



Title	Development of a Novel Method for Controlling the Molecular Weight of Microbial Polyesters
Author(s)	田中, 聖也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第16873号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16873
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99718
Type	doctoral thesis
File Information	TANAKA_Seiya_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学）

氏名 田中 聖也

学 位 論 文 題 名

Development of a novel method for controlling the molecular weight of microbial polyesters

(微生物産生ポリエステルの新規分子量制御法の構築)

ある種の微生物は、糖を原料として生体内にポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を合成し、炭素源及びエネルギー源として生体内に貯蔵する。PHA は、種々のヒドロキシアシル CoA をモノマー基質として、PHA 重合酵素 PhaC が触媒する連続的なエステル交換反応により合成される。ポリマー分子量は、PHA の物性に影響する重要な因子である。培養条件や菌種、PhaC の選択によって様々な分子量のポリマーの合成条件が過去に報告されているものの、ポリマーの分子量を決定する重要なステップである重合停止反応の詳細な機構は解明されていない。ポリマーの分子量に影響する現象として、重合反応の系中にエタノールなどの水酸化化合物が存在すると、伸長中のポリマーに連鎖移動反応が起こり、アルコール分子がポリマー末端にエステル結合することが知られている。ここで、重合停止の詳細な機構は不明であるが、連鎖移動反応により重合が停止し、酵素から伸長中のポリマー鎖が解離すると考えられており、この停止反応が重合における伸長反応と競合することでポリマー分子量が決定するというモデルが定説であった。一方先行研究では、当研究室で開発された人工改変型重合酵素 PhaC_{AR}によって合成されるブロック共重合体生産の培養系に、PHA の分子量低下効果の高いジエチレングリコール(DEG)を添加する実験が行われた。本実験は、DEG 添加条件において重合途中で停止反応が起こり、片方のセグメントのみからなるポリマーが得られると予想されていた。しかし予想とは異なり、実験の結果低分子量化したブロック共重合体を得られた。この結果より、私は水酸化化合物による分子量低下現象は水酸基によるポリマー鎖末端への結合が原因という定説に疑問を持ち、水酸基を用いた分子量低下効果の再検証を行うこととした。またこの解析を通じて発見された新規な手法による PHA の分子量制御の構築を目的とした。重合停止反応のコントロールによるポリマー分子量の制御が可能になれば、PHA のさらなる用途拡大が見込まれる。

本論文の第 1 章では、PHA の分子量制御についてこれまでの研究と提案されている作業仮説について解説した。

第 2 章では、水酸基を持たない DEG 類似構造ポリエーテル化合物を PHA 生産の培地に添加し、分子量に影響を与えるか調査した。PHA 合成酵素 PhaC_{AR}を発現する組換え大腸菌を、各種ポリエーテルを含む培養し、得られたポリマーの分子量を測定した。その結果、水酸基を持たないにもかかわらず、ポリエーテル化合物の濃度上昇と共にポリマー分子量が低下することが確認された。¹H NMR による解析の結果、ポリエーテル化合物はポリマー末端と結合していなかった。さらに、ポリエーテルの添加は PhaC_{AR}の発現量や活性に影響を与えなかったことから、定説として考えられていた水酸基による停止反応とは異なる未知のポリマー分子量低下機構の存在が示唆された。

第3章では、ポリエーテルの化学構造とポリマー分子量に与える影響の関係を明らかにするため、様々な構造のポリエーテル化合物を培地に添加して PHA 合成を行った。その結果、環状構造をもつ 18-crown-6 ether を加えることで、PHA 分子量が増加することを発見した。PHA 生産時に外部的に加えた化合物による分子量増加は初めての例であった。比較のために環のサイズが異なる 15-crown-5 ether を用いた場合、分子量の増加は見られなかった。18-crown-6 ether を添加した条件では、大腸菌の生育を阻害しポリマー生産量を減少させたが、PhaCAR 発現量はわずかに減少するものの大きく変化しなかった。ポリマー分子量が大きく増加することから、ポリマー分子量の増大は PhaCAR 発現量の減少による影響ではないことが示唆された。また、PhaCAR の比活性についても、ポリエーテル化合物と同様に 18-crown-6 ether による変化は確認されなかった。次に、18-crown-6 ether による分子量増加効果が合成されるポリマーの構造によって異なるかを検討するために、側鎖長の異なるホモポリマー3種を生合成した。その結果、側鎖長が短い構造では、わずかに分子量が増大したが、側鎖長の長い基質に対しては分子量増加が確認されず、重合される基質の構造により 18-crown-6 ether による分子量増加効果は異なることが示唆された。

これらをまとめると本論文では、定説とされるアルコール化合物による重合停止反応のモデルを再検証するため、組換え大腸菌による PHA 生産時に、水酸基を持たないポリエーテル化合物の添加を行い、得られる PHA の分子量を測定し PHA 重合の停止反応に及ぼす影響について調査し、水酸基が PHA の分子量減少に必ずしも必要ないことを示した。さらに、環状構造を持つクラウンエーテルが PHA 分子量を増加することを偶然発見し、ポリマー分子量の新たな制御法を構築した。最後に、高分子量 PHA を合成する PhaCAR 変異体を発見した。これらを総括すると、本論文では、PHA の分子量決定機構に関する新たな知見を得たほか、ポリマー分子量を制御する新規手法を見出した。