

学 位 論 文 題 名

In vitro ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 合成系の
改良と新規 PHA の創製

学位論文内容の要旨

近年、温室効果ガスによる地球温暖化や廃棄プラスチックによる環境破壊、原油の枯渇などが大きな社会問題となっており、石油に依存しない環境循環型社会構築のための基盤技術の開発が急務となっている。このような背景から、土壌や水中の微生物により分解、自然界の物質循環系に組み込まれ、環境に調和する環境循環型プラスチック材料の開発が注目されている。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、微生物によって再生可能な資源から作られるバイオポリマーであり、生分解性、生体適合性など優れた性質を有していることから、環境循環型社会にマッチする材料として学術研究だけでなく産業応用に関しても様々な研究が行われている。これまでに、様々な構造・物性の PHA が作り出されてきているが、更なる機能性を付与するためには、新しい構造を有するモノマーユニットを導入する必要がある。

PHA の合成方法として *in vivo* 合成法 (発酵法) と *in vitro* 合成法の二つがある。*In vivo* 合成法では、油脂や糖質などの再生可能資源を使用することができ、大量生産に適している。しかし、モノマーユニット組成のコントロールが比較的困難であり、基質供給に関与する酵素の基質特異性によって供給される基質構造が限定される。一方、*in vitro* 合成法では、モノマーユニット組成のコントロールが比較的容易であり、基質合成経路が微生物に依存せず、基質を自由に設計・合成し、PHA 合成酵素 (PhaC) と反応させることにより、様々な構造を有する PHA の合成が可能である。しかし、*in vitro* 合成法では PHA の収量が少なく、高価な試薬を使用する必要がある。これまでに、いくつかの *in vitro* PHA 合成系が報告されている。1998 年に CoA のリサイクル経路を導入した *in vitro* PHA 合成系 (一相反応系 (OPRS)) が報告された。この反応系では、CoA のリサイクルは可能であるが、アセチル CoA 合成酵素 (ACS)、プロピオニル CoA 転移酵素 (PCT)、PhaC の三つの酵素を使用し、さらに、反応の進行のために ATP の供給が必要である。一方、田島らによって報告された水-有機溶媒二相反応系 (TPRS) では、基質前駆体 (ヒドロキシ脂肪酸のチオフェニルエステル) を化学的に合成することにより、CoA をリサイクルしながら、ATP を使用せずに poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) を合成することに成功している。

このように、*in vitro* 合成系では、様々な PHA 合成酵素と最終的な生成物である PHA の機能性を考慮した基質前駆体を導入することにより、これまでにない全く新しい PHA を創製することができる可能性がある。そこで、本論文では、これまで報告されている *in vitro* 合成系 (TPRS) を新規 PHA の創製に応用すると共に、合成系の改良を行い、さらにそれを用いた新規 PHA の創製も行った。本論文は 4 章から構成されており、それぞれの概要を以下に示した。

第一章では、生分解性プラスチック、PHA に関する背景を記述し本研究の目的を明らかにした。

第二章では、TPRS を応用した新規 PHA の創製について述べた。これまで、乳酸がモノマーユニットとして含まれた PHA を酵素によって合成した報告例はない。一方、化学的に PHA に乳酸ユニットを導入することによって、PHA の物性を改良されることが報告されている。しかし、化学的にコポリマーを合成するためには別々に調製した PHA とラクチドを反応させる必要があり、酵素によって乳酸と PHA を同時にコポリマー化することができれば、より効率的な合成が可能になる。酵素的にこのコポリマーを合成するためには、まず乳酸を重合可能な酵素を見つける必要がある。合成酵素と基質のみを含む TPRS をスクリーニング系に用いることにより、PHA 合成酵素の中から乳酸重合酵素を見いだすことに成功した。この酵素は、田口らによって創製された進化型酵素であり、NMR、GPC 解析の結果から立体選択的に、3HBCoA の存在下において (R)-LA を重合し、poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate))(P(LA-co-3HB)) を合成することが確認された。

第三章では、OPRS と TPRS の利点を生かした、改良 TPRS の開発とその応用について述べた。ここでは、これまでに報告されている in vitro 合成系 (OPRS、TPRS) の問題点を解決するために、効率的な新規 in vitro 合成系の改良 (改良 TPRS の開発) を行った。この系では、AcCoA の前駆体としてエチルチオグリコレート (ETG) のアセチルチオエステル (AcETG) を用い、有機溶媒相と水相の界面におけるエステル交換反応によって、AcCoA を生成させた。水相に存在する PCT の働きによって遊離のヒドロキシ脂肪酸 (HA) を PHA 合成酵素の基質となる HAcCoA に変換した。最終的に PHA 合成酵素によって重合し、PHA を合成した。TPRS に使用されていたチオフェノール (TP) は PhaC の阻害剤であり、ETG を使用することにより、反応速度と収量が向上した。さらに、反応に使用する酵素の数を少なくするために、PCT-PhaC 融合酵素を調製し、これを改良 TPRS に導入した。この系を用い 3HB、3-hydroxypropionate(3HP)、3-mercaptopropionate(3MP) を基質前駆体として、P(3HB)、P(3HB-co-3HP)、P(3HP)、P(3HB-co-3MP) を様々なモノマー組成比で合成することに成功した。

改良 TPRS では、HA を誘導体化する必要がなく、直接使用することが可能である。そこで様々な構造を有する HA を基質前駆体として改良 TPRS に導入することにより、新しい PHA の創製を試みた。その結果、*Ralstonia eutropha* 由来の PhaCRe を用いることにより、これまで報告されていない 2-hydroxybutyrate(2HB) と 3HB から成る P(3HB-co-2HB) の創製に成功した。

また、PhaC は R 体の基質しか重合せず、効率的に PHA を合成するために、反応に用いる HA には高い光学純度が要求される。一般的に光学純度が高い試薬は価格も高く、しかも入手が困難である。そこで、基質前駆体として不飽和脂肪酸を導入し、さらに (R)-特異的エノイル CoA ヒドラーゼ (PhaJ) を共存させることによって PHA の合成を行った。その結果、改良 TPRS において、不飽和脂肪酸から P(3HB)、P(3HB-co-3HV) の合成が確認された。また、クロトン酸を基質前駆体とした場合の P(3HB) の収量は、3HB を基質前駆体とした場合より多かった。これらの結果から、改良 TPRS において、より安価な不飽和脂肪酸から効率的に PHA 合成が可能であることが示された。

第四章は総括であり、本研究で得られた成果についてまとめた。本研究において、TPRS をスクリーニング系として用いることにより、進化型を含む様々な PHA 合成酵素の中から乳酸重合酵素を発見し、LA を含む新規 PHA の創製に成功した。また、本研究において、様々な HA を効率的に基質として PHA 合成酵素に供給できる改良 TPRS を開発し、この系を応用することによって、様々な PHA、およびこれまで報告されていない新規の PHA の創製に成功した。これらの結果は、in vitro 合成系が、新規 PHA を創製する際のスクリーニング系として有用であることを示しており、今後、様々な構造を有する HA、および PHA 合成酵素を本研究で開発した改良 TPRS に導入することにより、効率的な新規 PHA の創製が可能になると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	田 島 健 次
副 査	教 授	棟 方 正 信
副 査	教 授	高 木 睦
副 査	教 授	田 口 精 一

学 位 論 文 題 名

In vitro ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 合成系の 改良と新規 PHA の創製

近年、温室効果ガスによる地球温暖化や廃棄プラスチックによる環境破壊、原油の枯渇などが大きな社会問題となっており、石油に依存しない環境循環型社会構築のための基盤技術の開発が急務となっている。このような背景から、土壌や水中の微生物により分解、自然界の物質循環系に組み込まれ、環境に調和する環境循環型プラスチック材料の開発が注目されている。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、微生物によって再生可能な資源から作られるバイオポリマーであり、生分解性、生体適合性など優れた性質を有していることから、環境循環型社会にマッチする材料として学術研究だけでなく産業応用に関しても様々な研究が行われている。これまでに、様々な構造・物性の PHA が作り出されてきているが、更なる機能性を付与するためには、新しい構造を有するモノマーユニットを導入する必要がある。

PHA の合成方法として *in vivo* 合成法 (発酵法) と *in vitro* 合成法の二つがある。*In vivo* 合成法では、油脂や糖質などの再生可能資源を使用することができ、大量生産に適している。しかし、モノマーユニット組成のコントロールが比較的困難であり、基質供給に関与する酵素の基質特異性によって供給される基質構造が限定される。一方、*in vitro* 合成法では、モノマーユニット組成のコントロールが比較的容易であり、基質合成経路が微生物に依存せず、基質を自由に設計・合成し、PHA 合成酵素 (PhaC) と反応させることにより、様々な構造を有する PHA の合成が可能である。しかし、*in vitro* 合成法では PHA の収量が少なく、高価な試薬を使用する必要がある。これまでに、いくつかの *in vitro* PHA 合成系が報告されている。1998 年に CoA のリサイクル経路を導入した *in vitro* PHA 合成系 (一相反応系 (OPRS)) が報告された。この反応系では、CoA のリサイクルは可能であるが、アセチル CoA 合成酵素 (ACS)、プロピオニル CoA 転移酵素 (PCT)、PhaC の三つの酵素を使用し、さらに、反応の進行のために ATP の供給が必要である。一方、田島らによって報告された水-有機溶媒二相反応系 (TPRS) では、基質前駆体 (ヒドロキシ脂肪酸のチオフェニルエステル) を化学的に合成することにより、CoA をリサイクルしながら、ATP を使用せずに poly(3-hydroxybutyrate)(P(3HB)) を合成することに成功している。

このように、*in vitro* 合成系では、様々な PHA 合成酵素と最終的な生成物である PHA の機能性

を考慮した基質前駆体を導入することにより、これまでにない全く新しい PHA を創製することができる可能性がある。そこで、本論文では、これまで報告されている *in vitro* 合成系 (TPRS) を新規 PHA の創製に応用すると共に、合成系の改良を行い、さらにそれを用いた新規 PHA の創製も行った。本論文は 4 章から構成されており、それぞれの概要を以下に示した。

第一章では、生分解性プラスチック、PHA に関する背景を記述し本研究の目的を明らかにした。

第二章では、TPRS を応用した新規 PHA の創製について述べた。これまで、乳酸がモノマーユニットとして含まれた PHA を酵素によって合成した報告例はない。一方、化学的に PHA に乳酸ユニットを導入することによって、PHA の物性を改良できることが報告されている。しかし、化学的にコポリマーを合成するためには別々に調製した PHA とラクチドを反応させる必要があり、酵素によって乳酸と PHA を同時にコポリマー化することができれば、より効率的な合成が可能になる。酵素的にこのコポリマーを合成するためには、まず乳酸を重合可能な酵素を見つける必要がある。合成酵素と基質のみを含む TPRS をスクリーニング系に用いることにより、PHA 合成酵素の中から乳酸重合酵素を見いだすことに成功した。この酵素は、田口らによって創製された進化型酵素であり、NMR、GPC 解析の結果から立体選択的に、3HBCoA の存在下において (R)-LA を重合し、poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate))(P(LA-co-3HB)) を合成することが確認された。

第三章では、OPRS と TPRS の利点を生かした、改良 TPRS の開発とその応用について述べた。ここでは、これまでに報告されている *in vitro* 合成系 (OPRS、TPRS) の問題点を解決するために、効率的な新規 *in vitro* 合成系の改良 (改良 TPRS の開発) を行った。この系では、AcCoA の前駆体としてエチルチオグリコレート (ETG) のアセチルチオエステル (AcETG) を用い、有機溶媒相と水相の界面におけるエステル交換反応によって、AcCoA を生成させた。水相に存在する PCT の働きによって遊離のヒドロキシ脂肪酸 (HA) を PHA 合成酵素の基質となる HAcCoA に変換した。最終的に PHA 合成酵素によって重合し、PHA を合成した。TPRS に使用されていたチオフェノール (TP) は PhaC の阻害剤であり、ETG を使用することにより、反応速度と収量が向上した。さらに、反応に使用する酵素の数を少なくするために、PCT-PhaC 融合酵素を調製し、これを改良 TPRS に導入した。この系を用い 3HB、3-hydroxypropionate(3HP)、3-mercaptopropionate(3MP) を基質前駆体として、P(3HB)、P(3HB-co-3HP)、P(3HP)、P(3HB-co-3MP) を様々なモノマー組成比で合成することに成功した。

改良 TPRS では、HA を誘導体化する必要がなく、直接使用することが可能である。そこで様々な構造を有する HA を基質前駆体として改良 TPRS に導入することにより、新しい PHA の創製を試みた。その結果、*Ralstonia eutropha* 由来の PhaCRe を用いることにより、これまで報告されていない 2-hydroxybutyrate(2HB) と 3HB から成る P(3HB-co-2HB) の創製に成功した。また、PhaC は R 体の基質しか重合せず、効率的に PHA を合成するために、反応に用いる HA には高い光学純度が要求される。一般的に光学純度が高い試薬は価格も高く、しかも入手が困難である。そこで、基質前駆体として不飽和脂肪酸を導入し、さらに (R)-特異的エノイル CoA ヒドラーゼ (PhaJ) を共存させることによって PHA の合成を行った。その結果、改良 TPRS において、不飽和脂肪酸から P(3HB)、P(3HB-co-3HV) の合成が確認された。また、クロトン酸を基質前駆体とした場合の P(3HB) の収量は、3HB を基質前駆体とした場合より多かった。これらの結果から、改良 TPRS において、より安価な不飽和脂肪酸から効率的に PHA 合成が可能であることが示された。

これを要するに、著者は TPRS、および改良 TPRS を用いることによる新規 PHA 創製のための基盤技術の開発に成功し、高分子材料工学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あるものと認める。