

学位論文題名

Microbial production of lactate-based polyesters

(乳酸ベースポリマーの微生物発酵生産)

学位論文内容の要旨

再生可能なバイオマスから合成されるバイオプラスチックは、自然界の炭素循環サイクルに組み込まれ、二酸化炭素の発生を抑えることができる新素材として注目されている。ポリ乳酸 (PLA) は、現在、最も産業化の進んでいるバイオプラスチックである。乳酸ユニットの導入された乳酸ベースポリマーは、バイオマス由来の糖から微生物発酵により得られた乳酸を、スズなどの重金属触媒を用いて多段階で重合することにより化学合成される。しかしながら、重金属触媒は、その有毒性から環境に負荷をかけるという問題が生じる。そこで、本研究では、生体触媒である酵素を用いてモノマー供給から重合までの全反応を微生物細胞内で行い、環境低負荷な PLA および乳酸ベースポリマーの“オール” バイオプロセス合成を確立することを目指した。本論文は、5 章から構成されている。

第1章は、序論であり、本研究の背景および目的について述べた。

第2章では、乳酸ベースポリマー生合成システムの構築について述べた。微生物細胞内で乳酸ポリマーを合成するためには、モノマー供給酵素およびモノマー重合酵素遺伝子を導入する必要がある。そこで、まずモノマーである lactyl-CoA (LA-CoA) の供給酵素であるプロピオニル CoA 転移酵素 (PCT) 遺伝子を大腸菌に導入し、CE/MS 分析によって、LA-CoA の生産を確認した。続いて、LA-CoA を重合可能な乳酸重合酵素を *in vitro* ポリマー合成系によって探索した。これまでに、乳酸重合酵素の存在は報告されていなかったが、乳酸と類似の化学構造ユニットを有する polyhydroxyalkanoate (PHA) を合成する PHA 重合酵素については、詳細な研究がなされている。そこで、本研究では PHA 重合酵素に着目し、多種の PHA 重合酵素について LA-CoA 重合能力を評価した。結果、*in vitro* ポリマー合成系において、LA-CoA と 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA: 基本的な PHA のモノマー) が共存する場合にのみ、LA-CoA 重合能を示す PHA 重合酵素変異体 [*Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PhaC1(S325T/Q481K) 変異体] を見出した。本発見は、デザインしたポリマー合成システムを作動させるためのブレイクスルーであった。モノマー供給遺伝子および乳酸重合酵素遺伝子を大腸菌に導入した結果、LA-CoA 供給遺伝子のみを導入した場合は、*in vitro*

ポリマー合成系の場合と同様に、PLA は検出されなかったが、LA-CoA および 3HB-CoA 供給遺伝子を導入した場合には、乳酸ユニットが 6 mol% 導入された Poly(lactate-co-3-hydroxyalkanoate) [P(LA-co-3HB)] を微生物生産することができた。

第 3 章では、乳酸ベースポリマー生合成システム中の LA モノマー (LA-CoA) 供給量の増強に取り組んだ。方法としては、P(LA-co-3HB) 中の LA 分率を向上させるために、*in vivo* における LA モノマー供給の増強を検討した。第 2 章で述べた *in vitro* ポリマー合成系では、LA-CoA と 3HB-CoA を等量加えた際、P(36 mol% LA-co-3HB) が合成された。一方で、微生物合成したポリマーは、わずか P(6 mol% LA-co-3HB) であった。これらの結果は、構築した微生物生産システム内において、LA-CoA モノマー量が不足しているということを示唆している。一般的に、嫌気条件下では、乳酸を合成する乳酸脱水素酵素が活性化し、乳酸生産量が向上することが知られている。そこで、菌体内の乳酸量を増加させることによって、LA-CoA モノマー供給量が増加することを期待した。嫌気培養を行ったところ、コポリマー中の LA 分率が、47 mol% へと飛躍的に向上した。また、合成されたポリマーの光学異性組成を HPLC によって分析した。結果、本ポリマーは、非常に高い光学純度を持った P[(R)-LA-co-(R)-3HB] であるということがわかった。また、構造的性質であるモノマー配列を NMR によって詳細に分析し、本ポリマーは、ランダム配列をもつコポリマーであるということを明らかにした。熱的性質については、ガラス転移温度の上昇および融点の低下という乳酸ユニットが導入された特徴が見られた。

第 4 章では、新規乳酸重合酵素の創製に取り組んだ。本システムにおいて、高 LA 分率の乳酸ベースポリマーを効率的に生産するためには、第 3 章で行った LA モノマー供給の増強という方法以外に、ポリマーを直接重合している重合酵素の LA 重合能力を向上させるという方法が考えられる。そこで、本章では、新規の変異を乳酸重合酵素に導入することで、重合酵素の LA-CoA に対する基質特異性を増強することを目指した。これまでに唯一見つかった乳酸重合酵素は、野生型 PHA 重合酵素の 3HB-CoA 重合能を向上させる変異を 2 つ導入した 2 重変異体であった。本知見から、PHA 重合酵素における 3HB-CoA 重合能力をさらに向上させれば、LA-CoA 重合能力の増強につながるのではないかと考えた。そこで、3HB-CoA 重合能を向上させると報告されていた新規の変異を乳酸重合酵素に導入し、好気培養条件下で、従来の乳酸重合酵素よりも、LA 分率およびポリマー蓄積率が向上した新規乳酸重合酵素を創製した。さらに、本研究で見出した新規変異点におけるアミノ酸飽和変異導入を行うことで、16~45 mol% と幅広い範囲で LA 分率が調節された P(LA-co-3HB) を、再現性よく、高蓄積に微生物合成することができた。

第 5 章は、総括であり、乳酸ベースポリマーの微生物生産および合成された乳酸ベースポリマーについてまとめた。さらに、今後の展望についても言及した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田口	精一
副査	教授	高木	睦
副査	教授	中野	環
副査	准教授	大井	俊彦

学位論文題名

Microbial production of lactate-based polyesters

(乳酸ベースポリマーの微生物発酵生産)

再生可能なバイオマスから合成されるバイオプラスチックは、自然界の炭素循環サイクルに組み込まれ、二酸化炭素の発生を抑えることができる新素材として注目されている。ポリ乳酸 (PLA) は、現在、最も産業化の進んでいるバイオプラスチックである。乳酸ユニットの導入された乳酸ベースポリマーは、バイオマス由来の糖から微生物発酵により得られた乳酸を、スズなどの重金属触媒を用いて多段階で重合することにより化学合成される。しかしながら、重金属触媒は、その毒性から環境に負荷をかけるという問題が生じる。そこで、著者は、生体触媒である酵素を用いてモノマー供給から重合までの全反応を微生物細胞内で行い、環境低負荷な PLA および乳酸ベースポリマーの“オール”バイオプロセス合成システムを確立した。さらに、著者は、本システムを改良することにより、合成した乳酸ベースポリマーの組成を制御した。

本論文の概要、および評価できる成果などについては以下に要約される。

著者は、乳酸ベースポリマーである poly(lactate-co-3-hydroxyalkanoate) [P(LA-co-3HB)] の生合成システムを組み換え大腸菌に構築した。微生物細胞内で乳酸ポリマーを合成するためには、モノマー供給酵素およびモノマー重合酵素遺伝子を導入する必要がある。これまでに、乳酸ポリマー重合酵素の存在は報告されていなかった。そこで著者は、PLA と、微生物が合成するプラスチックである Polyhydroxyalkanoate (PHA) 間の化学構造類似性をヒントに、PHA 重合酵素に着目し、3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA: 基本的な PHA のモノマー) が共存する場合に、乳酸モノマーである lactyl (LA)-CoA 重合能を示す PHA 重合酵素変異体を見出した。本発見は、デザインしたポリマー合成システムを作動させるためのブレイクスルーであった。さらに、LA-CoA 供給酵素遺伝子を大腸菌に導入し、乳酸モノマーの供給経路を構築した。モノマー供給遺伝子および乳酸重合酵素遺伝子を大腸菌に導入した結果、乳酸ユニットが 6 mol% 導入された P(LA-co-3HB) を微生物生産することに成功した。

著者はまた、P(LA-co-3HB) 中の LA 分率を向上させるために、乳酸ベースポリマー生合成シス

テム中の乳酸モノマー供給量の増強に取り組んだ。菌体内の乳酸量を増加させることによって、乳酸モノマー供給量が増加することを期待して、嫌気培養を行ったところ、コポリマー中の LA 分率が、47 mol% へと飛躍的に向上した。また、合成されたポリマーの光学異性組成を分析した結果、本ポリマーは、非常に高い光学純度を持った P[(R)-LA-co-(R)-3HB] であるということがわかった。さらに、構造的性質であるモノマー配列を NMR によって詳細に分析し、本ポリマーは、ランダム配列をもつコポリマーであるということを明らかにした。

さらに、著者は LA 分率を向上させるために、ポリマーを直接重合している重合酵素の LA 重合能力を向上させるという方法にも取り組んだ。唯一見つかった乳酸重合酵素は、野生型 PHA 重合酵素の 3HB 重合能が向上する変異体であった。本知見から、PHA 重合酵素における 3HB 重合能力をさらに向上させれば、LA 重合能力の増強につながるのではないかと考え、3HB 重合能を向上させると報告されていた新規の変異を乳酸重合酵素に導入し、従来の乳酸重合酵素よりも、LA 分率およびポリマー蓄積率が向上した新規乳酸重合酵素を創製した。さらに、本研究で見出した新規変異点におけるアミノ酸飽和変異導入を行うことで、16~45 mol% と幅広い範囲で LA 分率が制御された P(LA-co-3HB) を、再現性よく、高蓄積に微生物合成することができた。得られた多様な組成の P(LA-co-3HB) の熱的性質を分析することによって、LA 分率の向上とともに、ポリマーの結晶性が低下しているであろうという知見を得ることができた。

これを要するに、著者は、乳酸ベースポリマーである P(LA-co-3HB) の微生物合成システムを新規に構築し、さらに本システム中の LA 分率制御に影響するファクターを調節することにより、組成が精密制御された P(LA-co-3HB) を合成することができた。本ポリマーは、高光学純度かつランダム性の高い、化学合成では合成不可能なポリマーであった。本研究は、今後、乳酸ユニットと微生物合成可能な他のユニットとの新規共重合ポリマー合成につながるものであり、関連分野の今後の発展に貢献するところに大なるものがある。

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あるものと認める。