

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Study on Activity Modulation of Polyhydroxyalkanoate Synthases by Amphiphilic Molecules
著者(和文)	牛丸和乗
Author(English)	Kazunori Ushimaru
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9821号, 授与年月日:2015年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:柘植 丈治,阿部 英喜,原 亨和,田中 寛,福居 俊昭
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9821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)	要約
Type(English)	Outline

# 論文の要約

やむを得ない事由により論文全文を公表できないため、要約を以下のとおり提出いたします。

専攻： Department of	物質科学創造	専攻	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	工学
学生氏名： Student's Name	牛丸 和乗		指導教員 (主)： Academic Advisor(main)	柘植 丈治	
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)	阿部 英喜	

## [研究論文の概要]

論文題目：Study on Activity Modulation of Polyhydroxyalkanoate Synthases by Amphiphilic Molecules  
(両親媒性分子によるポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の活性調節に関する研究)

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、糖や植物油などのバイオマス資源を原料として微生物により合成されるポリエステルで、熱可塑性及び優れた生分解性・生体適合性を有することから環境調和型プラスチックや医用材料としての応用が期待されている。PHA の生合成において最も重要な役割を果たす酵素が PHA 重合酵素 (PhaC) である。PhaC は、常温・常圧・水溶液中という温和な条件で高い重合能を示すことから、本酵素による重合反応に関する知見は低環境負荷の重合触媒開発などの分野への応用が期待される。PhaC の重合反応を理解する上で有効なアプローチのひとつに、*in vitro* (細胞外) 実験による重合反応解析が挙げられる。この手法は化学合成により調製したモノマー (*R*-3HA-CoA) と精製した PhaC を用いて反応を行い、反応速度論的な解析から重合反応に関する知見を得るというものである。これまでに、いくつかの先行研究で界面活性剤などの両親媒性分子が PhaC の基質消費速度を向上させることが報告されているが、この現象を微生物細胞内で進行する PHA 重合反応と関連付ける研究は行われていなかった。本研究では両親媒性分子が細胞内で PhaC 活性化因子として機能することができるかを検証するために、界面活性剤および両親媒性タンパク質が PhaC による重合反応に与える影響を *in vitro* および *in vivo* の両アプローチにより調査した。

第一章「General Introduction」では、本研究の背景を概説し、本論文の目的および構成を示した。

第二章「Activation of Polyhydroxyalkanoate Synthase by Detergents and Its Application for Kinetic Analysis」では、*Ralstonia eutropha* 由来 PhaC (PhaC<sub>Re</sub>) による重合反応時に、界面活性剤が与える影響を *in vitro* 重合反応を用いて評価した。先行研究において Hecameg と呼ばれる界面活性剤による PhaC<sub>Re</sub> の基質消費速度向上効果が報告されているが、この現象が Hecameg に特異的な現象であるかという点に関する検証は未だ行われていなかった。Hecameg を含む 5 種類の界面活性剤を *in vitro* 重合反応時に添加し基質消費速度を評価したところ、Hecameg 以外の界面活性剤のうち 3 種において基質消費速度の向上効果が確認された。これに加えて、界面活性剤添加濃度の検討を行ったところ、基質消費速度の向上効果は界面活性剤濃度に依存して変化し、臨界ミセル濃度 (CMC) 以下の濃度 (0.07 ~ 0.4CMC) において極大値を示した。これらの結果は Hecameg の分子構造そのものでなく、両親媒性を有する分子が広く PhaC の基質消

費速度の向上因子として機能しうること、および、その効果を発揮するためにミセルのような特殊な集合状態は必要としないことを示唆するものであった。なかでも 0.25CMC の Triton-100 添加は、顕著な基質消費速度の向上効果のみでなく誘導期の消失に効果的であったため、これを  $\text{PhaC}_{\text{Re}}$  の反応初速度の算出に応用し  $\text{PhaC}_{\text{Re}}$  に対する種々の速度論パラメーターを決定することに成功した。また、基質誘導体である 3'-デホスホ-(R)-3-ヒドロキシブチリル CoA を用いた速度論解析の結果から、 $\text{PhaC}_{\text{Re}}$  がモノマー構造認識時に 3'位リン酸基との相互作用で酵素-基質複合体を安定化していることを明らかにした。

第三章「A Novel Function of Phasin Proteins as a Modulator of PHA Synthases Activity」では細胞内に存在する両親媒性分子として PHA 顆粒結合タンパク質 (PhaP) に着目し、この分子が PhaC の活性化因子として機能するのかが *in vitro* および *in vivo* の両実験から評価した。*Aeromonas caviae* 由来の重合酵素 ( $\text{PhaC}_{\text{Ac}}$ )、精製した PhaP (*A. caviae* 由来  $\text{PhaP}_{\text{Ac}}$  または *R. eutropha* 由来  $\text{PhaP1}_{\text{Re}}$ ) および化学合成で調製したモノマーを用いた *in vitro* 反応では、PhaP 添加濃度に応じた基質消費速度の向上効果が確認された。一方で、重合酵素を  $\text{PhaC}_{\text{Re}}$  に変更して行った反応では、PhaP 添加濃度に応じた基質消費速度の減少効果が観測された。これらの *in vitro* 実験から、PhaP が界面活性剤同様に PhaC による基質消費速度を直接的に調節可能であることが示された。この基質消費速度調節効果が細胞内でも機能しているのかを検証するために、遺伝子組換え大腸菌に PHA 生合成遺伝子群と PhaP 発現遺伝子を導入し、グルコースからの PHA 生合成を行った。この結果、 $\text{PhaC}_{\text{Ac}}$  を導入した大腸菌では PhaP 発現による PHA 蓄積増加 (生産性 4.2 倍) が確認されたのに対して、 $\text{PhaC}_{\text{Re}}$  を導入した大腸菌では、 $\text{PhaC}_{\text{Ac}}$  を用いたときのような劇的な PHA 蓄積増加は確認されなかった。これらの結果から両親媒性分子である PhaP が、 $\text{PhaC}_{\text{Ac}}$  に対する活性化剤として *in vitro* および *in vivo* のいずれにおいても機能することを示した。

第四章「Enhanced Accumulation of Polyhydroxybutyrate in *Escherichia coli* via Control of Phasin Expression by Gene Mutation」では、PHA 高生産化変異体である  $\text{PhaP}_{\text{Ac}}$  変異体 (D4N 変異体) の PHA 高生産化機構の解析を行った。第三章で得られた知見に基づき、D4N 変異体は  $\text{PhaP}_{\text{Ac}}$  による  $\text{PhaC}_{\text{Ac}}$  の重合活性化能向上もしくは細胞内 PhaP 量増加に寄与しているという仮説を立て、*in vitro* および *in vivo* 実験によりその評価を行った。精製した  $\text{PhaC}_{\text{Ac}}$  と  $\text{PhaP}_{\text{Ac}}$  を用いた *in vitro* 試験により、野生型および D4N 変異体による  $\text{PhaC}_{\text{Ac}}$  活性化能を評価したところ、D4N 変異による活性化能向上は確認されなかった。一方、PhaP の細胞内発現量を評価し、D4N 変異によって細胞内 PhaP 量が増加していることを明らかにした。また、この PhaP 発現プラスミドを PHA 生合成遺伝子群とともに遺伝子組換え大腸菌に導入したところ、D4N 変異体では野生型の PhaP 発現株に比べて 1.4 倍の PHA 高蓄積化が確認された。加えて、D4N 変異を *A. caviae* 由来の PHA 生合成遺伝子群に導入した場合、*phaP* の下流に位置する遺伝子の発現量も増加し、野生型 PhaP 株に比べて 10 倍以上の PHA 高生産化が可能であることを示した。

第五章「Summary」では、本研究で得られた両親媒性分子による PhaC 活性調節機能に関する知見と、その応用としての PHA 高生産化の結果をまとめた。