

氏名	赤坂直紀
学位の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	乙理第62号(文部科学省への報告番号乙第361号)
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	2015年1月21日
学位論文題目	代謝改変酢酸菌を利用した機能性食酢の開発
論文審査委員	(主査) 教授 藤原伸介 (副査) 教授 松田祐介 教授 大谷清 保川清(京都大学教授)

酢酸菌は、古くから食酢醸造に用いられてきた微生物であり、人の食生活と密接に関連した身近な微生物である。自然界では、花や果実に主に生息しており、それらに含まれる糖や糖アルコールを利用して生育すると共に、酵母及び乳酸菌と共生関係を構築している。酢酸菌は、他の微生物ではあまり見られない特徴的な細胞膜結合型酸化還元酵素を多数有している。酢酸発酵は、膜結合型アルコール脱水素酵素、及びアルデヒド脱水素酵素により触媒されるエタノールを酢酸へ酸化する反応であり、これは酢酸菌の呼吸鎖に該当する。酢酸菌研究はパストゥールの発見に端を発するため長い歴史を有するものの、その研究対象は長らく、上記膜酵素の諸特性解析や、それらを介した電子伝達系の機序解明に限られていた。

近年、種々の酢酸菌のユニークな特徴を利用する事で、酢酸菌を食酢製造以外の分野に応用する試みが行われている。例えば、*Komagataeibacter xylinus* を用いた移植医療用セルロース膜の生産や *Acetobacter malorum* によるセラミド生産等がその代表例として挙げられる。また、酢酸菌はエタノールや酢酸といった他種の微生物の生育を抑制する物質の存在下で生育する。これにより、抗生物質等の高コストな選択圧や閉鎖系を用いずとも、雑菌汚染が抑えられ発酵工程管理が容易となる。こういった性質は酢酸菌が次世代の安定宿主となる可能性を示している。

Komagataeibacter europaeus は酢酸菌の中でも高いエタノール酸化能力及び酢酸耐性を有する細菌であり、物質生産の観点からも優位性は高い。近年、タイプ株のドラフトゲノム配列が決定されたが、*K.europaeus* に関する遺伝学研究の報告は限られており、その研究技術基盤は他の産業微生物に比べて立ち遅れている。

上記を踏まえ、著者は本論文において、*K.europaeus* を食酢以外の有用物質生産菌として応用する事を最終目標とし、同酢酸菌における代謝改変に必須な技術基盤の構築を目指した。さらに、それを利用した有用菌株の構築を試みた。

論文内容の要旨

本論文は、序論(第1章)、本文5章(第2章から第6章)、及び総括と展望(第7章)からなる。

第2章では、動物において種々の生理活性作用を発揮する分岐鎖アミノ酸(BCAA)を産生する変異株を、薬剤変異によるランダム変異の導入、及びそれに続くバリンの構造アナログ α -アミノ酪酸(ABA)耐性株の選抜により作出した。得られたABA_r1-56株は、野生株と比較して著量のバリン及びロイシンを培養液中に蓄積した。

第3章では、ピリミジン生合成遺伝子群の一つであるオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 *pyrE*、及びウラシル要求性を、それぞれ選抜マーカー及び選択圧とした *K.europaesus* における遺伝子破壊技術を構築した。本手法により、食酢に含まれる不快醸造香アセトインの生合成に関与する α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ遺伝子 *aldC* を破壊する事で、アセトイン生産能の著しく低下した株の構築に成功した。

第4章では、*K.europaesus* 野生株より複数の潜在型プラスミドを単離し、それらの細胞内におけるコピー数を含めた特徴付けを行うと共に、潜在型プラスミドを基とした大腸菌及び *K.europaesus* において複製可能なシャトルプラスミドを構築した。得られたシャトルプラスミドは他種酢酸菌でも複製され、比較的広い宿主域を有する事を明らかにした。

第5章では、第2章で得られた ABAr1-56株の変異点解析から、転写因子 leucine responsive regulatory protein (Lrp) をコードする遺伝子 *Kelrp* に導入されたナンセンス変異が、*K.europaesus* に BCAA 生産能を付与する決定因子である事を明らかにした。第3章において確立した遺伝子破壊技術により同様の変異を導入した株を作出したところ、ABAr1-56株と同等の BCAA 生産性を示した。このナンセンス変異により、C末端側のリガンド結合部位が欠損した変異型 *KeLrp* が産生されるため、ABAr1-56株及び *Kelrp* 破壊株は、外界の栄養状況を伝達するシグナル分子に対して非感受性である事が示唆された。また、転写量解析から、*KeLrp* は BCAA 生合成酵素遺伝子、及び排出ポンプ遺伝子の発現を制御している事を明らかにした。

第6章では、食酢がショウジョウバエ誘引効果を有すること、さらに実際に捕虫器原料として利用されていることに着目し、より効率的な捕虫器開発を目的として、*K.europaesus* の代謝改変により誘引能増強を試みた。食酢成分のうち、酢酸及びアセトインが極めて強いショウジョウバエ誘引効果を発揮する事が知られている。アセトイン合成経路は BCAA 生合成経路と中間代謝物を共有するため、両者の分岐点に位置するアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ遺伝子 *ilvC* を破壊し、BCAA 生合成を遮断する事でアセトイン高生産株を構築した。また、第5章で構築した *Kelrp* 破壊株は、アセトイン前駆体 (α -アセト乳酸) 合成を担うアセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子 *ilvIH* を高発現しており、副産物として著量のアセトインを産生した。これに加え、*Kelrp* 破壊株は微量のイソ酪酸を蓄積した。*ilvC* 破壊株及び *Kelrp* 破壊株培養液上清を用いてショウジョウバエ捕虫実験を行ったところ、*Kelrp* 破壊株上清は極めて強い誘引作用を示した。この強い誘引能は、酢酸、アセトイン、イソ酪酸、及び未同定の代謝産物の相乗効果に起因する事が示唆された。

論文審査結果の要旨

酢酸菌 *Komagataeibacter europaesus* は食酢の工業生産において広く用いられている産業上極めて重要な微生物であるが、長らく遺伝学の対象とはされてこなかった。一方、いくつかの酢酸菌は様々な機能性物質の生産菌として利用されつつある。その背景には、酢酸菌が他種の微生物にとって細胞毒性を示すエタノール及び酢酸存在下で生育可能であり、発酵工程管理が容易になる点が挙げられる。この点に関して *K.europaesus* は極めて強いエタノール及び酢酸耐性を有し、有望な物質生産のプラットフォームとなりうる。そこで本論文では、*K.europaesus* の新たな応用法を確立するべく、同酢酸菌における代謝改変のための技術基盤の構築、並びに同技術による有用菌株の作出を目指した。

本論文の重要な貢献は以下の通りである。

- (1) *K.europaesus* における、内在性遺伝子を選抜マーカーとした遺伝子破壊技術を構築した。本技術は外来遺伝子を用いない手法であり、将来的な工業生産への応用が期待される。
- (2) *K.europaesus* 潜在型プラスミドを基とした複数のシャトルプラスミドを構築した。それらプラスミドは、産業上重要な他の酢酸菌でも複製可能であり、遺伝子改変を行う上で有効なツールとなりうる。
- (3) 上記代謝改変技術により複数の有用物質生産株を構築し、*K.europaesus* の持つ、食酢製造以外の新たな

可能性を提示した。特に転写因子 *KeLrp* の部位特異的欠損により得られた遺伝子破壊株は、野生株と比較して著量の BCAA を産生すると同時に、その培養液上清は極めて強いショウジョウバエ誘引性を示した。本上清は新規誘引剤として、実用化が期待されるものである。

本論文の内容は、既に *Applied and Environmental Microbiology*、*Journal of Bioscience and Bioengineering*、及び日本生物工学会誌に計4編の学術論文として公表されている。さらに、3編の解説・総説が発行されている。著者は日本生物工学会や米国微生物学会 ASM conference 等国内外の学会で、本論文の内容を5回にわたり自ら発表している。審査委員会は本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容と用いた手法について、十分な理解と関連する分野における学識を有し、また将来の研究における遂行能力を持つ事を確認した。更に著者は、筆頭著者として査読付き英語論文の執筆、並びに国際学会での発表も経験しており、十分な英語能力を持つと判断した。

以上の事により、審査委員会は本論文の著者が博士（工学）の学位を授与されるに足る十分な資質を有するものと判定する。