

## 学 位 論 文 題 名

Metabolic engineering for biosynthesis of  
polyhydroxyalkanoates in *Corynebacterium glutamicum**(Corynebacterium glutamicum の*

ポリヒドロキシアルカン酸生合成のための代謝工学)

## 学位論文内容の要旨

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is biologically produced polyesters that have much attention as biodegradable polymers. Various practical uses of PHAs have been developed and described in the numerous patents. An important characteristic of PHAs is biocompatibility which paves the way for its medical application. However, endotoxin, a pyrogen known to be co-purified with the PHA produced in gram-negative bacteria, is an obstacle for its medical application. The removal of endotoxin has been deliberated with various methods for PHAs medical application, but a trace amount of endotoxin is still remained. *Corynebacterium glutamicum*, a gram-positive bacterium, is famous as amino acid producer and does not produce endotoxin, thus having many advantages for fermentative production. In this study, I initiated the study on production system for PHA using *C. glutamicum* as a host strain.

A biosynthetic pathway for poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], one of the major PHA, production in *C. glutamicum* was developed by introducing the PHA biosynthetic operon (*phaCAB*) derived from *Ralstonia eutropha*. The operon encodes monomer-supplying enzymes,  $\beta$ -ketothiolase (PhaA) and acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) and PHA synthase (PhaC). PhaC activity was detected in the recombinant *C. glutamicum*. Intracellular P(3HB) was microscopically observed as inclusion granules. P(3HB) content of recombinant *C. glutamicum* was determined to be 22.5 wt%. A number average molecular weight and a polydispersity of biosynthesized P(3HB) were  $2.1 \times 10^5$  and of 1.63, respectively. This is the first report on an endotoxin-free production system of P(3HB) in recombinant *C. glutamicum*.

Because polymer content is a dominant factor for cost of production, I attempted to increase P(3HB) content in *C. glutamicum*. Two experimental strategies have been applied to improve P(3HB) production in recombinant *C. glutamicum*. One is introduction of the engineered *phaC* gene into *C. glutamicum* to enhance the production of PhaC. The other one is a gene dosage of *phaAB*. Each method increased the P(3HB) production up to 1.3 and 1.7-fold, respectively, and the highest production (52.5

wt%) of P(3HB) was finally achieved by combining the strategies of gene dosage and engineered *phaC*. The molecular weight of P(3HB) was also increased by approximately 2-fold, as was P(3HB) content. Microscopic observation revealed that the volume of the cells accumulating P(3HB) was increased by more than 4-fold compared with the non-P(3HB)-accumulating cells.

Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-*co*-3HV)] copolymers are more flexible than P(3HB) homopolymer and have various properties depending on the molar fraction of its second monomer unit of 3HV. For P(3HB-*co*-3HV) copolymer biosynthesis, propionyl-CoA should be co-supplied with acetyl-CoA. In this study, feeding strategy of propionate, which is a precursor of propionyl-CoA, was considered for P(3HB-*co*-3HV) production in *C. glutamicum*. Molar fraction of 3HV unit in P(3HB-*co*-3HV) was increased up to 26 % associated with propionate concentration of in the culture medium. The recombinant cell accumulated 44.2 wt% of P(3HB-*co*-3HV) with 13.8 mol% of 3HV on MMTG medium containing 6% glucose and 4% propionate.

This study demonstrates the feasibility of metabolic engineering to construct an artificial pathway by introducing a series of genes for PHA production in *C. glutamicum*. Adequate strategies based on the metabolic pathway of PHA led this study to succeed. This beneficial system will facilitate further next-generation research studies such as those on the biosynthesis of 3HB-based copolymers including P(3HB-*co*-3HV) with desirable properties and the industrial production of biopolymers together with amino acids from renewable carbon sources.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 口 精 一

副 査 教 授 棟 方 正 信

副 査 教 授 高 木 睦

学 位 論 文 題 名

## Metabolic engineering for biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Corynebacterium glutamicum*

(*Corynebacterium glutamicum* の

ポリヒドロキシアリカン酸生合成のための代謝工学)

微生物が生産する生分解性プラスチックの一つであるポリヒドロキシアリカン酸 (PHA) は、石油由来のプラスチックの代替としての利用が期待されている。PHA の生産は、これまでグラム陰性細菌による効率的な生合成研究を中心になされてきた。しかし、グラム陰性菌は人体に有害な内毒素を含有するため、グラム陰性菌で生産した PHA の生体医療材料や食品容器などへの応用は不適であると考えられている。そのために食品や医薬品製造等に利用される安全性の高いグラム陽性細菌による PHA 生産が有望視されているが、現状ではほとんど研究がなされていない。

本論文では、アミノ酸の発酵生産に用いられるグラム陽性の実用菌株である *Corynebacterium glutamicum* (コリネ菌) に PHA 生合成経路を構築することにより、新しい PHA の生産手法を開発したものであり、PHA 生産において新しい知見および応用可能な成果を得ている。

以下に本論文の概要を示す。

第 1 章では、本研究の背景と目的を述べ、本論文の構成を説明している。

第 2 章では、PHA 生合成遺伝子群を導入した組換えコリネ菌による PHA の生産を検討している。PHA 生産菌である *Ralstonia eutropha* 由来のモノマー供給酵素である PhaA ( $\beta$ -ketothiolase)、PhaB (NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase) と重合酵素である PhaC (PHA synthase) をコードする生合成遺伝子群をコリネ菌に導入した結果、これら外来の PHA 合成遺伝子群はコリネ菌で正常に機能し、グルコースを炭素源としてはじめてコリネ菌でポリヒドロキシブタン酸 (PHB) を生産し、菌体内に蓄積させることができることを示した。

第 3 章では、前章で得られた知見を基盤に、さらに PHB の効率的な生産のため、菌体内の PHB 蓄積率を大幅に上昇させる目的で、PHB 生合成系遺伝子の発現量の増強を試み

た。モノマー供給系遺伝子を増強した場合は、PHB の菌体内蓄積率が 1.7 倍に上昇し、改変重合酵素の場合では 1.3 倍に蓄積率が上昇した。さらに、モノマー供給系遺伝子の増強と重合酵素の改変を組み合わせた相乗効果により、PHB 蓄積率が 2.3 倍に増加した。最大の PHB 蓄積率は 52.6% に達し、PHB 生合成系遺伝子群の発現量増強が、PHA 生産の効率化に有効であることを明らかにした。

第 4 章では、コリネ菌が生産する PHA に多様な物性を持たせ高機能化させることを目的に、3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) を第二モノマーユニットとして含む共重合体の合成を検討した。3HV の供給源として、培地中にプロピオン酸を加えてコリネ菌を培養し、共重合 PHA が合成されることを実証した。その際、プロピオン酸添加による細胞毒性を考慮し、プロピオン酸濃度に依存して 3HV 分率を向上させる条件を確立した。第 2 章で得た遺伝子発現量増大の戦略をこの共重合体合成にも応用できるであろう。さらに、3HV ユニットを含んだ共重合 PHA の熱的性質を分析したところ、予想通り熱融解温度とガラス転移温度の低下が観察され、共重合化された効果が認められた。

第 5 章は、結論であり、論文全体の成果を要約している。

これを要するに著者は、初の試みとして安全性の高いグラム陽性細菌であるコリネ菌を宿主として用い、この宿主に PHA 生合成経路を導入することで、PHA ホモポリマーおよびコポリマーの生産について有益な新知見を得たものであり、代謝工学に基づく物質生産のみならず生物工学の分野に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格が十分あるものと認める。