



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                        |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k16873">https://doi.org/10.14943/doctoral.k16873</a>                                        |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/99718">https://hdl.handle.net/2115/99718</a>                                                      |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                        |
| File Information    | TANAKA_Seiya_review.pdf, 審査の要旨 <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |



# 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 田中 聖也

|       |    |      |        |
|-------|----|------|--------|
| 審査担当者 | 主査 | 教授   | 佐藤 敏文  |
|       | 副査 | 特任教授 | 坂口 和靖  |
|       | 副査 | 教授   | 渡慶次 学  |
|       | 副査 | 教授   | 松本 謙一郎 |

## 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基を有する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。一方所属研究室における先行研究では、このモデルでは説明が付かない現象が観察されていた。この結果より、水酸基を有する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、本学位論文では、ポリエーテルを対象として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。

第 1 章では、PHA の分子量制御についてこれまでの研究と、水酸基を有する化合物が PHA の分子量を低下させる機構について提案されているモデル解説した。続いて、PHA 培養系に添加されるアルコールとして代表的なジエチレングリコール (DEG) について、ブロック共重合体の合成系に適用すると、連鎖移動反応により重合が中断されるとは考えられない生成物が生じる反応を示し、これまで定説とされていた反応機構への疑問を述べた。これにより、本研究の着眼点と目的を定義した。

第 2 章では、DEG および、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<sub>AR</sub> を発現する組換え大腸菌を、各種ポリエーテルを含む培地にて培養し、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。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<sub>AR</sub> 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現象はこれまで報告がなく、本件が初めての例であった。分子量が増加する機構を解明するため、重合酵素の発現量および酵素活性への効果を調べたが、有意な差は認められなかった。このことから、分子量増加効果は酵素活性の変化が原因ではないことが示された。比較のために用いられた環のサイズが異なる 15-crown-5 ether では分子量の増加は見られなかった。

ことから、18-crown-6 ether の分子サイズに起因する機構が存在する可能性が考えられた。そこで、18-crown-6 ether がカリウムイオンの包摂能を持つことに着目し、カリウムイオン濃度を上昇させたところ分子量増加効果が弱まったことから、カリウムイオンがポリマー分子量に関係している可能性が示された。これらの結果により、培地中への添加により PHA の分子量を増加させる分子を初めて見出し、その分子機構の一部を明らかにした。

これらを要するに、本研究は、従来定説とされていた PHA の分子量決定機構が必ずしも正しくないことを初めて示し、さらに従来困難だったポリマー分子量を増大させるポリマー合成手法を発見した。これらの成果は、PHA の分子量決定機構に関する理解を深化させ、応用面においても有用な知見であるといえ、微生物を用いた有用物質生産の分野におい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。