

## 論文要旨

論文題目 「乳酸ベースポリマーの微生物合成に関する研究」

氏名 後藤早希

乳酸は、さまざまな分野において利用されており、近年は、環境中の微生物によって水や二酸化炭素に分解される、いわゆる生分解性プラスチックのポリ乳酸 (PLA) の原料として、需要が増大している。PLA は透明性を有しており、L-乳酸のみ重合させたポリ-L-乳酸 (PLLA) と D-乳酸のみ重合させたポリ-D-乳酸 (PDLA) のステレオコンプレックスは、耐熱性が高まることが知られている。したがって、D-および L-乳酸を選択的に製造することが求められている。

乳酸発酵において、菌株を選択することにより L-乳酸、D-乳酸、DL-乳酸のいずれも製造することができる。しかしながら、発酵に伴い pH が低下し、生成される乳酸自体にも強い生育阻害作用があるため、これらに適応した耐酸性の乳酸菌を培養に利用する必要がある。また、D-乳酸生産に利用できる菌は少ない。そこで、本研究では、DL-乳酸を生産する耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HT に着目した。

通常、PLA は重金属を触媒とした化学重合法により合成される。一方、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は微生物が菌体内に合成・蓄積する生分解性プラスチックである。PHA は、炭素数 4 の (R)-3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) をモノマー単位とする P(3HB)ホモポリマーと、炭素数 6~14 の中鎖長の (R)-3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) をモノマー単位とする P(3HA)コポリマーに大別される。また、PHA は、モノマー組成により物性が異なることが知られている。

最近、PHA 生合成システムを利用した PLA 様物質の合成が報告されている。これは、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性 PHA 重合酵素の改変体を用いて、微生物菌体内に乳酸 (LA) ユニットを含む生分解性プラスチック (乳酸ベースポリマー) の合成を行うものである。乳酸ベースポリマーは、環境低負荷な方法において合成されるが、未だ実用化には至っていない。そこで、本研究では、実用的な高性能乳酸ベースポリマーの合成を目指した。

### (1) 耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HT の乳酸脱水素酵素遺伝子のクローニングと同定

放置中の米もろみ酢より分離された *Lb. acetotolerans* HT は pH 2.9 の酸性条件下でも生育が可能な耐酸性乳酸菌であるが、この菌種において乳酸の生産に必須である乳酸脱水素酵素 (LDH) についての研究報告はない。したがって、本研究では、HT 株の LDH 遺伝子のクローニングを行い、その機能を明らかにすることを目的とした。HT 株は、ホモ DL-乳酸発酵型のため、D-LDH と L-LDH の 2 種類の酵素遺伝子を有すると考えられた。そこで、すでに報告されているさまざまな乳酸菌の D-および L-LDH の保存領域に基づいてプライマーを設計し、HT 株のゲノム DNA を鋳型とした degenerate PCR を行った。次に、得られた塩基配列を基にプライマーを設計し、inverse PCR を行った。さらに、HT 株の D-および L-LDH 遺伝子 (*ldhD* および *ldhL1*) の外側の配列のプライマーを合成し、PCR により得られた増幅産物の塩基配列を決定した (DBBJ accession nos. LC378394 および LC378395)。また、最近、

*Lactobacillus acetotolerans* RIB 9124 の全ゲノム情報が明らかとなり、もう一つの L-LDH の存在が予想された。この遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを設計し、HT 株でも予想されるもう一つの L-LDH 遺伝子 (*ldhL2*) についても塩基配列を決定した (accession no. LC378396)。これらの遺伝子の推定翻訳産物の同源性検索を行った結果、推定 LDHs 遺伝子 (*ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2*) の翻訳産物は *Lb. acetotolerans* JCM 3825 および RIB 9124 の推定 LDHs といずれも 99~100%一致した。

さらに、クローニングした HT 株の LDH 遺伝子の機能を確認するため、それぞれの遺伝子を大腸菌に導入して異種発現させた。その結果、*ldhD* あるいは *ldhL1* 遺伝子を導入した大腸菌は D-乳酸、L-乳酸をそれぞれ生産したが、*ldhL2* 遺伝子導入株は乳酸を生産しなかった。以上より、HT 株の *ldhD* および *ldhL1* 遺伝子はそれぞれ D-および L-LDH の機能を有することが明らかとなった。しかし、*ldhL2* 遺伝子には、その機能は見出されなかった。

## (2) *Lactobacillus acetotolerans* HT の D-乳酸脱水素酵素遺伝子を導入した大腸菌組換え株による乳酸ベースコポリマーの合成

これまでに、乳酸ベースポリマーとして、LA と 3HB ユニットの共重合体 P(LA-co-3HB)が合成されており、このポリマーの LA 分率を 15~30 mol%程度高めると透明性を有することが報告されている。また、大腸菌は嫌気的条件下にて D-乳酸 (D-LA) を生産する。しかし、D-LA に CoA を付与するアセチル-CoA は好氣的条件下にて生成量が増加する。したがって、本研究では、好氣的条件下においても D-LA を生産させるため、外在性 D-LDH 遺伝子を大腸菌に導入し、LA 分率を高めた P(LA-co-3HB)の生合成を行うことを目的とした。まず、外在性 D-LDH 遺伝子として HT 株の *ldhD* 遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。このプラスミドを、D-LA に CoA を付与するプロピオニル-CoA トランスフェラーゼ (PCT)、(R)-3HB-CoA を供給する  $\beta$ -ケトチオラーゼ (PhaA) および NADPH 依存性アセトアセチル CoA リダクターゼ (PhaB)、改変 PHA 重合酵素 [PhaC1(STQK)] をコードする遺伝子を保持するプラスミドとともに大腸菌 DH5 $\alpha$  株に導入した。この組換え株を、300 mL 容三角フラスコを用いた微好氣的条件下で、2%グルコース含有 LB 培地 (100 mL) にて、30°C、48 時間振とう培養した (100 strokes/min)。合成されたポリマーの菌体内蓄積率とモノマー組成をガスクロマトグラフィー (GC) により、培養液上清の D-LA 濃度を酵素法により分析した。その結果、*ldhD* 遺伝子導入株 (D-LA 濃度は 0.13 g/L、LA 分率は 19.8 mol%) は、それを導入しなかった株 (D-LA 濃度は <0.01 g/L、LA 分率は 9.8 mol%) と比べて培養液上清の D-LA 濃度とポリマー鎖中の LA 分率が高まった。また、さまざまな大腸菌を宿主とした場合においても、*ldhD* 遺伝子導入によるポリマー鎖への LA 分率の向上が認められた。

## (3) 大腸菌を宿主とした新規乳酸ベースコポリマーの合成

乳酸ベースポリマーが広く市場に流通するためには、利用目的に応じた多様な素材の開発が求められる。そこで、本研究では、透明性を有する新規の乳酸ベースポリマーを合成することを目的とした。まず、これまでに合成されてきた P(LA-co-3HB)合成経路に、糖から脂肪酸合成経路を介して中鎖長(R)-3HA-CoA を供給する経路を構築し、P(LA-co-3HB-co-3HA)の合成を試みた。P(LA-co-3HB)合成酵素遺

伝子とともに、中鎖長(*R*)-3HA-CoA を脂肪酸合成経路から供給する(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステルゼ (PhaG) および(*R*)-3HA-CoA リガーゼの遺伝子を大腸菌 LS5218 (*fadR601*, *atoC2(Con)*) 株に導入して培養した。その結果、組換え株は、グルコースを唯一の炭素源として LA、3HB、中鎖長 3HA ユニット (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) からなる P(14.4% LA-*co*-3HB-*co*-5.9% 3HA)を合成した (蓄積率は 2.9 wt%)。

次に、3HB ユニットの除いた LA と 3HA ユニットからなる新規乳酸ベースポリマーP(LA-*co*-3HA)の生合成を試みた。P(LA-*co*-3HA)を合成するため、P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)の合成経路から 3HB 供給経路 (PhaA および PhaB) を除いた代謝制御を行った。関連酵素遺伝子を大腸菌 LS5218 株と同様に *fadR* 破壊株である CAG18497 (*fadR13::Tn10*) 株に導入して培養した結果、組換え株は LA および 3HA ユニット (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) からなる P(LA-*co*-3HA)を合成した。このポリマーを抽出し、<sup>1</sup>H-NMR 解析を行った結果、このポリマーのモノマー組成は P(92.0% LA-*co*-3HA)であることがわかった。<sup>13</sup>C-NMR 解析の結果、LA-3HA 連鎖を確認した。抽出したポリマーからソルベントキャストフィルムを作製すると、P(92.0% LA-*co*-3HA)は透明性を有していた。さらに、動的機械熱分析 (DMTA) の結果、P(92.0% LA-*co*-3HA)の貯蔵弾性率 (*E'*) は室温で約 2.3 GPa であり、PLA と同等な素材であることが明らかとなった。

以上より、本博士論文研究では、*Lb. acetotolerans* HT の LDHs 遺伝子 (*ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2*) とそれらの周辺領域の塩基配列を決定した。そして、HT 株の *ldhD* 遺伝子を大腸菌に導入し、乳酸ベースポリマーP(LA-*co*-3HB)を合成した結果、組換え株が合成したポリマー鎖中の LA 分率は向上した。さらに、脂肪酸合成経路を介して、グルコースを唯一の炭素源とした新規モノマー組成からなる乳酸ベースポリマーP(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)および P(LA-*co*-3HA)の生合成にはじめて成功した。