博士（工 学） 佐 藤 康 治

学 位 論 文 題 名

酸素を用いたPHA合成に関する研究

学位論文内容の要旨

現在、経済社会の発展が地球環境問題を深刻化させつつある。これらの問題を解決するため、環境への負荷が少ない「循環型社会」を形成すること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され、自然界の物質循環系に組み込まれ、環境に調和する新しい高分子材料「生分解性プラスチック」の開発が注目されている。

多くの微生物は、ある種の栄養源（窒素やリンなど）が欠乏した条件下においてhydroxyalkanoate (HA)をモノマーユニットとする高分子量ポリマー、polyhydroxyalkanoate (PHA)を菌体内に蓄積することが知られている。これは合成プラスチックと同様に熱可塑性を示すとともに自然環境中で分解される性質を有することから、生分解性材料としての応用が期待され様々な研究が行われるようになった。

本論文では、酵素を用いた PHA 合成に関する研究を行った。本論文は 6 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 1 章では、生分解性プラスチックおよび PHA についての背景を記述し、本研究における目的を明らかにした。

第 2 章では、従来の PHA synthase よりも利用価値の高い PHA synthase を得るという目的から PHA 合成細菌の単離を試みた。特殊な環境下には有益な能力を有する細菌が存在していると考えられたため、ガス田採掘土壌をターゲットとした。その結果、PHA 合成能を有する 5 種類の菌株が得られた。そのうちでもっとも合成能の高かった INT005 株についてさらに解析した。INT005 株を同定するため種々の試験を行ったところ、*B. cereus* によく似た性状を示すがいつかの相違点も確認された。したがって、本論文では *Bacillus* sp. INT005 とした。本菌株は様々な炭素源より短鎖長の HA を構成ユニットとする PHA を合成したことから、その PHA synthase は class I または III に分類されると示唆された。また代表的な PHA 合成細菌 (*Ralstonia eutropha*) よりも高い培養温度においてPHAを合成可能であった。

第 3 章では、*Bacillus* sp. INT005 の PHA 生合成遺伝子群のクローニングとその解析について述べた。第 2 章の結果より本菌株の PHA synthase は class I または III に分類されると推測された。クローニングされた PHA 生合成遺伝子群には 2 つのサブユニット PhaC と PhaE から構成される class III PHA synthase の *phaC* に相同性を示す open reading frame (ORF)が発見された。しかしながら、もう一方のサブユニットである *phaE* に相同性を示す ORF は見つからなかった。さらなる解析の結果、PhaE の半分の分子量しかない $PhaR_{Bsp}$ が本菌株の PHA synthase のサ

ブユニットであることが明らかになった。本 PHA synthase の kinetics は lag phase を示し、class III PHA synthase の kinetics とは異なることが判明した。このような結果より、*Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase は新規の PHA synthase であると考えられた。

第 4 章では、*Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase とほかの 2 つのサブユニットからなる PHA synthase との比較を行った。まずは、同じ *Bacillus* 属の *B. megaterium* と比較した。*B. megaterium* 由来 PHA synthase も $PhaR_{Bm}$ と $PhaC_{Bm}$ から構成されていることを確かめた。この結果および各サブユニット($PhaR_{Bm}$ と $PhaR_{Bsp}$、$PhaC_{Bm}$ と $PhaC_{Bsp}$)の高い相同性より、それらのサブユニットは交換しても PHA synthase 活性を発現できると考えられた。解析の結果、それらは交換しても PHA synthase 活性を発現できることが認められたため、$PhaR_{Bm}$ と $PhaR_{Bsp}$ および $PhaC_{Bm}$ と $PhaC_{Bsp}$ は同様の機能を有していると示唆された。次に class III PHA synthase に分類される *Synechosystis* sp. PCC6803 由来 PHA synthase サブユニット ($PhaC_{Syn}$、$PhaE_{Syn}$)と *Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase サブユニットを交換して PHA synthase 活性の発現について検討した。しかしながら、PHA synthase 活性は検出されなかったため、$PhaE_{Syn}$ と $PhaR_{Bsp}$ は異なる機能を有していると考えられた。このように、*Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase は class III PHA synthase とは異なる新規の PHA synthase であることが強く示唆されたため、新規の class IV に分類されるべきであると考えられた。

第 5 章では、*R. eutropha* の P(3HB)生合成機構を参考にして acetate を原料とした P(3HB)酵素合成系の構築を試みた。acetyl-CoA synthetase (Acs)、glucose dehydrogenase (GDH)、β-ketothiolase (PhaA) および NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (PhaB)を用いてモノマー合成を行ったところ、CoA をリサイクル、NADPH を再生しながらモノマー合成可能であることが明らかとなった。そこで、その反応系に PhaC を添加してポリマー合成を試みた。その結果、反応液が白濁することが確認された。生じた沈殿物を集めクロロホルム抽出し、それにメタノールを添加したところ白い沈殿物が得られた。これを d-クロロホルムに溶解して ^{1}H NMR 解析したところ、P(3HB)であると判明した。合成された P(3HB)の Mw および Mn は 3×10^6 g/mol 以上であり、分散度は 1.5 以下であった。合成された P(3HB)量をもとに CoA のリサイクル回数および NADPH 再生回数を計算したところ、それぞれ少なくとも 26 回反応していることが確認された。

第 6 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。

本研究において新規の PHA 合成酵素遺伝子群を発見し、機能の解析を行った。さらに、酵素を用いた補酵素のリサイクルおよび再生を有した PHA 合成系の構築に成功した。本反応系では用いる酵素や原料を改良することで様々なモノマーを合成可能であると考えられる。さらに微生物体内では合成できないようなモノマーの合成も可能となり、新規の特性を有する PHA の合成が期待される。今回クローニングに成功した *Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase は広い特異性を有することから、この酵素合成系へ応用することで新規のモノマーから構成される新規 PHA が合成可能となると期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　棟　方　正　信

副　査　　教　授　　高　井　光　男

副　査　　教　授　　木　下　晋　一

副　査　　教　授　　上　舘　民　夫

副　査　　助教授　　田　島　健　次

学位論文題名

酸素を用いたPHA合成に関する研究

近年、経済社会の発展が地球環境問題を深刻化させつつある。これらの問題を解決するため、環境への負荷が少ない「循環型社会」を形成すること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され、自然界の物質循環系に組み込まれ、環境に調和する新しい高分子材料「生分解性プラスチック」の開発が注目されている。

多くの微生物は、ある種の栄養源（窒素やリンなど）が欠乏した条件下においてhydroxyalkanoate (HA)をモノマーユニットとする高分子量ポリマー、polyhydroxyalkanoate (PHA)を菌体内に蓄積することが知られている。これは合成プラスチックと同様に熱可塑性を示すとともに自然環境中で分解される性質を有することから、生分解性材料としての応用が期待され様々な研究が行われるようになった。

本論文では、酵素を用いたPHA合成に関する研究を行った。本論文は6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1章では、生分解性プラスチックおよびPHAについての背景を記述し、本研究における目的を明らかにした。

第2章では、従来のPHA synthaseよりも利用価値の高いPHA synthaseを得るという目的からPHA合成細菌の単離を試みた。特殊な環境下には有益な能力を有する細菌が存在していると考えられたため、ガス田採掘土壌をターゲットとした。その結果、PHA合成能を有する5種類の菌株が得られた。そのうちでもっとも合成能の高かったINT005株についてさらに解析した。INT005株を同定するため種々の試験を行ったところ、*B. cereus*によく似た性状を示すがいつかの相違点も確認された。したがって、本論文では*Bacillus* sp. INT005とした。本菌株は様々な炭素源より短鎖長のHAを構成ユニットとするPHAを合成したことから、そのPHA synthaseはクラスIまたはIIIに分類されると示唆された。また代表的なPHA合成細菌（*Ralstonia eutropha*）よりも高い培養温度においてPHAを合成可能であった。

第3章では、*Bacillus* sp. INT005のPHA生合成遺伝子群のクローニングとその解析について述べた。第2章の結果より本菌株のPHA synthaseはクラスIまたはIIIに分類されると推測された。クローニングされたPHA生合成遺伝子群には2つのサブユニットPhaCとPhaEから構成されるクラスIII PHA synthaseの*phaC*に相同性を示すopen reading frame (ORF)が発見された。しかしながら、もう一方のサブユニットである*phaE*に相同性を示すORFは見つからなかった。さらなる解析の結果、PhaEの半分の分子量しかない$PhaR_{Bsp}$が本菌株のPHA synthaseのサブユニットであることが明らかになった。本PHA synthaseのkineticsはlag phaseを示

し、クラス III PHA synthase の kinetics とは異なることが判明した。このような結果より、*Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase は新規の PHA synthase であると考えられた。

第４章では、*Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase とほかの 2 つのサブユニットからなる PHA synthase との比較を行った。まずは、同じ *Bacillus* 属の *B. megaterium* と比較した。*B. megaterium* 由来 PHA synthase も $PhaR_{Bm}$ と $PhaC_{Bm}$ から構成されていることを確かめた。この結果および各サブユニット($PhaR_{Bm}$ と $PhaR_{Bsp}$、$PhaC_{Bm}$ と $PhaC_{Bsp}$)の高い相同性より、それらのサブユニットは交換しても PHA synthase 活性を発現できると考えられた。解析の結果、それらは交換しても PHA synthase 活性を発現できることが認められたため、$PhaR_{Bm}$ と $PhaR_{Bsp}$ および $PhaC_{Bm}$ と $PhaC_{Bsp}$ は同様の機能を有していると示唆された。次にクラス III PHA synthase に分類される *Synechosystis* sp. PCC6803 由来 PHA synthase サブユニット ($PhaC_{Syn}$、$PhaE_{Syn}$) と *Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase サブユニットを交換して PHA synthase 活性の発現について検討した。しかしながら、PHA synthase 活性は検出されなかったため、$PhaE_{Syn}$ と $PhaR_{Bsp}$ は異なる機能を有していると考えられた。このように、*Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase はクラス III PHA synthase とは異なる新規の PHA synthase であることが強く示唆されたため、新規のクラス IV に分類されるべきであると考えられた。

第 5 章では、*R. eutropha* の P(3HB)生合成機構を参考にして acetate を原料とした P(3HB)酵素合成系の構築を試みた。acetyl-CoA synthetase (Acs)、glucose dehydrogenase (GDH)、β-ketothiolase (PhaA)および NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (PhaB)を用いてモノマー合成を行ったところ、CoA をリサイクル、NADPH を再生しながらモノマー合成可能であることが明らかとなった。反応系に PhaC を添加してポリマー合成を試み、反応液が白濁することを確認した。生じた沈殿物を集めクロロホルム抽出し、メタノールを添加したところ白い沈殿物が得られた。d-クロロホルムに溶解して ^{1}H NMR 解析したところ、P(3HB)であると判明した。合成された P(3HB)の Mw および Mn は 3×10^6 g/mol 以上であり、分散度は 1.5 以下であった。合成された P(3HB)量をもとに CoA のリサイクル回数および NADPH 再生回数を計算したところ、それぞれ少なくとも 26 回反応していることが確認された。

第 6 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。

本研究において新規の PHA 合成酵素遺伝子群を発見し、機能の解析を行った。さらに、PHA 合成酵素群を用い、補酵素のリサイクルおよび再生を有した PHA 合成系の構築に成功した。本反応系では用いる酵素や原料を改良することで様々なモノマーを合成可能であると考えられる。さらに微生物体内では合成できないようなモノマーの合成も可能となり、新規の特性を有する PHA の合成が期待できる。今回クローニングに成功した *Bacillus* sp. INT005 由来 PHA synthase は広い特異性を有することから、この酵素合成系へ応用することで新規のモノマーから構成される新規 PHA が合成可能となると期待できる。

これを要するに、著者は生分解性プラスチック PHA 合成に関する新規の酵素群の遺伝子クローニングに成功するとともに、それら酵素群と補酵素のリサイクル系を構築し、PHA 合成のバイオリアクター化の基礎的知見を得たものであり、生物化学工学、酵素工学に対して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。