T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	共重合ポリエステルの微生物合成におけるモノマー供給代謝の改変および顆粒結合タンパク質の置換による組成制御
Title(English)	Compositional control of microbial copolymer by modification of monomer supplying pathway and replacement of granule-associated protein
著者(和文)	川島由依
Author(English)	Yui Kawashima
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9806号, 授与年月日:2015年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:福居　俊昭,中村　聡,和地　正明,平沢　敬,柘植　丈治
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9806号, Conferred date:2015/3/26, 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

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生物プロセス　　専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（　工学　） Doctor of
学生氏名： Student's Name	川島　由依	指導教員（主）： Academic Advisor(main)	福居　俊昭
		指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	

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

多種の微生物が貯蔵物質として細胞内に蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、再生可能なバイオマス資源を原料とする生分解性プラスチックであることから、環境低負荷型の素材として実用化が期待されている。自然界で最も一般的な PHA であるポリヒドロキシブタン酸 P(3HB)は C_4 ユニットから成るホモポリマーであるが、脆性を示し柔軟性に欠けるため実用化には適していない。一方、ポリ(3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシヘキサン酸)　共重合体［P(3HB-*co*-3HHx)］は優れた柔軟性を示し、また、組成によって物性が変化することが知られている。これまでに P(3HB)生産菌 *Ralstonia eutropha* の改変により、植物油を炭素源として P(3HB-*co*-3HHx)を効率的に生合成する組換え株が作製されているが、3HHx 分率が 0.7～2.7 mol%と低いことが課題となっていた。PHA の幅広い用途での実用化を考慮すると、3HHx 分率を 10 mol%程度で自在に作り分けできることが望ましい。そこで、本研究では *R. eutropha* 組換え株による P(3HB-*co*-3HHx)生合成における組成制御を目的として、モノマー供給代謝と PHA 顆粒結合タンパク質に着目した改変を行った。

R. eutropha 組換え株による植物油からの 3HHx モノマー供給経路はこれまで明らかにされてこなかった。一方、土壌細菌 *Aeromonas caviae* 等では、(*R*)-エノイル-CoA ヒドラターゼ（PhaJ）が脂肪酸β-酸化中間体から PHA モノマーを供給する酵素として見出されている。そこで本研究では、*R. eutropha* H16 株ゲノムに見出された 3 つの PhaJ ホモログ、PhaJ4a$_{Re}$、PhaJ4b$_{Re}$、PhaJ4c$_{Re}$の機能解析を行った。P(3HB-*co*-3HHx)生合成能を有する *R. eutropha* 組換え株を親株として各 *phaJ* の破壊を行った結果、大豆油から生合成された PHA 中の 3HHx 量は *phaJ4a$_{Re}$* 破壊により約 50%が減少し、PhaJ4a$_{Re}$ の 3HHx モノマー供給への関与が示された。また、染色体 *pha* オペロンに *phaJ4a$_{Re}$*、*phaJ4b$_{Re}$* を導入したところ、大豆油からの高い PHA 生産効率を維持しつつ 3HHx 分率を増加させることが可能であった。最適株では 3HHx 分率が 10.1~10.5 mol%の P(3HB-*co*-3HHx)を約 3.9 g/l-culture の生産効率で生合成した。

共重合 PHA の組成制御のための新たな改変戦略として、PHA 顆粒結合タンパク質 phasin (PhaP)に着目した。phasin は PHA 生産菌の細胞内で PHA 顆粒に結合し顆粒を安定に維持すると考えられており、PHA シンターゼ（PhaC）の活性にも影響することが近年報告されている。また、*R. eutropha* H16 株における主要 phasin である PhaP1$_{Re}$ は PHA 蓄積期特異的に非常に強く転写されることが知られている。そこで *R. eutropha* の P(3HB-*co*-3HHx)生合成組換え株の *phaP1$_{Re}$* 下流へ *phaJ$_{Ac}$* または *phaC$_{NSDG}$-phaJ$_{Ac}$* を挿入したところ、3HHx 分率の増加が確認され、特に *phaC$_{NSDG}$-phaJ$_{Ac}$* を挿入した株では 10.5 mol%に達した。さらに、これらの株において *phaP1$_{Re}$* の *phaC$_{NSDG}$* と同じ微生物由来の *phaP$_{Ac}$* への置換を行った結果、PHA 生合成経路は同一であるにも関わらず 3HHx 分率の増加が見られ、*phaP* 置換が組成制御に有効な改変戦略であることが示された。*phaC$_{NSDG}$-phaJ$_{Ac}$* 導入株に *phaP* 置換を施した株では 3HHx 分率が 17.2 mol%にまで増加した P(3HB-*co*-3HHx)を 5.0 g/l-culture と高い生産効率で生合成した。PHA 顆粒を含む不溶性画分を用いた PHA シンターゼ酵素活性測定を C_4、C_6 基質に対して行ったところ、PhaP$_{Ac}$ 共存下では C_6 基質への親和性が特異的に高くなることが示され、この触媒特性の変化により蓄積 PHA の組成変化が起こったものと推測された。一方で、*R. eutropha* 改変株を用いて糖質またはグリセロールからの PHA 生合成における *phaP* 置換の影響を検討したところ、顕著な影響は見られなかった。

本研究により、*R. eutropha* 組換え株において PhaJ4a$_{Re}$ が 3HHx モノマー供給を担う主要な酵素のひとつであることが示され、PhaJ および PhaP の機能を利用した改変は共重合 PHA の組成制御に有効な手段であることが示された。

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 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	生物プロセス　　専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（　工学　） Doctor of
学生氏名： Student's Name	川島　由依	指導教員（主）： Academic Advisor(main)	福居　俊昭
		指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	

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

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are produced by various bacteria as intracellular energy-storage materials from renewable carbon sources. As PHAs are biodegradable thermoplastics, they have been attracted as alternatives to petroleum-based polymers. Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-*co*-3HHx)] has been known as a practical PHA with higher flexibility compared to P(3HB) homopolymer. Previous studies have demonstrated efficient biosynthesis of P(3HB-*co*-3HHx) by engineered *Ralstonia eutropha* from vegetable oils and many efforts have been made to increase 3HHx composition of the copolyester. This study focused on (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase (PhaJ) and PHA granule-associated protein (PhaP) to regulate P(3HB-*co*-3HHx) composition.

In *R. eutropha*, the metabolic linkage between fatty acid β-oxidation and PHA biosynthesis had not been elucidated. This study investigated *in vivo* functions of the three proteins, PhaJ4a-c_{Re}, shared high homologies with medium-chain-length PhaJs. The $phaJ4a_{Re}$ deletion in *R. eutropha* demonstrated that PhaJ4a_{Re} was one of the major enzymes supplying (*R*)-3HHx-CoA through β-oxidation with acetoacetyl-CoA reductase (PhaB1$_{Re}$). The 3HHx composition of PHA synthesized from soybean oil was enhanced by overexpression of $phaJ4a_{Re}$ or $phaJ4b_{Re}$.

As another modification strategy aiming compositional regulation of PHA, PHA granule-associated protein (PhaP) was focused on. First, it was demonstrated that the downstream of $phaP1_{Re}$ was a useful insertion site for overexpression of genes during PHA biosynthesis phase. Next, $phaP1_{Re}$ was replaced by $phaP_{Ac}$ from *Aeromonas caviae* in *R. eutropha* strains possessing $phaC_{NSDG}$ originally from *A. caviae*. This modification increased 3HHx composition of P(3HB-*co*-3HHx) from soybean oil. The enzyme assay using PHA synthase adsorbed on the PHA granule surface suggested that the affinity of the enzyme toward the C_6 substrate was specifically increased by $PhaP_{Ac}$, which may be responsible for the compositional change.

In conclusion, the modifications of *R. eutropha* based on the functions of PhaJ and PhaP were effective to achieve efficient production of PHA copolymers with increased 3HHx composition.

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).