

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（理学）	氏名	高橋史員
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Study on long-chain alcohol utilization pathways in the glycolipid-producing yeast <i>Starmerella bombicola</i> (糖脂質生産菌 <i>Starmerella bombicola</i> における長鎖アルコール資化経路に関する研究)			
論文審査担当者			
主査	教授	山本	卓
審査委員	教授	井出	博
審査委員	教授	坂本	敦
審査委員	教授	泉	俊輔
審査委員	講師	佐久間	哲史
<p>アルキルポリグリコシド（APGs）は、高い起泡性と肌への非侵襲性を併せ持つ安心・安全な優れた洗浄剤であり、各種の洗剤等に配合されている。APGsの工業的生産は、主に糖とアルコールを原料とした化学合成により行われているが、原料アルコールを多量に必要とし、高温・高圧下での反応を行うために原料グルコースが変性してしまうなどの問題がある。このような状況から、より効率の高い生産方法を開発するため、微生物を用いた常温、常圧でのAPGsの製造技術が検討されてきた。バイオサーファクタントとして有用なソホロリピッドの生産酵母である <i>Starmerella bombicola</i> を糖と2級アルコールを含有する培地で培養すると、生産物としてAPGsの一種であるアルキルソホロシドを生成することが知られている。しかしながら、安価な1級アルコールを原料とした場合、生産物収率が著しく減少することが知られている。そこで本研究では、微生物による常温・常圧下での高収率なAPGs製造法を構築するため、これまでに不明であった <i>S. bombicola</i> のアルコール資化経路の解明を行うことを目的とした。</p> <p>第1章では、<i>S. bombicola</i> における1級アルコール資化経路の解明と、長鎖アルコール酸化酵素 <i>FAO1</i> 遺伝子破壊株による新奇アルキルポリグリコシドの生成と物性解析を行った。微生物における長鎖アルコール代謝経路はNAD(P)⁺を電子受容体とするアルコールデヒドロゲナーゼ系、もしくは酸素を受容体とする脂肪族アルコールオキシダーゼ（fatty alcohol oxidase : FAO）経路が知られている。<i>S. bombicola</i> の1級アルコール資化経路として、ペリプラズムにFAO活性を有することが知られているが、配列情報や酵素の特性解析は報告されていない。そこでまず、<i>S. bombicola</i> のゲノム解析を行った。既知のFAOである <i>Candida tropicalis</i> FAO2 と低い相同性（35%）を示す新規な <i>FAO1</i> 遺伝子を見出した。大腸菌を用いて <i>S. bombicola</i> の <i>FAO1</i> 遺伝子を異種発現し、機能解析を行ったところ、鎖長4から16までの1級アルコールに対し酸化活性を示し、FAO活性を有することが明らかとなった。次に <i>S. bombicola</i> における栄養要求性株の選抜および形質転換系を構築し、相同組換えによる <i>FAO1</i> 遺伝子の破壊を試みた。その結果、<i>FAO1</i> 遺伝子欠失株</p>			

(Δ FAO1) は、1 級アルコールに対する資化能および増殖能を失うことが明らかとなった。これらの結果から、*S. bombicola* における 1 級アルコールの主たる代謝経路は、FAO1 による酸化であることが示唆された。さらに、 Δ FAO1 株を用いてグルコースと 1-テトラデカノールを反応させた結果、1-テトラデカノール骨格から成るソホロリピッド生産能の向上と、未知化合物が得られた。該化合物を精製後、LC-MS 及び加水分解後の GC-MS によってアルキル基の構造を解析したところ、未知化合物を構成するアルキル基は 1,13-テトラデカンジオールもしくは 1,14-テトラデカンジオールであり、これらジオールに糖鎖が 4 つ付加した新規な糖脂質であることが示唆された。両末端ジオールの配糖体化合物はこれまで報告がほとんど認められず、新規性が高いと考えられた。

第 2 章では、2 級アルコールの代謝資化経路の解明を行った。 Δ FAO1 株は 2 級アルコールを資化できないため、FAO1 は 2 級アルコール代謝経路においても主たる酸化反応として寄与すると考えられる。しかしながら FAO1 は 2 級アルコールを基質としてほとんど利用しないため、アルコール分解における初発酸化段階は、2 級アルコール基の酸化ではないと考えられた。そこで、 Δ FAO1 株において 2 級アルコールおよびグルコースを基質として培養したところ、 ω 末端、 ω 末端が水酸化されたジオール型の糖脂質が得られた。また、ソホロリピッド合成に寄与する糖転移酵素である *UGTA1* 遺伝子を欠損させると、上記糖脂質は消失し、 ω 末端、 ω 末端ジオールの蓄積が認められた。これらの結果から、*S. bombicola* において、2 級アルコールは ω 末端の水酸化を受けた後、FAO1 により酸化され、 β 酸化経路を利用して資化されると考えられた。

以上の結果から、糖脂質生産菌である *S. bombicola* において 1 級アルコール酸化酵素 FAO1 を同定した。FAO1 は本菌において長鎖アルコール代謝経路に大きな寄与を示すことを証明し、*FAO1* 遺伝子破壊株では投入されたアルコールを効率よく配糖体として変換できることが示された。これらの研究成果は、*S. bombicola* におけるアルコール代謝経路の解明に重要な知見をもたらすだけでなく、新たな配糖体、糖脂質、両末端ジオールの合成法を示す重要な研究として高く評価される

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Identification of the fatty alcohol oxidase FAO1 from *Starmerella bombicola* and improved novel glycolipids production in an FAO1 knockout mutant.

Fumikazu Takahashi, Kazuaki Igarashi and Hiroshi Hagihara.

Applied Microbiology and Biotechnology 100: 9519-9528 (2016)

参考論文

Increased dipicolinic acid production with an enhanced spoVF operon in *Bacillus subtilis* and medium optimization.

Fumizazu Takahashi, Nobuyuki Sumitomo, Hiroshi Hagihara and Katsuya Ozaki.

Biotechnology and Biochemistry 79: 505-511 (2015)

Characterization of a novel glucosamine-6-phosphate deaminase from a hyperthermophilic archaeon.

Takeshi Tanaka, Fumikazu Takahashi, Toshiaki Fukui, Shinsuke Fujiwara, Haruyuki Atomi and Tadayuki Imanaka.

Journal of Bacteriology 187: 7038-7044 (2005)