

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	補酵素再生系の強化によるポリヒドロキシアルカン酸の生合成
Title(English)	
著者(和文)	宮原佑宜
Author(English)	Yuki Miyahara
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10976号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:柘植 文治,北本 仁孝,和田 裕之,林 智広,福居 俊昭,阿部 英喜
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10976号, Conferred date:2018/9/20, 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

(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	宮原 佑宜	
論文審査 審査員	氏名	職名	審査員	氏名	職名
	主査 柘植 丈治	准教授		福居 俊昭	教授
	審査員 北本 仁孝	教授		阿部 英喜	特定教授
	審査員 和田 裕之	准教授			
	林 智広	准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「補酵素再生系の強化によるポリヒドロキシアルカン酸の生合成」と題し日本語で書かれ、全五章から構成されている。

第一章「序論」では、本研究の背景として、生分解性プラスチック素材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。また、PHA生合成においては多くの還元力を必要とするものの、還元力をもたらす補酵素NADPHが十分には供給されておらず、PHA生産を制限している可能性について言及している。そして本研究の目的として、NADPHの供給酵素である亜リン酸デヒドログナーゼ二重変異体(PtxD_{EAAR})に着目し、細胞内における補酵素再生系を強化することで、効率的なPHA生産を行うための新規手法を開発することと述べている。

第二章「亜リン酸デヒドログナーゼ二重変異体(PtxD_{EAAR})を利用したP(3HB)のin vitro重合」では、in vitroにて補酵素再生系を構築し、PHAの一種であるポリ(3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]の重合と組み合わせることで、NADPH再生を介してお互いの反応が進行するのかを調べている。まずははじめに、PtxD_{EAAR}によるNADPH生成反応について、化学量論解析および速度論解析を行っている。これにより、PtxD_{EAAR}を用いた酵素反応では、酸化した亜リン酸とほぼ等モルのNADPHが生成することを確認している。さらに、PtxD_{EAAR}はNAD⁺に対して高い親和性を有し、NAD⁺と比較して触媒効率が3.1倍に向上了ことを確認している。続いて、PtxD_{EAAR}とP(3HB)重合に必要なアセトアセチルCoAレダクターゼ(PhaB)およびPHA重合酵素(PhaC)を用いて、P(3HB)重合と補酵素再生系の連動について調べている。その結果、in vitro系においてPtxD_{EAAR}を用いた補酵素再生系は十分に機能し、これを用いてP(3HB)重合が可能であることを示している。

第三章「補酵素再生系強化によるP(3HB)の生合成」では、組換え大腸菌を用いたP(3HB)生合成を目的として、in vivo系におけるPtxD_{EAAR}の利用について調査している。PtxD_{EAAR}を発現させた大腸菌において、培養液中の亜リン酸消費およびリン酸生成を確認しており、細胞内でPtxD_{EAAR}を用いた酵素反応が正しく機能することを示している。次いで、PtxD_{EAAR}による補酵素再生系を用いてP(3HB)生合成を行い、NADPH供給強化がポリマー生産へ与える影響を調べている。その結果、二段培養法を用いた際にP(3HB)生産収率を3.2倍強化することに成功している。

第四章「補酵素再生系強化によるP(3HB-co-3HHx)生合成」では、P(3HB-co-3-ヒドロキシヘキサン酸)[P(3HB-co-3HHx)]生産の強化および共重合PHAに含まれる3HHxモノマー分率の向上を目的とし、PtxD_{EAAR}による補酵素再生系を、大腸菌を宿主とした共重合PHA生産へ適用している。完全培地を用いた一段培養では、亜リン酸の添加によって多量の酢酸合成が確認され、菌体生育においてエネルギー不足になっている可能性を指摘している。そこで、細胞合成とポリマー合成を切り分けるために、生育を止めた菌体を用いてP(3HB-co-3HHx)生合成を行っている。結果、補酵素供給とポリマー合成とをリンクさせることで、P(3HB-co-3HHx)生産を1.5倍、3HHxモノマー分率を2.2倍増加することに成功している。これにより、PtxD_{EAAR}を用いた補酵素供給強化はP(3HB)生産だけでなく、柔軟性を有し実用的な共重合体であるP(3HB-co-3HHx)生合成にも適用が可能であることを示している。

第五章「総括」では、本研究で得られた結果を要約するとともに、今後の展望を述べている。

これを要するに本論文は、実用的な環境低負荷型高分子材料を創成する観点から、PHAの微生物生産における還元力供給に着目して研究を行い、亜リン酸デヒドログナーゼ二重変異体を活用することで効率的なPHA生産が可能であることを示したものであり、工学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。