

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 松本 謙一郎

本論文は、生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の微生物生産について遺伝子・タンパク質レベルで合成メカニズムを解析し、その応用によってさらに効率よく PHA を生産することを検討したものである。PHA 生合成に関与する酵素遺伝子のクローニング、遺伝子組換えによる代謝解析、PHA 合成に関わるタンパクの解析、新しい代謝経路の構築などが含まれている。本論文では、汎用樹脂として優れた物性を持つ PHA の一種、poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) [P(3HB-co-3HA)] ランダム共重合体を合成する唯一の菌である *Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 生合成機構を解析した。また、その生合成経路を他の菌に導入することで、より PHA の生産性を高めた。本論文では、糖を炭素源とした代謝経路を用いたところに特徴がある。糖は安価であり、培養操作が油類より容易である。また、糖を出発物質とした PHA 生合成経路は、その他の様々な炭素源に応用することができる。本論文は、全5章から構成される。

第1章では、本論文の意義を明確にするために、PHA の機械的・熱的性質や、現在までに明らかにされている PHA 生合成経路、よく知られている PHA 生産菌の性質について述べている。

第2章では、*Pseudomonas* sp. 61-3 の P(3HB-co-3HA) 合成経路のなかで、いまだ明らかにされていなかった 3-hydroxyacyl-CoA を供給する酵素であると考えられるアシルトランスフェラーゼ (PhaG) をコードする遺伝子のクローニングについて述べている。*phaG* 遺伝子の破壊株と相補株を作成することで、*phaG* 遺伝子の遺伝子産物が 3-hydroxyacyl-CoA の供給経路になっていることを明らかとした。*phaG* 遺伝子のクローニングによって、*Pseudomonas* sp. 61-3 において糖から P(3HB-co-3HA) を合成する代謝経路のすべての酵素遺伝子が取得された。また、PhaG のアミノ酸置換変異酵素を作成することで、177 番目の His 残基が活性に必須であるということを示した。

第3章では、第2章で明らかにした代謝経路を PHA 生産菌の一種である *Ralstonia eutropha* に導入することで、糖を炭素源として P(3HB-co-3HA) を合成させることを検討している。*R. eutropha* は PHA 生産能力が高く、大量培養が可能な、工業生産に適した菌である。*R. eutropha* に *Pseudomonas* sp. 61-3 の重合酵素遺伝子と *phaG* 遺伝子を導入することで、糖を炭素源として P(3HB-co-3HA) を合成させることができた。この組換え株が合成した PHA は、融点が比較的低温で溶解成型が容易であることがわかった。また、PHA 生産挙動を詳しく解析することで、PHA 生産は重合ステップが律速であることを示した。*R. eutropha* を宿主とした糖からの P(3HB-co-3HA) の合成と、*phaG* 遺伝子の *Pseudomonas* 属以外での異宿主発現は、いずれも初めて報告である。さらに、PhaG の抗体を作成し、*Pseudomonas* sp. 61-3 と大腸菌で発現している PhaG タンパクのサイズをウエスタン解

析で調べた結果、PhaG が何らかの翻訳後修飾を受けていることを明らかにした。

第4章では、*Pseudomonas* sp. 61-3 の菌体内に存在する PHA 粒子 (PHA inclusion) とその表面タンパクについての解析を行っている。PHA inclusion の表面にはいくつかの特異的なタンパクが結合している。菌体を French Press で破碎し、ショ糖密度勾配遠心で分画することで PHA inclusion を単離し、次いで SDS-PAGE を行うことで、PHA inclusion に結合しているタンパクを分離した。それぞれのタンパクを Edman 分解による N 末アミノ酸配列解析により同定し、重合酵素や phasin と呼ばれる PHA 結合タンパクが特異的に存在していることを明らかにした。さらに、炭素数が 4~12 までの 3-hydroxyacyl-CoA を人工的に合成し、その基質を用いて PHA inclusion に結合している重合酵素の酵素活性を測定した結果、共重合体の組成が重合酵素の各基質に対する相対活性によって決まっていることが明らかとなった。PHA 重合酵素の炭素数が 4~12 までの基質に対する相対活性は本研究により始めて測定されたものである。

第5章においては、本研究を総括し、今後の展望を述べている。

以上述べてきたように、本論文は、優れた物性を持つ P(3HB-co-3HA)の合成に関わる酵素遺伝子を取得し、また関連するタンパク質の性質を解析したものである。明らかになった代謝経路を異宿主に導入することによる、新規な PHA 生産も行っている。この結果は、微生物が PHA を蓄積する生物学的な意義を解明すると共に、環境低負荷型の生分解性プラスチック材料としての応用が期待される PHA の高機能化、低コスト化に対して、重要な知見を与えるものである。

よって、本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。