $\beta$ -酸化経路に重要であること、および種々の *R. eutropha* 組換え株において大豆油から合成される P(3HB-co-3HHx)への 3HHx ユニットの取り込みが *fadB1* 破壊により 6~21%向上することを見だし、*fadB1* 破壊が植物油原料からの PHA 生産における組成制御法として有効であることを明らかにしている。

第3章「Overexpression of crotonyl-CoA reductase/carboxylase genes in recombinant *R. eutropha* strains for P(3HB-co-3HHx) production」では、多量に存在するバイオマスである糖質を炭素源とした P(3HB-co-3HHx)生合成に着目している。種々の検討の結果、*R. eutropha* の *phaB1* 欠失株である MF01 $\Delta$ phaB1 株にメチロトロフ *Methylobacterium extorquens* 由来クロトニル-CoA レダクターゼ/カルボキシラーゼ遺伝子 (*ccr<sub>Me</sub>*) の発現ベクターを導入することで C<sub>6</sub>ユニットの生合成経路が確立され、3HHx 分率 6.7 mol%の P(3HB-co-3HHx)がフルクトース炭素源から生合成されることを見だしている。また、*Ccr<sub>Me</sub>* の推定 CO<sub>2</sub> 結合部位の一つである Glu 残基を Ala に置換した変異酵素はレダクターゼ活性を維持しつつ低いカルボキシラーゼ活性を示すことを見出している。しかしながら、この変異酵素を発現する *R. eutropha* 株ではフルクトースから生合成する PHA への 3HHx 取り込みは野生型酵素発現株より少なく、*in vivo* での機能は触媒特性とは相関しないとの知見を得ている。一方、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の中鎖鎖特異的エノイル-CoA ヒドラターゼ遺伝子である *phaJ<sub>Pa</sub>* を *ccr<sub>Me</sub>* の下流に連結したベクターを *R. eutropha* MF01 $\Delta$ phaB1 株に導入することで、3HB ユニットおよび 3HHx ユニットの両方を増加させ、P(3HB-co-7.2 mol% 3HHx)を 35 wt%で蓄積させることを達成している。

第4章「Overexpression of *trans*-2-enoyl-CoA reductase genes in recombinant *R. eutropha* strains for P(3HB-co-3HHx) production」では、*Ccr* の代わりにカルボキシラーゼ活性を有しない *trans*-2-エノイル-CoA レダクターゼ (Ter) を糖質からの共重合 PHA 生合成に利用することを試みている。*Methylobacillus flagellatus* および *Pseudomonas putida* に由来する Ter ホモログを見だし、その遺伝子を *R. eutropha* MF01 $\Delta$ phaB1 株に導入したが、フルクトース培養での 3HHx ユニットの取り込みは *Ccr<sub>Me</sub>* を用いた場合より少なく、Ter の十分な機能発現には発現条件のさらなる検討が必要であると結論している。

第5章「General conclusions」では、第2~4章の結果を総括するとともに、本研究の残された問題点を整理し、得られた知見の応用について展望を述べている。

これを要するに、本論文は環境低負荷型プラスチックとして期待されているポリヒドロキシアルカン酸の微生物合成における従来からの問題点を解決し、物性の優れた共重合ポリエステルを安価なバイオマス資源から効率的に生産可能な遺伝子組換え株を確立したものであり、工学上ならびに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と認められる。