

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 有川 尚志

論 文 題 目

*Cupriavidus necator*を用いた生分解性バイオマスプラスチックPHBHHxの工業生産プラットフォーム構築に関する研究

論文審査担当者

主査 小林 哲夫

中野 秀雄

吉村 徹

木村 眞

金丸 京子

論文審査の結果の要旨

プラスチックは我々の生活に欠かすことのできない高分子素材であり、日用品から、家電製品の躯体、車の内外装材など多様な用途を有している。一方、多くのプラスチックは化学的安定性に優れているがために、環境中では長期に渡って悪影響を及ぼす可能性がある。また、化石資源を原料するため、資源枯渇や二酸化炭素排出という地球規模の問題とも大きな関わりがある。環境負荷を低減し持続可能な社会を実現するためには、生分解性に優れ、かつバイオマス由来のプラスチックの普及が望まれる。

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)は微生物によりバイオマスから生産される天然高分子であり、環境中の微生物により完全分解される生分解性プラスチックでもある。最も代表的なポリヒドロキシ酪酸 (PHB)は、結晶性が高く、硬く脆い性質のため工業利用には適さないが、3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HHx)との共重合体である Poly(3HB-co-3HHx) (PHBHHx) は、共重合比率に応じて硬質から軟質まで様々な性質を示すため、多様な用途に適用可能なプラスチック材料と考えられている。しかし、PHBHHx を工業的に使いこなすためには、生産性に加えて、ポリマー分子量、3HB/3HHx 共重合比率、といった一次構造を制御可能な発酵生産系の構築が不可欠である。また、PHBHHx の市場と原料調達の観点からは地産地消が望ましく、そのためには工場立地場所周辺で豊富な原料の使用を可能にすることも必要となる。さらに、実際の工業的な生産では、生産管理に用いる簡易・迅速・安全な PHA 分析法や精製法などの技術開発も求められる。

本論文では、上記課題を解決するために、生産菌の有する PHBHHx 生産・分解系の改変による一次構造の制御技術、スクロースからの生産技術、簡便・迅速・安全な分析・精製技術の開発を行った。その概要を以下に述べる。

PHA の用途開発において、分子量はプラスチックとしての物性を左右する重要なファクターである。精製、加工プロセスでの分解を考慮すると、発酵工程ではできるだけ高分子量の PHA 生産が望ましい。*Cupriavidus necator* H16 株は乾燥菌体重量の 80% を超える PHA を蓄積するが、PHA はエネルギー貯蔵物質であるため本菌は分解系も有している。ゲノム解析から、本菌株は 9 種の PHB 分解酵素遺伝子を持つと推定されるが、これら遺伝子と PHA の分子量との関係は明らかにされていない。そこで、各 PHB 分解酵素遺伝子の破壊株を作製して培養経時での PHA の分子量を追跡し、*phaZ6* という分解酵素遺伝子の破壊により、パーム核油を原料とした場合の PHA の分子量を約 2 倍へと向上させることに成功した。その結果、重量平均分子量 300 万以上の超高分子量 PHBHHx が生産可能となった。また、炭素源枯渇時に細胞内 PHA の分解再利用のために働くと考えられる *phaZ1*、*phaZ2* を破壊することで、蓄積された高分子量 PHBHHx を細胞内に安定保持できる生産菌株も作出した。

PHBHHx の物性は 3HHx 比率により大きく変化するため、共重合比率を任意に調節可能であれば多様な用途開発が可能となる。そこで細胞内におけるモノマー供給経

路に着目し、3HHx 供給の鍵酵素である R 体特異的エノイル-CoA ヒドラーゼ (PhaJ) の発現の精密制御に関して検討した。プロモーターとリボソーム結合配列の様々な組み合わせで転写と翻訳の両面から発現量の調節を試みた結果、任意の発現レベルを実現できる発現カセット群の作製に成功した。また、このような PhaJ 発現制御が PHA 生産性には影響しないこと、このカセット群利用により同一培養条件下で様々な 3HHx 比率の PHBHHx を生産可能であることを示した。さらに、異なる 3HHx 比率を持った PHBHHx の造り分けは、プラスチックレベルのみならず工業的な生産と同様の高密度流加培養においても可能であることも実証した。このときの生産濃度は約 175 g/L と非常に高い値に達している。

PHBHHx の生産において、バイオマスの集積・輸送、製品輸送などに必要なエネルギーの削減は、生産コストの低減化のみならず、カーボンニュートラルで持続可能な社会構築にも貢献する。そのためには製品使用地域に生産プラントがあり、当該地域で多量入手可能で安価な原料を用いての生産が望ましい。本論文では、本来の原料である油脂に替わる原料として、スクロースを用いた生産技術の開発を行った。*C. necator* はスクロースを資化できないため、*Escherichia coli* W 株に由来する *cscA* (スクロースヒドラーゼ遺伝子) および *cscB* (スクロースパーミアゼ遺伝子) を導入してスクロース資化性を付与し、さらにグルコース取込み能を強化することで糖の資化能を強化した。モノマーとなる 3HHx は脂質の β -酸化経路から主として供給され、糖からの生成量は低レベルであるため、複数の異種遺伝子を導入して 3HHx 生合成経路を強化した。この改変株を用いてスクロースを単一炭素源とした高密度流加培養を行い、3HHx 比率が約 4 mol% の PHBHHx について 113 g/L という高生産を達成した。

PHA の分析は、乾燥菌体のメタノリシスや酸加水分解によりモノマーまで分解し、ガスクロマトグラフィー (GC) や高速液体クロマトグラフィーによって行われるのが一般的である。しかし、高温での反応、有害な有機溶媒や強酸の使用など、生産現場での分析法としては安全上の問題があった。そこで、界面活性剤と超音波破碎による安全かつ短時間での実施が可能な分離精製、定量法を開発し、本法での定量分析結果は GC での結果と同等であることを示した。

以上のように本研究では、優れた PHA 蓄積能力を持つ *C. necator* を工業利用に耐え得る PHBHHx 生産菌に改変することを試み、3HHx 比率を任意に改変する技術や、本来の生産原料であった油脂の代替としてのスクロースからの大量生産技術、さらに迅速かつ安全な PHBHHx の定量、精製法の開発に成功した。本研究の成果は、PHBHHx というバイオマス由来でかつ生分解性に優れた有望な素材を実社会に送り出すための基盤を提供するものである。学位審査委員会は本論文について慎重に審査し、博士の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	有川 尚志
試験担当者	主査 小林哲夫 中野秀雄 吉村徹 木村眞 金丸京子			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年12月 1日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				

学力審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※乙第	号	氏名	有川 尚志
学力検査 担当者	主査 小林哲夫 中野秀雄 吉村徹 木村眞 金丸京子			
(学力審査の結果の要旨)				
<p>平成29年12月 1日 学位審査委員出席のもとに学力審査委員会を開き</p> <p>審査の結果、本研究科博士課程修了者と同等以上の学力を有するものと認定</p> <p>した。</p>				