



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Expanding Substrate Scope of Sequence-regulating Polyhydroxyalkanoate Synthase for Block Copolymer Synthesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	PHAN, THI HIEN
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15641号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90832
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	PHAN_THI_HIEN_review.pdf, 審査の要旨



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 ファン ティ ヒエン

審査担当者	主査	教授	佐藤 敏文
	副査	教授	佐田 和己
	副査	教授	大和 徹
	副査	教授	松本 謙一郎

学位論文題名

Expanding Substrate Scope of Sequence-regulating Polyhydroxyalkanoate Synthase for Block Copolymer Synthesis
(配列制御型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素の基質範囲を拡大しブロック共重合体を合成する)

微生物が合成するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、複数のモノマーを含む場合、一般にランダム共重合体が合成されることが知られている。当研究室で見出した改変型重合酵素 PhaC_{AR} は、複数のモノマーの混合物から自発的にブロック共重合体を合成する有用な性質を有する。ブロック共重合体は、性質の異なるセグメントが結合することで、その特徴的な物性を発揮する。そのため、化学合成法によりブロック共重合体を合成する場合、ポリオレフィンと多糖など、構造・物性の大きく異なるセグメントが選ばれることが多い。しかし PHA ブロック共重合体の場合、脂肪族ポリエステル構造のみを用いて性質の異なるセグメントを合成し、且つそれらを単一の酵素で重合する必要がある。これは、酵素が高い基質特異性を有し、特定の基質のみと反応する性質を持っていることを考慮すると、容易なことではない。本学位論文では、構造・物性の異なるセグメントをブロック共重合可能な新規ポリエステル合成酵素の創出を目的として、酵素の進化工学的改変および変異体の機能解析を行った。

第一章で、PHA の生合成の基礎、合成酵素の性質、配列制御型合成酵素 PhaC_{AR} の性質、進化工学的改変の手法について述べたのち、第二章では、変異体の作製に取り組んだ。PhaC_{AR} は炭素数が 5 以下の短鎖モノマーに高い活性を有する。短鎖モノマーからなるポリマーは硬質な物性を示すことが多いことから、物性の異なるセグメントの合成を可能とするため、軟質性の高い炭素数 6 以上の中鎖ポリマーの合成を目的とした。具体的には、PhaC_{AR} が基質特異性を示す 3-ヒドロキシヘキサノ酸 (3HHx) ユニットをターゲットとし、重合活性強化を試みた。既往の研究で発見されていた、合成酵素の基質特異性に寄与するアミノ酸残基部位への位置指定飽和変異の効果について検討した。とくに、F314H 変異体は、3HHx の取り込み能力が高く、親酵素では合成できない P(3HHx) ホモポリマーの合成が可能であった。In vitro アッセイにより、酵素活性が向上していることを確認した。また、2-ヒドロキシ酪酸 (2HB) との共重合体を合成し、親酵素と同様にブロック共重合体が合成できることを確認した。これにより、中鎖 PHA セグメントを含むブロック共重合体 P(3HHx)-*b*-P(2HB) の生合成に初めて成功した。

第三章では、第二章で見出した優良変異の組み合わせ効果を調べるとともに、これまで PhaC_{AR} で合成に成功していなかった乳酸ポリマーの合成を検討した。その結果、N149D と F314H を組み合わせた NDFH 変異体が高い乳酸重合活性を示すことを見出した。生成物のキラル分析により、本重合が D 乳酸特異的であることを確認した。乳酸モノマー単独での重合は不可能であり、得られるポリマーは、3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) または 3HHx とのブロック共重合体である P(3HB)-*b*-PDLA および P(3HHx)-*b*-PDLA であった。PDLA セグメントが PHA とブロック共重合していることを各セグメントの溶解度の違いを利用した溶媒分別により確認した。第二章で合成したブロック共重合体は、両方のセグメントが軟質性である問題があった。一方、P(3HHx)-*b*-PDLA は軟質・硬質セグメントの組み合わせとなっており、目的であった物性の異なるセグメントからなるブロック共重合体の合成に成功した。

第四章では、PhaC_{AR} のさらなる基質特異性の拡張を試みた。中鎖モノマーである 3-ヒドロキシオクタン酸 (3HO) は、3HHx よりも軟質化効果が高く、糖からの合成も容易である利点があることから 3HO の取り込み能力向上を目指した。合成酵素の変異体ライブラリーを導入した組換え大腸菌を、3HO を含有する寒天培地上で培養し、ポリマーの蛍光染色に基づいてポリマーの合成量が増加したと推定される変異体を単離した。得られた変異体は、狙いであった 3HO の重合量は増加していなかったが、3HHx の重合量を増加させることがわかった。このことから中鎖モノマーをターゲットとした変異体の選抜系を構築した。

これを要するに、配列制御型ポリエステル合成酵素の基質特異性を拡張し、種々の新規ブロック共重合体の合成を可能とした。とくに高分子量の PDLA を構造中に含むポリマーの生合成は、長期にわたり多くの研究者が試みているにも関わらず達成されていなかったものであり、PHA の構造多様性の拡大への貢献は大きい。

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。