

## 審査の結果の要旨

氏名 松原 寛敬

酵素の応用は人類の歴史上、紀元前数千年前から行われていたが、産業としての歴史は浅い。一方で、現代においては SDGs の観点からも注目される成長著しい産業分野である。産業化初期には動物由来酵素や植物由来酵素の応用が主であったが、現在では種々の理由から微生物酵素の応用が主流となっている。さまざまな利点をもつ微生物酵素の応用において、もっとも大きな課題の 1 つが酵素生産菌株作製のための伝統的な変異育種に多大な時間と労力を要することである。本論文は、酵素産業界で用いられている現役工業株の解析・改変を通じてこの課題の解決を試みた研究結果をまとめたものであり、研究背景について記述した序論、本論 5 章および総合討論によって構成されている。

序論では酵素応用の歴史をまとめ、その中でも現在、微生物酵素の応用が主流となっている背景と理由が記されている。また、研究対象である *Bacillus amyloliquefaciens* LA 株の特徴について記されている。

本論第 1 章では、形質転換困難な株として報告されていた *B. amyloliquefaciens* の形質転換法の確立について記されている。特徴的な 2 層再生培地の設定と、プロトプラスト作製・形質転換の諸条件を最適化することによって、バッチあたり従来比 10,000 倍程度の形質転換体が得られる改良形質転換法が確立された。

第 2 章では、開発した改良形質転換法を用いて、のべ 97 種の酵素・タンパク質遺伝子を保持するプラスミドを LA 株に導入し、異種タンパク質分泌生産について調べた結果が述べられている。分泌生産成功率は導入遺伝子の機能に依存している可能性が示され、特に糖質関連酵素の分泌生産成功率は近縁・遠縁由来にかかわらず、4 割以上であることが示された。

第 3 章では LA 株での酵素分泌生産量の増強検討結果が記されている。第 2 章で述べた実験で分泌生産量が最大であった *Bacillus circulans* 由来  $\beta$ -アミラー

ゼ (BAF) に関しては、その遺伝子をゲノム上に組み込むことで分泌生産量のばらつきが少なくなり、生産量も約 1.3 倍となることが示された。また、プロモーター、シグナルペプチド配列、ターミネーターをすべて LA 株  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (*amyA*) 由来のものを用いると、大腸菌や枯草菌で遺伝子クローニングができないという問題を、PCR を用いた手法により *in vitro* で構築したプラスミドを直接 LA 株に導入することで解決した。これにより、従来型発現プラスミドでは不可能だった *Chryseobacterium proteolyticum* 由来 protein glutaminase mature region (mPG) の分泌生産に成功し、分泌生産量が少なかった *Cellulosimicrobium aquaile* 由来  $\alpha$ -アミラーゼ (AMT) の増産にも成功している。

第 4 章では、歴代育種株菌のゲノム配列の決定と比較解析を行っている。8 代にわたる LA 歴代育種株シリーズに総数で 2,816 箇所にあつた変異が入っていることを明らかにし、そのうちナンセンス変異あるいはフレームシフト変異である 297 箇所を選抜し、さらに育種株系統を考慮した絞込みを行うことで、64 遺伝子を酵素生産性増強にかかわる遺伝子候補として選抜している。

第 5 章では、第 4 章で見出された 64 遺伝子の破壊が試みられ、取得できた 24 遺伝子の単独遺伝子破壊株の培養評価の結果が記されている。もっとも酵素生産性増強効果が高かったのは No. 30 と名付けた遺伝子の破壊株であり、その効果は内因性の  $\alpha$ -アミラーゼの分泌生産量を約 2.3 倍に向上させるのみならず、外来性の酵素遺伝子を発現させた際の分泌生産量を、mPG で約 5 倍、AMT で約 5.6 倍増強させる効果をもつことが示された。この効果は遺伝子相補株で消失したため、酵素生産性増強効果は No. 30 遺伝子破壊によることが示された。

総合討論では、これまでの研究を総括するとともに、残る変異点の評価方法としてゲノムシャッフリング系が機能する可能性を示し、今後の更なる高生産要因の特定とその応用について論じられている。

以上、実用化されている工業用酵素生産株を用いてその高生産要因の 1 つを同定するに至った本研究の成果は、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。