

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 後藤 早希

乳酸は、食品、医薬品、化学工業などの分野において幅広く利用されており、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生分解性プラスチックの一つ、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のが好ましい。さらに、D-乳酸生産に利用できる菌は少ない。そこで、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により合成される。一方、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は多くの微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に合成・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おらず、本研究は、実用的な高性能乳酸ベースポリマーの合成を目指したものであるといえる。

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皆無である。そこで、HT 株の推定 D-LDH 遺伝子 (*ldhD*) および L-LDH 遺伝子 (*ldhL1* および *ldhL2*) をクローニングした。これらの推定遺伝子を大腸菌で異種発現させた結果、*ldhD* あるいは *ldhL1* 遺伝子を導入株はそれぞれ、D-乳酸、L-乳酸を生産したが、*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-LDH および L-LDH の機能を有することを明らかにした。一方、*ldhL2* 遺伝子には、その機能は見出されなかった。

次に、*Lb. acetotolerans* HT の *ldhD* 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を行った。大腸菌には内在性 D-LDH 遺伝子 (*ldhA*) が存在し、それは嫌気条件下にて発現が高まり、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 は好气的条件下にて生成量が増加する。したがって、好気条件下においても 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)共重合ポリエステルを生合成を行った。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 β -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 α 株に導入した。この組換え株を、微好気条件下で、2%グルコース含有 LB 培地にて、30°C、48 時間振とう培養 (100 strokes/min) した結果、*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 D-LA 生産量とポリマー鎖中の LA 分率が高まった。続いて、ポリマー生合成関連酵素遺伝子を保持するプラスミド pTV118NpctC1(STQK)ABdP_{Re} に HT 株の *ldhD* 遺伝子を挿入したプラスミド pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP_{Re} を構築し、大腸菌 DH5 α 株、LS5218 株および XL1-Blue 株に導入した。その結果、pTV118NpctC1(STQK)ABdP_{Re} を導入した組換え株が合成した P(LA-co-3HB)と比べて (LA 分率は <6.7 mol%)、pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP_{Re} を導入した組換え株が合成した P(LA-co-3HB)の LA 分率はいずれの宿主においても向上した (15.7~28.5 mol%)。したがって、外在性 *ldhD* 遺伝子の導入は、合成されたポリマー鎖中の LA 分率を向上させた。

生分解性プラスチック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、新規モノマーユニットをポリマー鎖へ導入し、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指した。これまでに合成した 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)-3-ヒドロキシアシル CoA ((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。D-LA-CoA を供給する *pct* および *ldhD* 遺伝子、(R)-3HB-CoA を供給する *phaA* および *phaB* 遺伝子、改変 PHA 重合酵素の *phaC1*(*STQK*) 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 チオエステラーゼ (PhaG) および(R)-3HA-CoA リガーゼの遺伝子は大腸菌 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 (C₈-C₁₂) からなる新規乳酸ベースポリマー P(14.4% LA-co-3HB-co-5.9% 3HA) を合成した (蓄積率は 2.9 wt%)。この乳酸ベースポリマーを菌体から抽出し、¹H-NMR 解析を行った結果、このポリマーのモノマー組成は P(19.7% LA-co-3HB-co-5.4% 3HA) であることがわかった。また、¹³C-NMR 解析の結果、LA-3HB および 3HB-3HA 連鎖が見られたが、LA-3HA 連鎖を確認することはできなかった。このポリマーの示差走査熱量計 (DSC) による分析の結果、ガラス転移点 (*T_g*) は 6.7°C、融解エンタルピー (ΔH_m) は 19.6 J/g であり、融点 (*T_m*) は 2 つみられた (124°C と 147°C)。しかしながら、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) による分析の結果、2 つのピークは見られず、このポリマーの重量平均分子量 (*M_w*) は 31.7 万、数平均分子量 (*M_n*) は 5.3 万、多分散度 (*M_w*/*M_n*) は 5.9 であることがわかった。このポリマーは、LA と 3HA 分率がいずれも 3HB 分率と比べて低いため、¹³C-NMR によって LA-3HA の連鎖を確認することができなかったと考えられた。そこで、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-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。関連酵素遺伝子は大腸菌 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 (C₈-C₁₂) からなる P(70.4% LA-co-3HA) を合成した (蓄積率は 2.9 wt%)。さらに、嫌気度を高めて培養すると、LA 分率がさらに向上した P(74.4% LA-co-3HA) が合成された。これを菌体から抽出し、¹H-NMR 解析を行った結果、このポリマーは P(92.0% LA-co-3HA) であることがわかった。¹³C-NMR 解析の結果、このポリマー鎖中の LA-3HA 連鎖を確認した。GPC 分析の結果、このポリマーの重量平均分子量 (*M_w*) は 2.7 万、数平均分子量 (*M_n*) は 1.4 万、多分散度 (*M_w*/*M_n*) は 2.0 であった。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、新規乳酸ベースポリマーの特性を DSC により調べた結果、融点 (*T_m*) は 157°C、ガラス転移点 (*T_g*) は 36°C、融解エンタルピー (ΔH_m) は 6.4 J/g であった。融点は化学合成の PLA (4042D, NatureWorks®) の融点 (150°C) とほぼ同じ値を示し、ガラス転移点は PLA (52°C) よりも低かったが、P(3HB) ホモポリマー (4°C) よりも高い値を示した。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 の一般的な貯蔵弾性率 (2.0-3.0 GPa) とほぼ同じであった。このことから、本研究で合成した P(92.0% LA-co-3HA) は PLA とほぼ同等な素材であることが明らかとなった。

以上より、本研究では、*Lb. acetotolerans* HT の LDH 遺伝子 (*ldhD*, *ldhL1* および *ldhL2*) を同定した。*Lb. acetotolerans* での LDH 遺伝子に関する報告はなく、本研究が初めてである。そして、HT 株の *ldhD* 遺伝子は大腸菌に導入し、乳酸ベースコポリマー 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 分率が向上した。さらに、グルコースを唯一の炭素源として、脂肪酸合成経路を介して新規モノマー組成からなる乳酸ベースコポリマー P(LA-co-3HB-co-3HA) および P(LA-co-3HA) の生合成に成功した初めての研究であった。

上記の研究は、新規乳酸ベースポリマーの生合成を行ったものであり、その成果は生分解性プラスチックの実用化へ向けた価値ある研究であるとともに、その発展に大きく寄与すると考えられる。よって、後藤早希氏の本研究は、博士 (環境共生学) の学位に相応しいものと認める。