

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 工 学 )	氏名	岩 崎 祐 樹
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
Development of the genetic engineering system in <i>Moorella thermoacetica</i> and application to production of useful materials ( <i>Moorella thermoacetica</i> における遺伝子組換え技術の開発及び有用物質生産への応用)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	中島田 豊	
審査委員	教 授	加藤 純一	
審査委員	教 授	秋 庸裕	
審査委員	産業技術総合研究所主任研究員	村上 克治	
〔論文審査の要旨〕			
<p><i>Moorella thermoacetica</i> は至適生育温度 55-60°C の好熱性細菌で、糖および H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> から酢酸のみを生産する。本菌は、再生可能資源として糖だけではなく、太陽光や風力発電などの再生可能エネルギーから得られた電力から生産可能な H<sub>2</sub> を基質として、CO<sub>2</sub> を炭素源とする有用物質の生産宿主として期待されている。しかし、本菌はほぼ酢酸のみしか生産しないため、他の有用物質生産には遺伝子組み換えによる分子育種が必要とされていた。しかし、本菌の遺伝子組換え技術は報告されていなかった。申請者である岩崎祐樹氏は、本学位論文において、<i>M. thermoacetica</i> の遺伝子組み換え技術の開発に取り組みこれを達成し、さらに開発した組換え技術を駆使し、有用物質生産菌の効率的な分子育種に関わる基礎的検討として酢酸生成経路を遺伝子工学的解析し、外来遺伝子発現による生分解性プラスチック原料である乳酸の生産性向上に酢酸生成酵素遺伝子破壊が効果的であることを明らかとした。</p> <p>申請者は、遺伝子組換え技術を効率的に開発するために、ゲノム情報が公開されている <i>M. thermoacetica</i> ATCC39073 株を用いた。ATCC39073 株の持つ制限修飾系を回避するメチラーゼ遺伝子を組み込んだ大腸菌宿主を用いて調整した遺伝子破壊プラスミドを用いることで、orotidine-5'-phosphate decarboxylase 遺伝子 (<i>pyrF</i>) を破壊して得られた 5-fluoroorotic acid 耐性を示すウラシル要求性変異株 (<i>dpyrF</i>) を得た。この <i>dpyrF</i> 株を宿主、<i>pyrF</i> を遺伝子マーカーとして外来遺伝子の導入に成功した。そこで、<i>Moorella</i> 属細菌を宿主とした物質生産のモデルケースとして、<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> ATCC33223 由来の乳酸脱水素酵素遺伝子 (<i>T-ldh</i>) を <i>dpyrF</i> 株の染色体上に導入した。その結果、フルクトースを炭素源として本来野生株が生産し得ない乳酸が最大で 6.8 mM 得られた。</p> <p>次いで、複数回の遺伝子導入・破壊を可能とすることを目的として、新たな選択マーカー遺伝子として <i>Moorella</i> 属細菌で使用可能な抗生物質耐性遺伝子を探索した。好熱性菌での成功例がある <i>Streptococcus faecalis</i> JH2-15 由来の耐熱性カナマイシン耐性遺伝子 (<i>kanR</i>) をマーカー遺伝子候補とし、ATCC39073 株由来グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (G3PD) のプロ</p>			

モーター及び SD 配列を付加して *dpyrF* 株の染色体上に挿入した。得られた *kanR* 挿入株および野生株をカナマイシンを含む培地で培養したところ、*kanR* 挿入株のみ増殖することが確認されたことから、*kanR* をマーカー遺伝子として利用できることが示された。

*M. thermoacetica* は、糖および  $H_2$ - $CO_2$  を基質とした培養において酢酸のみを生産する。従って遺伝子組み換えにより酢酸生産を抑えることができれば、目的生産物のみを最終産物とする発酵を簡単に行なうことができると考えられた。しかしながら、酢酸生合成に関わるホスホトランスアセチラーゼをコードしている遺伝子が未知であった。そこで本研究ではホスホトランスアセチラーゼをコードしている遺伝子の同定を行った。ATCC39073 株のゲノム情報から、酢酸生産に関わっていると推定される遺伝子として、ホスホトランスアセチラーゼ活性を有すると報告されている酵素 PduL をコードしている 2 遺伝子 (*pduL1*, *pduL2*) を選択した。この遺伝子産物を大腸菌を用い高発現した後、精製し活性を測定したところ、両遺伝子ともホスホトランスアセチラーゼ活性を有していた。そこで、両遺伝子を破壊すると同時に *T-ldh* を導入することで、フルクトースを炭素源として酢酸から乳酸に代謝の流れが変化するか検討した。その結果、*pduL2* 単独破壊株において、酢酸の収率が 0.71 mol/mol、乳酸の収率が 1.04 mol/mol となり、野生株の酢酸収率 2.32 mol/mol と比較して、酢酸生産量が減少し、乳酸生産量が増加していることがわかった。さらに、*pduL1* と *pduL2* の 2 重破壊株においては、酢酸収率が 0.04 mol/mol、乳酸収率が 1.71 mol/mol となり、酢酸生産能がほぼ無くなり、生産物の大部分が乳酸となることがわかった。また、*pduL2* 単独破壊株に *pduL2* を再導入することに、酢酸収率が 1.98 mol/mol、乳酸収率が 0.25 mol/mol となり、酢酸生産能が回復することが確認された。これらのことから、それぞれの *pduL*、特に *pduL2* は *M. thermoacetica* において酢酸生産に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、本菌は酢酸生合成経路の 2 遺伝子を破壊し、目的有用産物生産系を導入するだけで、目的産物をほぼ単独で生産できる優れた有用物質生産宿主であることも明らかとなった。

以上の内容は学術的価値が高く、博士論文としてふさわしいと判断し、本論文著者は博士(工学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。