

学位論文題名

Metabolic and enzymatic engineering for biosynthesis
of various lactate-based polyesters

(多様な乳酸ポリマーの微生物生産に向けた代謝および酵素の改変)

学位論文内容の要旨

ポリ乳酸 (PLA) など、乳酸ユニットを含む乳酸ベースポリエステルは、高い透明性を持ち、現在、最も実用化が進んでいるバイオプラスチックである。現在、乳酸ベースポリエステルは、糖から発酵法により生産した乳酸を、金属触媒を用いて化学的に重合することによって合成されている。一方、我々のグループは、微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の生合成系の鍵酵素である PHA 重合酵素の研究の過程で、D 体の乳酸-CoA (LA-CoA) を基質として認識する非常に特殊な PHA 重合酵素変異体 (乳酸重合酵素) を見出した。本酵素を遺伝子導入した大腸菌を用い、乳酸と PHA モノマーの 1 種である 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) との共重合体、P(LA-co-3HB) の一段階発酵生産を実現した。この共重合乳酸ポリエステルは、有害な金属触媒を用いずに合成可能であることに加え、PLA の欠点とされる柔軟性の欠如を克服する材料であることが特徴であった。そこで、本研究では、微生物産生の PHA において、炭素数 5 以上の第 2 モノマーユニットが導入された共重合体は、結晶性が低く、第 2 モノマーの導入量に応じてより柔軟な材料となることに着目し、炭素数 5 以上の PHA モノマーユニットを P(LA-co-3HB) に導入し、多様な物性を示す乳酸ベースポリエステルを効率よく生産することを試みた。

本論文は、7 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、3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) ユニットを含む新規乳酸ベースポリエステル、P(LA-co-3HB-co-3HV) (PLBV) 生産系の構築と物性解析について述べた。本ポリマーを効率よく生産するために、乳酸を過剰生産する大腸菌変異株を宿主として用いた。この株に LA-CoA を供給するためにプロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子を、また 3HB-CoA および 3HV-CoA を供給するために、アセトアセチル CoA トランスフェラーゼ遺伝子および β -ケトチオラーゼ遺伝子を導入し、これらのモノマー供給酵素遺伝子群に加え、乳酸重合酵素遺伝子を導入した。この組換え株を用い、炭素源として、グルコースをベースに 3HV モノマー前駆体であるプロピオン酸を添加して培養を行ったところ、菌体内に PLBV が合成された。また、プロピオン酸添加濃度を変えることにより、3HV 分率を 0 から 32 mol% の範囲で再現よく制御できることを明らかとした。得られたポリマーをフィルム化して引張り試験に供した結果、これらの共重合体が伸長性と柔軟性を有している事が分かった。

第 3 章では、化学合成 PLA に非常に近い組成を持つ生合成乳酸ポリマーの合成と解析を行った。第 2 章で構築した PLBV 生産系において、3HV 分率をより広範囲に制御するため、モノマー

前駆体として吉草酸を添加する培養実験を行ったところ、予想外に、乳酸分率の極めて高い (96 mol%) PLBV(LA96) を再現性よく生産できる条件を見いだした。本ポリマーは化学合成 PLA と非常に近い化学構造を有していたため、生合成 LA96 と化学合成 PLA について熱的性質の比較解析を行った。その結果、LA96 は、化学合成によって得た同一分子量の PDLA とほぼ同じ融点 (153.3 °C) およびガラス転移温度 (49.3 °C) を示した。また、この LA96 を PLLA と熔融混合して得られたポリマーの融点は、201.9 °C まで上昇し、ステレオコンプレックス結晶が生成していることが強く示唆された。これらの結果から、LA96 が化学合成によって得られた PDLA と同等な性能を持つことが分かった。

第 4 章では、側鎖長の長い PHA モノマーユニットを乳酸ポリエステルに導入するための生合成系の構築に取り組んだ。第 3 章で用いた組換え大腸菌に、様々な炭素数の飽和脂肪酸を、グルコースとともに炭素源として添加し、培養を行った。その結果、酪酸 (炭素数 4) を添加した場合、ポリマー中に 3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HHx; 炭素数 6) ユニットが最大で 38 mol% 導入された、P(LA-co-3HB-co-3HHx) が生合成されることを明らかとした。また、前駆体よりもポリマー中のモノマーユニットの炭素数が増えた原因としては、 β 酸化の逆反応が進行することで、ブタン酸にアセチル CoA 由来の 2 つの炭素が付加したためと考えられた。第 2 章、第 3 章および本章において、有機酸をモノマー前駆体として用い、炭素数や共重合組成比が異なる様々な三元乳酸ベースポリエステル生合成経路を確立することができた。

第 5 章では、多様な基質特異性を示す新規重合酵素の創製に取り組んだ。乳酸ベースポリエステルや PHA を効率的に発酵生産するためには、前章までに行ったモノマー供給系の改変と合わせて、重合酵素の基質特異性の改変も重要な鍵となる。そこで、本章では、重合酵素遺伝子への変異導入により、多様な基質特異性を示す新規変異体の創製に取り組んだ。重合酵素の活性および基質特異性に関与すると考えられる 4 つの重要残基に変異を導入したライブラリーを作成し、最も単純な生合成経路で合成できる P(3HB) の蓄積率を指標として、高活性変異体候補をスクリーニングすることで、3HB モノマーに対する重合活性が異なる変異体を多数取得した。これらの変異酵素は同一菌種、同一炭素源、同一の培養条件において、多様なモノマー組成を持つポリマーを合成した。この結果から、重合酵素の機能マッピングに基づく機能改変により、組成を細かく制御することを可能にした。

第 6 章では、重合酵素の機能改変に対してアミノ酸置換が及ぼす効果をより詳細に評価するために、重合酵素の高活性変異体の速度論的解析を行った。重合酵素の変異体を大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。このタンパク質を用いて、化学的に合成した炭素数の異なる 2 種類の基質に対する重合速度を測定した。この結果、変異により基質との親和性や反応速度が変化している事が明らかになった。

第 7 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の構造および物性についてまとめた。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 大 利 徹

副 査 准教授 大 井 俊 彦

学 位 論 文 題 名

Metabolic and enzymatic engineering for biosynthesis of various lactate-based polyesters

(多様な乳酸ポリマーの微生物生産に向けた代謝および酵素の改変)

ポリ乳酸 (PLA) など、乳酸ユニットを含む乳酸ベースポリエステルは、高い透明性を持ち、現在、最も実用化が進んでいるバイオプラスチックである。現在、乳酸ベースポリエステルは、糖から発酵法により生産した乳酸を、金属触媒を用いて化学的に重合することによって合成されている。一方、我々のグループは、微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の生合成系の鍵酵素である PHA 重合酵素の研究の過程で、D 体の乳酸-CoA (LA-CoA) を基質として認識する非常に特殊な PHA 重合酵素変異体 (乳酸重合酵素) を見出した。本酵素を遺伝子導入した大腸菌を用い、乳酸と PHA モノマーの 1 種である 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) との共重合体、P(LA-co-3HB) の一段階発酵生産を実現した。この共重合乳酸ポリエステルは、有害な金属触媒を用いずに合成可能であることに加え、PLA の欠点とされる柔軟性の欠如を克服する材料であることが特徴であった。そこで、本研究では、微生物産生の PHA において、炭素数 5 以上の第 2 モノマーユニットが導入された共重合体は、結晶性が低く、第 2 モノマーの導入量に応じてより柔軟な材料となることに着目し、炭素数 5 以上の PHA モノマーユニットを P(LA-co-3HB) に導入し、多様な物性を示す乳酸ベースポリエステルを効率よく生産することを試みた。

本論文は、7 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、3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) ユニットを含む新規乳酸ベースポリエステル、P(LA-co-3HB-co-3HV) (PLBV) 生産系の構築と物性解析について述べた。本ポリマーを効率よく生産するために、乳酸を過剰生産する大腸菌変異株を宿主として用いた。この株に LA-CoA を供給するためにプロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子を、また 3HB-CoA および 3HV-CoA を供給するために、アセトアセチル CoA トランスフェラーゼ遺伝子および β -ケトチオラーゼ遺伝子を導入し、これらのモノマー供給酵素遺伝子群と乳酸重合酵素遺伝子を導入した。この組換え株を用い、炭素源として、グルコースをベースに 3HV モノマー前駆体であるプロピオン酸を添加して培養を行ったところ、菌体内に PLBV が合成された。また、添加濃度により、3HV 分率を 0 から 32

mol% の範囲で再現よく制御できることを明らかとした。得られたポリマーをフィルム化して引張り試験に供した結果、これらの共重合体が伸長性と柔軟性を有している事が分かった。

第3章では、化学合成 PLA に非常に近い組成を持つ生合成乳酸ポリマーの合成と解析を行った。3HV 分率をより広範囲に制御するため、モノマー前駆体として吉草酸を添加する培養実験を行ったところ、予想外に、乳酸分率の極めて高い (96mol%) PLBV(LA96) を再現性よく生産できる条件を見いだした。本ポリマーは化学合成 PLA と非常に近い化学構造を有していたため、生合成 LA96 と化学合成 PLA について熱的性質の比較解析を行った。その結果、LA96 は、化学合成によって得た同一分子量の PDLA とほぼ同じ融点 (153.3 °C) およびガラス転移温度 (49.3 °C) を示した。また、この LA96 を PLLA と熔融混合して得られたポリマーの融点は、201.9 °C まで上昇し、ステレオコンプレックス結晶の生成が強く示唆された。これらの結果から、LA96 が化学合成によって得られた PDLA と同等な性能を持つことが分かった。

第4章では、側鎖長の長い PHA モノマーユニットを乳酸ポリエステルに導入するための生合成系の構築に取り組んだ。第3章で用いた組換え大腸菌に、様々な炭素数の飽和脂肪酸を、グルコースとともに炭素源として添加し、培養を行った。その結果、酪酸 (炭素数 4) を添加した場合、ポリマー中に 3-ヒドロキシヘキサノ酸 (3HHx:炭素数 6) ユニットが最大で 38 mol% 導入された、P(LA-co-3HB-co-3HHx) が生合成されることを明らかとした。また、前駆体よりもモノマーユニットの炭素数が増えた原因としては、 β 酸化の逆反応が進行することで、ブタン酸にアセチル CoA 由来の2つの炭素が付加したためと考えられた。第2章、第3章および本章において、有機酸をモノマー前駆体として用い、炭素数や共重合組成比が異なる様々な三元乳酸ベースポリエステル生合成経路を確立することができた。ポリエステルを効率的に発酵生産するためには、前章までに行ったモノマー供給系の改変と合わせて、重合酵素の基質特異性の改変も重要な鍵となる。そこで、本章では、重合酵素遺伝子への変異導入により、多様な基質特異性を示す新規変異体の創製に取り組んだ。重合酵素の活性および基質特異性に関与すると考えられる4つの重要残基に変異を導入したライブリーを作成し、最も単純な生合成経路で合成できる P(3HB) の蓄積率を指標として、高活性変異体候補をスクリーニングすることで、3HB モノマーに対する重合活性が異なる変異体を多数取得した。これらの変異酵素は同一菌種、同一炭素源、同一の培養条件において、多様なモノマー組成を持つポリマーを合成した。この結果から、重合酵素の機能マッピングに基づく機能改変により、組成の細かい制御が可能となった。

第6章では、重合酵素の機能改変に対してアミノ酸置換が及ぼす効果をより詳細に評価するために、重合酵素の高活性変異体の速度論的解析を行った。重合酵素の変異体を大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。このタンパク質を用いて、化学的に合成した炭素数の異なる2種類の基質に対する重合速度を測定した。この結果、変異により基質との親和性や反応速度が変化している事が明らかになった。

第7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の構造および物性についてまとめた。さらに、今後の展望についても言及した。

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ベースに、LA 分率制御に影響するファクターを代謝工学的に調節することにより、多様な P(LA-co-3HB-co-3HA) を合成することに成功した。また、ポリマーサンプルの熱的・機械的物性を解析し、新規共重合ポリマーの特性を明らかにした。本研究は、今後多様な乳酸ベース新規共重合ポリマー合成につながり、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。