HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Secretion Systems and Applications of Microbial Lactate-based Oligomers [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Utsunomia, Camila
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第12921号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67429
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Camila_Utsunomia_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（工学）　氏名　ウツノミア カミラ

審査担当者	主査	教授	髙木 睦
	副査	教授	佐藤 敏文
	副査	教授	坂口 和靖
	副査	准教授	松本 謙一郎
	副査	教授	田口 精一 (東京農業大学)

学 位 論 文 題 名

Secretion Systems and Applications of Microbial Lactate-based Oligomers
（微生物による乳酸オリゴマー分泌システムの構築とその応用研究）

ポリ乳酸は、バイオマス由来プラスチックとして産業生産されている有用な高分子材料である。しかしながら、ポリ乳酸の価格は石油由来の汎用プラスチックよりも高く、さらなる生産の効率化が求められている。ポリ乳酸の合成プロセスは、微生物を用いた乳酸発酵と、それにより得られた乳酸の重合プロセスに大別されるが、培養液中の乳酸を精製し、オリゴマー化させるプロセスのコストが高いことが指摘されていた。

本学位論文は、微生物のポリエステル生合成系を応用し、ポリ乳酸の前駆体となりうる乳酸オリゴマーを微生物で直接発酵生産する新規な方法について述べたものである。まず Chapter 1 では、本研究の背景として、ポリ乳酸の生産方法とその問題点について紹介し、さらに、本学位論文で構築した実験系の基盤となる微生物産生ポリエステルの生合成システムについての知見を述べている。とくに、乳酸ポリマーの生合成を可能とした乳酸重合酵素の発見と、その応用例について詳しく述べている。

Chapter 2 では、本学位論文の鍵となる、乳酸オリゴマーの発見とその構造解析について述べている。著者は、乳酸ポリマーの生合成系酵素群を発現する遺伝子組換え大腸菌が、高分子量の乳酸ポリマーと低分子量のオリゴマーを両方合成していることを発見した。さらに注目するべき事実は、合成されたオリゴマーが細胞外へ分泌されたことであった。微生物産生ポリエステルは、本来細胞内の貯蔵物質であり、細胞外に生産された例はなかった。本学位論文の結果により、ポリエステルが分子量依存的に細胞外へ分泌可能であることが示され、従来とは異なる新たな物質生産系のデザインを可能とした。最初に発見されたオリゴマーの合成量は高分子量ポリマーの合成量と比較してわずかであった。筆者は、オリゴマーの合成効率向上のため、ポリエステル重合酵素の連鎖移動反応に着目した。重合酵素と、重合中のポリエステルは、チオエステル結合を介して共有結合していることが知られるが、アルコールを添加することにより、エステル交換反応により重合が停止することが知られていた。この知見を応用し、種々アルコールの添加を検討したところ、ジエチレングリコール (DEG) が最も効果的に生産物の分子量を低下させ、オリゴマー合成量を増加させることを見出した。また、反応機構から予想される通り、カルボキシル基末端に DEG がエステル結合したオリゴマーが得られたことを述べている。

Chapter 3 では、前章で合成したオリゴマーを、触媒反応によりポリ乳酸の前駆体であるラクチドへと変換することを検討した。本研究により合成されたオリゴマーと、既存のプロセスでラクチドの前駆体として用いれる乳酸ホモオリゴマーとの構造的な相違点は、カルボキシル末端が DEG 化されていることに加え、オリゴマー中に 3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) ユニットが含まれるランダム共重合オリゴマーである点であった。これらの構造的特徴がラクチド変換効率に与える影響を調査した結果、3HB ユニットがラクチドの収率を低下させることが明らかとなった。この結果を受けて、代謝工学的手法を用いて乳酸分率が高いオリゴマーを合成した結果、予想通りラクチドへの変換効率が改善できた。これらの結果により、本学位論文で合成した乳酸オリゴマーが、ラクチドの前駆体として利用可能であることが示されている。

Chapter 4 では、組換え大腸菌がオリゴマーを分泌する機構の解明に取り組んだ。これまで細菌のオリゴエステルの分泌機構は全く不明であった。そこで筆者は、大腸菌の物質輸送を担う膜タンパク質（トランスポーター）がオリゴマーの分泌に寄与していると仮定し、トランスポーターを欠失させ

た変異体をオリゴマーの分泌量を指標としたスクリーニング系を新たに設計した。有機物のトランスポーターの欠失株２０９株をスクリーニングした結果、７つの候補タンパク質が選抜された。選抜された膜タンパク質のうち、外膜に局在する２つのタンパク質は、ポーリンと呼ばれる低分子を拡散するトランスポーターであることを明らかにした。さらに、ポーリンを過剰発現させることにより、オリゴマーの分泌量が向上したことから、大腸菌のオリゴマー分泌機構に外膜上のポーリンが関与していることが示唆されたと述べている。他方、内膜局在タンパク質については、複数の候補が選抜されたことから、複数の分泌経路が存在することが示唆された。

これを要するに筆者は、新規な乳酸オリゴマーの生合成系を初めて発見、効率化した。さらにポリ乳酸の前駆体であるラクチドへの変換にも成功したことにより、ポリ乳酸の合成スキームを短縮できる可能性を示した。さらに、細菌のオリゴエステル分泌系という未開拓の領域に挑戦し、分泌機構の一端を明らかにした。これらの成果は、工学的・理学的双方のアプローチを含むものであり、また生物工学分野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。