The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Pseudomonas aureofaciens由来PHA合成関連遺伝子群に関する研究
Author(s)	西川, 智浩
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42279
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【4】

氏　　名	西川智浩（にしかわともひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16151　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学　位　論　文　名	*Pseudomonas aureofaciens* 由来 PHA 合成関連遺伝子群に関する研究
論文審査委員	（主査） 教　授　八木　清仁 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　土井　健史　　教　授　宮本　和久

論文内容の要旨

Poly（3-hydroxyalkanoate）（PHA）は、多くの bacteria が増殖を制限される条件かつ炭素源過剰条件下において生合成され、炭素源やエネルギー源を貯蔵するために bacteria 内に蓄積される。Bacteria が再び増殖可能になると分解されて炭素源やエネルギー源として使われる。PHA は（*R*）-3-hydroxyalkanoate を monomer とする光学活性ポリエステルであり、菌体内で合成された（*R*）-3-hydroxyacyl-CoA（3HA-CoA）を重合することによって合成される。

この反応を触媒する酵素 PHA synthase はその基質特異性によって大きく二つに分類される。一つは、炭素数が3～5の 3HA-CoA に特異性を示し、short-chain-length PHA synthase（scl-PHA synthase）と呼ばれ、もう一方は、炭素数が6～14の 3HA-CoA に特異性を示し、medium-chain-length PHA synthase（mcl-PHA synthase）と呼ばれる。一般的に mcl-PHA synthase によって合成される PHA（mcl-PHA）は scl-PHA synthase によって合成される PHA（scl-PHA）より柔軟性があり、広い範囲で使用することが期待される。しかし、これまでに mcl-PHA 合成関連遺伝子群についてはあまり報告がなされておらず新たな知見が求められている。

本研究は、新たな mcl-PHA 合成関連遺伝子群の解析を目的にした。この目的を達成するために、mcl-PHA を効率良く合成する菌株をスクリーニングした結果、*P. aureofaciens* が様々な炭素源から mcl-PHA を合成することを見い出した。その後、この菌株から *P. putida* PHA 欠損株の相補を利用して PHA synthase 遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定したところ、二種類の PHA synthase、PHA depolymerase、PHA 結合タンパク、二種類の機能未知タンパクをコードする遺伝子が存在することが確認された。

これらの PHA synthase 遺伝子を *P. putida* PHA 欠損株に導入することによって、mcl-PHA が合成された。このことは、今回得られた PHA synthase 遺伝子が mcl-PHA synthase 遺伝子であることを示している。また、糖類を炭素源として培養したとき、組換え *P. putida* PHA 欠損株が合成する PHA の monomer 組成は、*P. putida* の野生株よりも *P. aureofaciens* の合成する PHA の monomer 組成に近いという結果を示した。このことは、*P. aureofaciens* 由来の PHA synthase 遺伝子を異種微生物に導入することによって、合成する mcl-PHA の物性を変化させることが可能であることを示唆している。次に、本来糖類から PHA を合成できない菌株に PHA synthase 遺伝子を導入したところ、糖類から PHA を合成した。これまでに、このような報告はされておらず、他の PHA synthase 遺伝子には見られない新規の性質を持つことが明らかになった。*P. aureofaciens* の PHA synthase 遺伝子を導入すること

によって、入手の容易な炭素源から mcl-PHA を合成できることは、安価な mcl-PHA 生産につながると考えられる。

P. aureofaciens の各 PHA synthase の機能の違いを解析するために、各 PHA synthase 遺伝子を導入し、様々な炭素源を与えて培養を行ったところ、*phaC1* を導入した PHA 欠損株のほうが *phaC2* を導入した欠損株よりも明らかに mcl-PHA を多量に合成した。この結果は、異種微生物に PHA synthase 遺伝子を導入して mcl-PHA を合成させる場合、PHA synthase 1 を導入した組換え株の方が PHA synthase 2 を導入した組換え株よりも効率よく mcl-PHA を合成できることを示している。次に、*P. aureofaciens* での各 PHA synthase 遺伝子の転写と PHA の合成量の関係を調べたところ、*P. aureofaciens* の mcl-PHA 合成量は、*phaC1* の発現と相関関係を示していた。しかし、*phaC2* の発現と PHA の合成量には相関関係を確認することはできなかった。この結果から、*P. aureofaciens* の *phaC1* は誘導型の遺伝子であり、*phaC2* は constitutive に発現する遺伝子であることがわかった。

最後に、mcl-PHA synthase 1 遺伝子を光合成微細藻類 cyanobacteria に導入したところ、光合成によって mcl-PHA を合成することが明らかになった。以前に組換え cyanobacteria による scl-PHA 合成が報告されているが、組換え cyanobacteria による mcl-PHA の合成は、本研究が初めてである。したがって、組換え cyanobacteria による二酸化炭素からの mcl-PHA 生産の系が可能であることが示された。今後、mcl-PHA の合成量を増加させることで、安価な mcl-PHA 生産が可能となり、生分解性プラスチックの材料として広く利用されると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ポリ 3 －ヒドロキシアルカノエート（PHA）は微生物が炭素源、エネルギー源として体内に蓄積するポリエステルであり生分解性プラスチックの原料物質として注目されている。この PHA 合成の鍵酵素である PHA synthase は現在まで基質特異性の異なる 2 種類が報告されている。すなわち側鎖が短い PHA を合成する scl-PHA synthase と側鎖が長い PHA を合成する mcl-PHA synthase である。側鎖の短い scl-PHA は結晶性が高く堅くてもろいため実用に適さないが mcl-PHA は柔軟な性質を有している。

本研究は遺伝子工学的な手法を用いて効率的な PHA 生産システムを構築することを目的として行われた。大量に mcl-PHA を蓄積する *Pseudomonas aureofaciens* を研究対象とし、PHA 合成変異株を用いた相補実験により PHA 合成関連遺伝子群を含むクローンを単離した。塩基配列を決定した結果、PHA を分解する depolymerase 遺伝子を挟んで 2 種類の mcl-PHA synthase（*phaC1*、*phaC2*）遺伝子を見いだした。両遺伝子産物は各々単独で機能し、PHA C 1 は高活性、PHAC 2 は低活性であること、また *phaC1* 遺伝子は誘導的、*phaC2* 遺伝子は構成的に発現されることを明らかにした。

最後に二酸化炭素からの mcl-PHA 合成が可能か否かを調べるために光合成藻類であるシアノバクテリアに遺伝子導入を試みた。ルビスコプロモータに *phaC1* 遺伝子を連結して *Synechococcus* に導入し、光独立栄養条件で培養した結果、光エネルギーを利用して二酸化炭素から mcl-PHA を合成できることを示した。これまで scl-PHA をシアノバクテリアに蓄積させたという報告がされているが、mcl-PHA を蓄積させたのは本研究が最初である。

以上のように本論文は二酸化炭素を唯一の炭素源として生分解性プラスチックの原料を合成するシステムの開発に大きく貢献するものであり博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。