



Title	BIOSYNTHESIS OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE) IN THE MARINE PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM RHODOVULUM SULFIDOPHILUM STRAIN W-1S
Author(s)	Chowdhury, Wasimul Quader
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39716">https://hdl.handle.net/11094/39716</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	チョードリー Chowdhury	ワシムル Wasimul	カデル Quader
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)		
学位記番号	第12455号		
学位授与年月日	平成8年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文名	薬学研究科応用薬学専攻 BIOSYNTHESIS OF POLY (3 - HYDROXYBUTYRATE) IN THE MARINE PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM RHODOVULUM SULFIDOPHILUM STRAIN W-1S (海産性光合成細菌 <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> W-1S 株のポリ(3-ヒドロキシブチレート)生合成に関する研究)		
論文審査委員	(主査) 教授 溝口 正		
	(副査) 教授 那須 正夫 教授 田中 康一 教授 西原 力		

### 論文内容の要旨

多数の細菌はエネルギー源及び炭素源の貯蔵、または還元力の処理のためポリヒドロキシアルカノエート (PHA) を菌体内に蓄積することが知られている。PHAは熱可塑性を有し、自然環境中に存在する広範な微生物により分解されるため生分解性プラスチックの原料として注目を集めている。本研究において PHA の一種であるポリ(3-ヒドロキシブチレート) (PHB) の生合成に影響を与える因子に関する検討、PHB 生合成関連遺伝子群のクローニング、および PHB 蓄積と水素発生との相互関係の解析を海産性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* strain W-1S を用いて行った。

3%NaCl, 5 mMNH<sub>4</sub>Cl, ビタミン類(チアミン、ニコチン酸、パラアミノ安息香酸、ビオチン)、炭素源として酢酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム各1%を含む改変岡本培地 (MOM) を基本培地として用いた。基本培地よりそれぞれ NaCl, ビタミン, NH<sub>4</sub>Clを除去し PHB 含量と乾燥菌体重量に与える影響を微好気条件下で検討したところ、PHB 蓄積に NaClは必須、NH<sub>4</sub>Cl は促進的、ビタミン類は抑制的に作用することが明らかとなった。個々のビタミンの影響を検討した結果ビタミンによる阻害効果は主にビオチンに起因するものであると思われた。またビタミンを含む基本培地で培養すると色素産生が促進され PHB 蓄積が阻害されるという結果が得られていることから微好気条件下、carbon flux の制御において PHB 蓄積と色素産生が密接な関係にあることが示唆された。次に PHB 蓄積に有効な炭素源の検討を行った。酢酸を単独基質とした場合、乾燥菌体重量の56%まで PHB を蓄積したが、ピルビン酸では12.6%と低く、さらに水素発生の良好な基質であるリンゴ酸とコハク酸の場合は増殖および PHB 蓄積共に観察されなかった。また増殖に必須のリンを添加しない場合 PHB 蓄積は有意に低下した。一般の細菌は増殖を制限した場合に大量に PHB を蓄積することが知られているが、上記の結果より本菌は光照射下、微好気条件で増殖を良好にサポートする条件で PHB を大量に蓄積することが示された。

次に PHB 生合成に関連する遺伝子群のクローニングを試みた。本菌の全DNA抽出後制限酵素 *Hind* III を用いて部分分解し、グラム陰性細菌に広い宿主域を有するコスミドベクター pVK102に連結した。調製した組換えコスミドを *in vitro* packaging 法により *Escherichia coli* VCS257に導入し、テトラサイクリン (10 μg/ml) を含む L-寒天培地上にコロニーを形成させた。形成した約1000個のコロニーをリン酸緩衝液に懸濁させグリセロールを添加し gene library として-80°Cで保存した。この gene library すなわち組換えコスミドを有する *E. coli* VCS257を DNA 供与体、*E. coli* C600 (pRK2013) をヘルパー、PHB 蓄積能欠損株 *A. eutrophus* PHB<sup>-</sup> 4を受容体として triparental

conjugationを行った。その結果、PHB蓄積能を回復した一つのポジティブクローンを得、組換えコスミドをpCW1と命名した。A. eutrophus PHB<sup>-</sup>4 (pCW1) を無機塩培地に懸濁し30°Cで48時間好気培養を行ったところ菌体乾燥重量の約60%のPHB蓄積が観察された。このようにクローニングされたRv. sulfidophilum strain W-1SのPHB生合成関連遺伝子群は異種微生物において発現し大量のPHB蓄積を可能とさせた。組換えコスミドpCW1を再びRv. sulfidophilum strain W-1Sに導入しPHB遺伝子を增幅することによりさらに効率の良いPHB生産を期待することができる。またpCW1の単離により本菌のPHB生合成関連遺伝子群の塩基配列、遺伝子構成、および制御機構の解析が可能となった。

本菌は明嫌気条件下コハク酸、酢酸、エタノール等を基質としてニトロゲナーゼを介して水素を発生することが知られている。水素発生の阻害剤である一酸化炭素を添加し酢酸を基質として光照射下嫌気条件で培養を行うと著しいPHB蓄積の上昇が観察された。この結果より余剰の還元力の処理機構としてPHB蓄積と水素発生の連関が示された。さらに詳細な機構を解析する目的で [<sup>14</sup>C] 標識酢酸の取り込み実験を試みた。水素発生能のない細胞、中等度の水素発生能を有する細胞、非常に高い水素発生能を有する細胞をそれぞれ調製し、 [<sup>14</sup>C] 標識酢酸を含むMOMに懸濁後、明嫌気条件下30°Cで培養し水素発生量およびPHBに取り込まれた放射活性を測定した。ニトロゲナーゼ活性を持たない細胞の場合細胞懸濁液中の放射活性は80%以上が取り込まれそのほとんどがPHB画分に回収されるという結果が得られた。中等度のニトロゲナーゼ活性を有する細胞の場合は酢酸の炭素骨格が一度PHBに移行後、PHBが分解されその代謝産物が水素生産の基質となった。非常に高いニトロゲナーゼ活性を有する細胞の場合は多量の水素発生が観察され、培養上清中の放射活性は90%以上消失したが、ほとんどPHB画分への移行は見られなかった。これは基質として与えた酢酸がPHB画分へ移行せず直接水素発生の基質として用いられたことを示している。

これらの結果より細胞外に添加した酢酸の明嫌気条件における菌体内での運命は細胞の持つニトロゲナーゼ活性に依存することが明らかとなった。すなわち、活性がない場合まずPHBとして貯蔵されニトロゲナーゼ誘導後PHB分解産物が嫌気条件下水素と炭酸ガスに変換され、すでに高いニトロゲナーゼ活性を有している場合は酢酸は直接水素に変換される。これらの実験結果は光合成微生物を用いた環境保全型物質生産系において目的に応じてPHBと水素生産を制御しうる可能性を示すものである。

#### 論文審査の結果の要旨

微生物が産生するポリエステルであるポリヒドロキシアルカノエート (PHA) は生分解性プラスチックの原料として注目を集めている。光合成藻類である緑藻は太陽エネルギーを駆動力とし炭酸ガスを固定し、暗条件下で有機物を放出することが知られており、この有機物を基質としてPHAを生産する系が確立されれば有用な炭酸ガスの再資源化が可能となる。本研究では海産性光合成細菌のポリヒドロキシブチレート (PHB) 産生に影響を与える因子に関する検討が行われ本菌が通常の細菌に比べPHB蓄積に有利な性質を保持していることを種々明らかにした。そして本菌の遺伝子ライブラリーを作製後PHB生合成関連遺伝子群の単離に成功し、異種の微生物での発現も可能とさせた。また嫌気代謝において水素発生とPHB蓄積の間に密接な関連があり、ニトロゲナーゼと呼ばれる酵素の活性の程度によりPHB蓄積量が大きく変動することを明らかにした。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。