

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)	要約
Type(English)	Outline

配列制御型重合酵素を導入した *Ralstonia eutropha* 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

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を示す環境調和型高分子素材である。2024 年現在では数種の PHA 共重合体が一部実用化されているが、さらなる素材種の拡大に向け、PHA 重合酵素である PHA シンターゼ (PhaC) の工学的改変などによる PHA 生合成の拡張や制御の研究がなされてきた。

PhaC による重合は鋳型分子非依存的な末端伸長で進行するため、モノマー配列の規則性が低く、PHA 共重合体におけるモノマー配列はランダム性が高い。一方で、近年開発されたキメラ型 PHA シンターゼ PhaC_{AR} 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ことから、PhaC_{AR} による PHA ブロック共重合体の生合成は新たな PHA の開発に有効な手段として期待される。しかし、PhaC_{AR} によるブロック共重合現象については依然として不明点が多い。本研究では天然の PHA 生産菌であり、複雑でロバストな代謝を有する *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus necator*) H16 株を宿主として、PhaC_{AR} によるブロック共重合現象についての新たな知見の取得や安価な炭素源からのブロック共重合体の生産を目指した。

ポリ (3-ヒドロキシブタン酸-*block*-2-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB-*block*-2HB)] を生合成対象とし、まず、*R. eutropha* H16 グルコース資化性改変株を親株として PhaC_{AR} 発現株 (IF001 株) を構築した。さらに、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 供給経路を構築するために *Clostridioides difficile* 由来 2-ヒドロキシイソカプロン酸デヒドロゲナーゼおよび 2-ヒドロキシイソカプロン酸 CoA トランスフェラーゼの遺伝子を IF001 株染色体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 添加培養での PHA 生合成を試みたところ、予想外にも菌体生育が著しく阻害されること、そして 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。*R. eutropha* 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 添加培養を行ったところ、IF002 株では 2HB ユニットを 8 mol% 程度含有した PHA が生合成された。さらに Dld の欠失と PhaC_{AR} の過剰発現により 2HB ユニット分率が 35 mol% に増加した。¹H/¹³C-NMR による構造解析および THF 溶媒分別から、*R. eutropha* が生合成した 2HB ユニット含有 PHA は P[(3HB-*random*-3HV)-*block*-2HB] であることが強く示唆された。

これら成果をもとに、*R. eutropha* におけるアミノ酸代謝経路に改変をさらに加えることにより、アミノ酸あるいはグルコースを単一の炭素源として 1~数 mol% の 2HB を含有した PHA 共重合体を生合成可能な改変株の構築に成功した。

本研究で得られた成果は、新規生分解性材料の創出、ひいては持続可能性の循環型社会の実現に貢献することが期待される。