

審査の結果の要旨

氏名 宅見 和浩

本論文は、微生物における細胞内システイン濃度の制御機構に関する生化学的研究、並びにシステインの発酵生産に関する応用微生物学的研究をまとめたものである。システインは世界市場が年間約 3,500 トンと、各種アミノ酸の中では比較的大きな市場を持つアミノ酸であり、医薬品、食品、化粧品、工業用など幅広い用途で用いられている。その中でも医薬品、食品、化粧品においてはシステインを含む製品が人体に直接接触することから、現在主流の製法である人毛や羽毛といった動物原料からの抽出法によって製造されるシステインに対して抵抗が大きく、動物由来ではないシステインが強く求められている。動物由来の成分を含まない製品の製造方法としては発酵法が代表的なものであり、実際、多くの医薬品、食品、化粧品用アミノ酸は発酵法により製造された製品が市場に出回っている。しかしながら、システインの発酵生産は、細胞への毒性や複雑な代謝のレギュレーションなどの影響により非常に困難であり、効率的な発酵生産方法の開発に十分な余地がある。本研究は、システイン耐性に関与する遺伝子を同定し、細胞内のシステイン濃度を制御するシステムの一部を解明するとともに、システインの発酵生産への応用を試みたものである。本論文は 5 章から成り、第 1 章は序論、第 2、3、4 章が本論、第 5 章は総括と今後の展望である。

第 2 章「*Pantoea ananatis* におけるシステイン耐性関連遺伝子の同定およびシステイン発酵への応用」では、システイン耐性を指標に、*P. ananatis* のゲノムライブラリーから新規システインデスルフィドラーゼ (cysteine desulfhydrase; CD) をコードする *ccdA*、および新規排出ポンプをコードする *cefA*、*cefB* を選抜、同定した結果が述べられている。*ccdA*、*cefA* の両遺伝子は、それぞれ *ccdR*、*cefR* という転写調節因子を介し、システインにより迅速かつ強力に誘導されることが明らかにされた。特に *ccdA* は、*P. ananatis* においてシステインにより誘導される唯一の、かつ主として機能する CD であり、*ccdA* を欠損した株では CD 活性がほぼ消失することが示された。このことから、複数の CD 遺伝子を持つ *Escherichia coli* に比べ、*P. ananatis* をシステイン発酵生産の宿主として用いることには大きなメリットがあると述べられている。実際、*ccdA* を欠損することにより、また *cefA*、*cefB* を遺伝子増幅させて排出能を強化することにより、システインの発酵生産にポジティブな影響が得られることを明らかにしている。

第 3 章「*Escherichia coli* におけるシステイン耐性関連遺伝子の同定およびシステイン発酵への応用」では、第 2 章と同様のスクリーニングを *E. coli* のゲノムライブラリーを

用いて行った結果が述べられている。スクリーニングの結果、既知の排出ポンプ *eamA* とともに、システインデスルフィダーゼ (cysteine desulfidase) をコードする遺伝子と相同性を持つ *yhaM* が選抜、同定された。*yhaM* は、転写調節因子を介してシステインの添加に対して非常に速やかに転写が誘導される、システイン誘導型のシステイン分解酵素をコードしており、欠損によりシステイン生産量が増加することが明らかにされている。

第4章「*Pantoea ananatis* を用いたシステインの発酵生産」では、第2章で同定された *ccdA*、*cefA* および *cefB* のシステイン生産への応用を検討した結果が述べられている。前半部では *P. ananatis* を宿主とし、フィードバック阻害耐性型の鍵酵素や、システイン排出因子、硫酸根・チオ硫酸根の取り込み因子を強化したシステイン生産基本株を用い、生合成経路上における律速点を探索した。その結果、システイン生合成の最終ステップである *O*-アセチルセリンと硫化物からシステインへの反応を触媒する酵素 *O*-アセチルセリンスルフヒドリラーゼ *B* をコードする *cysM* が律速点であることを明らかにしている。しかし、*cysM* の発現強度を一定レベル以上強化するに従い、生産量が低下する現象が見出された。原因を検討した結果、本現象は、細胞内システイン濃度の上昇に伴って *ccdA* が誘導されることにより、細胞内で合成されたシステインが速やかに分解されることに起因すると結論づけている。後半部では、細胞内システインの分解を回避し、システイン生産性の向上を目指した研究について述べられている。*ccdA* 欠損による分解の回避、もしくは *cefA*、*cefB* の過剰発現による菌体内システインの排出強化により、システイン生産量が大きく増加し、最大 2.2 g/L のシステインが蓄積した。これにより、これまでに報告されている *E. coli* を宿主としたシステイン生産菌とほぼ同等の力価を持つ生産菌を、*P. ananatis* にて構築することに成功している。

第5章「総括」では、本博士論文が総括されるとともに、得られた知見の学術研究および産業上の利用可能性についての今後の方向性が議論されている。

以上、本研究はシステイン耐性を付与する遺伝子の同定を端緒として、微生物における細胞内システイン濃度の制御機構の一端を解明するとともに、得られた因子をシステイン発酵生産へ応用できることも明らかにしたものである。これらの研究成果は、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。