

## 論文内容の要旨

### 論文題目

### Study of microbial metabolism based on efficient utilization of non-food competing algal biomass

(食糧と非競合な藻類バイオマスの微生物による効率的代謝に関する研究)

土井秀高

#### 序

微生物発酵は、バイオエタノール、アミノ酸、有機酸などの工業生産の方法として、我が国を中心に発展してきた。しかし、その原料がサトウキビ、トウモロコシといった食糧由来であるため、世界的な人口増加に伴う食糧不足を考慮すると、非食植物、とりわけ大量栽培可能な藻類を発酵原料とすることが期待されていた。微細藻類に最も著量に含まれるバイオマスは脂肪酸であり、褐藻類に最も著量に含まれるバイオマスはアルギン酸であるが、これらは従来の糖系原料と比較して水に難溶で、分解、資化、発酵が困難であることが知られている。そこで、本研究では、脂肪酸、アルギン酸の微生物による分解代謝機構に着目し、その機構を明らかにしたうえで、合成生物学的に微生物を改変し、脂肪酸、アルギン酸の分解代謝を効率化して物質生産に貢献することを目指した。

#### 結果と考察

##### 大腸菌 (*E. coli*) による脂肪酸代謝のボトルネック解析

脂肪酸は大量生産が検討されている微細藻類の主成分を占めるが、産業用に用いられる微生物の代謝の効率が悪いという課題があった。そこで、本研究では、大腸菌を用いて脂肪酸代謝のボトルネック解析と高効率化を検討した。その結果、過酸化水素排出に寄与することが報告されている *oxyS* を過剰発現させたところ、菌体内過酸化水素濃度の低下に伴い、有意な生育速度の向上と到達菌体量の向上が見られた(図 1)。脂肪酸を炭素源とする大腸菌を用いた L-リジン生産培養においては、抗酸化分子チオ尿素の添加より菌体内過酸化水素濃度の低下がおこり、培養時間の有意な短縮と到達菌体量および L-リジン蓄積の増加が見られた。この表現型はグルコースを炭素源とした培養では見られなかった(表 1)。以上から、脂肪酸代謝時には大腸菌の脂肪酸分解経路である $\beta$ 酸化経路から発生する過酸化水素がボトルネックとなることが示唆された。そして、過酸化水素ストレスを低減させることによって大腸菌の脂肪酸代謝を促進し、有用物質の生産能を向上させることが示された。

## アルギン酸資化新種微生物 *Vibrio algivorus* の同定

大型藻類の褐藻類に含まれるアルギン酸は分子量 300,000 を超える高分子であり、大腸菌が分解、代謝できない分子である。そこで、環境中からアルギン酸を分解、資化可能な微生物の単離を試みた。その結果、褐藻類を捕食しているサザエ (*Turbo cornutus*: 日本海能登半島沖で採集) 消化管からアルギン酸またはアガロースを単一炭素源として分解、資化可能な微生物株を単離し、SA2 株と命名した。SA2 株の 16S rRNA 遺伝子をはじめとするハウスキーピング遺伝子の Multi Locus Sequence Analysis (MLSA, 図 2)、SA2 株の生理性状、ゲノム DNA を用いた近縁種との DNA-DNA ハイブリダイゼーションを用いたゲノム比較解析の結果(表 2)から、SA2 株は新種微生物株 *Vibrio algivorus* SA2<sup>T</sup> (= DSM 29824<sup>T</sup> = NBRC 111146<sup>T</sup>) 株として新種認証された。

## *Vibrio algivorus* の菌体外アルギン酸高分子分解酵素 AlyB の同定とアルギン酸資化経路遺伝子群の大腸菌での機能発現

*Vibrio algivorus* SA2<sup>T</sup> 株の細胞外のアルギン酸の分解機構と分解されたアルギン酸の資化経路遺伝子は全くの未知であった。そこで、新規細胞外多糖類分解酵素スクリーニング系を構築し、スクリーニングを行った。その結果、*Vibrio algivorus* SA2<sup>T</sup> 株のゲノム中から、細胞外アルギン酸を分解できる酵素 AlyB を同定した(図 3)。AlyB を大腸菌で発現したところ、N 末端のシグナルペプチド (SP) 依存的に培養上清と菌体表層に分泌され (図 4)、水に難溶なアルギン酸を低分子化し可溶化することができた (図 5)。さらに、AlyB に加え、*Vibrio algivorus* SA2<sup>T</sup> 株ゲノム中のアルギン酸代謝遺伝子のホモログ遺伝子 7 遺伝子 (*alyB*, *alyD*, *oalA*, *oalB*, *oalC*, *dehR*, *toaA*) (図 6) を大腸菌野生型株に形質導入し発現させたところ、可溶化したアルギン酸を単一炭素源とする最少培地で、可溶化したアルギン酸の資化による生育が見られた(図 7)。これらの結果から、*Vibrio algivorus* のアルギン酸の分解、代謝機構が明らかになるとともに、これら遺伝子の導入より微生物にアルギン酸分解能力を付与することが可能となった。

## *Vibrio algivorus* のアルギン酸資化経路遺伝子群の大腸菌での機能発現によるアルギン酸からの有用物質 L-リジン発酵生産の成立

L-リジンを含むアミノ酸を、アルギン酸を炭素源として微生物発酵したという報告はされていない。そこで、本研究で示唆された *Vibrio algivorus* のアルギン酸の分解、代謝機構が新規有用物質の生産に利用できるかを調べる目的で、有用物質の L-リジンを生産する大腸菌 AJIK01 株(NITE BP-01520 株)を用いて、アルギン酸を炭素源とする L-リジンの発酵生産を試みた。AJIK01 株はグルコースから L-リジンを発酵生産する能力を持つ菌株である。前述の *Vibrio algivorus* のゲノム由来のアルギン酸代謝遺伝子候補の 7 遺伝子 (*alyB*, *alyD*, *oalA*, *oalB*, *oalC*, *dehR*, *toaA*) を AJIK01 株に異種発現した菌株(D3000 株と命名)を構築し、可溶化したアルギン酸を単一炭素源とする液体培地で培養を行った。その結果、D3000 株は可溶化したアルギン酸の資化による生育と、培地中への L-リジンの有意な蓄積を示した(図 8)。これらの結果から、*Vibrio algivorus* のゲノム由来の *alyB*, *alyD*, *oalA*, *oalB*, *oalC*, *dehR*, *toaA* がアルギン酸の分解、代謝に寄与していることをさらに強く示唆すると共に、大腸菌によるアルギン酸を炭素源とした L-リジン発酵が成立することを初めて示した。

## 結論と展望

本研究では食糧と競合しない藻類バイオマスである脂肪酸とアルギン酸の利活用について、合成生物学と微生物分類学のアプローチを通じ以下の結果を得た。

- 1) 過酸化水素濃度低減は脂肪酸の代謝促進と有用物質生産の促進に有用であった。
- 2) アルギン酸またはアガロースを分解、資化可能な新種微生物 *Vibrio algivorus* を発見し、登録した。
- 3) 大腸菌を用いた新規細胞外多糖類分解酵素スクリーニング系を確立した。
- 4) 精製濃縮工程不要で大腸菌で異種発現させるだけで簡便に細胞外の高分子アルギン酸を分解、可溶化できる *Vibrio algivorus* 由来の AlyB 酵素を発見した。
- 5) *Vibrio algivorus* のゲノム中の *alyB*, *alyD*, *oalA*, *oalB*, *oalC*, *dehR*, *toaA* がアルギン酸の分解、代謝に寄与していることを明らかにした。
- 6) アルギン酸を炭素源とした L-リジン発酵に成功した。

今後は、本研究で得られた遺伝子群の発現のファインチューニングによる発酵成績の向上や、より大きな工業化に近いスケールでの分解、発酵プロセスの構築を行うことにより、食糧と競合しない藻類バイオマスを将来の有用物質生産に応用することが期待される。

発表論文：

Doi H et al., (2014) *Appl Microbiol Biotechnol*, 98:629-639.

Doi H et al., (2016) *Int J Syst Evol Microbiol*. 66:3164-3169.

Doi H et al., (2016) *Appl Microbiol Biotechnol*, doi:10.1007/s00253-016-8021-7, ahead of print.

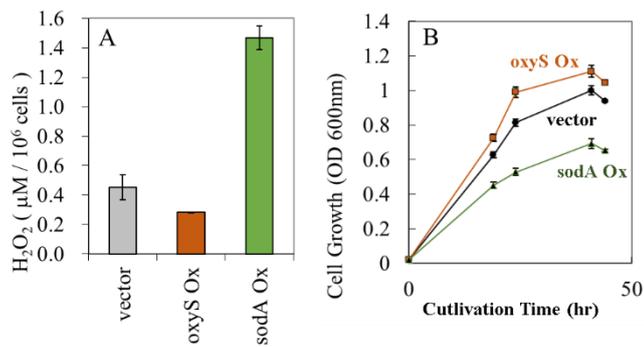


図 1. *oxyS* の過剰発現による菌体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の減少と菌体生育の増加

表 1. 過酸化水素除去剤添加によるグルコース代謝と脂肪酸代謝への影響

Supplied carbon source	Antioxidant	CT (hr)	Cell Growth (OD 600nm)	L-Lysine Accumulation (g/L)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM/10 <sup>6</sup> cell)
Glucose 10g/L		16.0	5.3	4.7	0.14
Glucose 10g/L	Thiourea 1mM	16.0	5.3	4.7	0.11
Sodium Oleate 10g/L		41.5	6.8	4.8	0.17
Sodium Oleate 10g/L	Thiourea 1mM	33.0	7.3	5.2	0.11

表 2. SA2<sup>T</sup> 株の生理性状解析と DDH 解析の結果

Species, Type strain	Utilization of:			Relatedness of DDH to SA2 <sup>T</sup> genome (%)
	Agarose	Alginate	Sucrose	
<i>Vibrio alginivorus</i> SA2 <sup>T</sup>	Positive	Positive	Negative	100
<i>Vibrio littoralis</i> DSM17657 <sup>T</sup>	Negative	Positive	Negative	44.7
<i>Vibrio rumoiensis</i> DSM19141 <sup>T</sup>	Negative	Negative	Positive	37.5

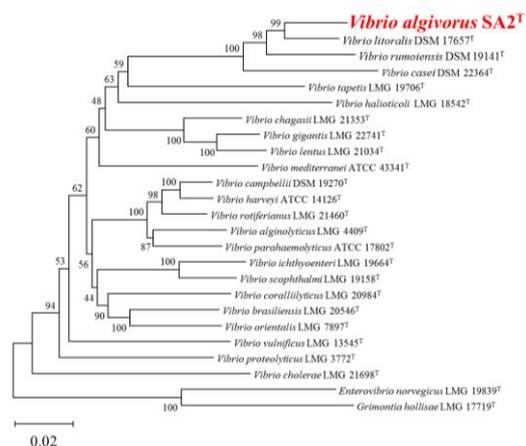


図 2. *Vibrio alginivorus* 近縁種 MLSA 分子系統樹 (*atpA*, *pyrA*, *recA*, *rpoA*, *rpoD*, 16S rRNA)

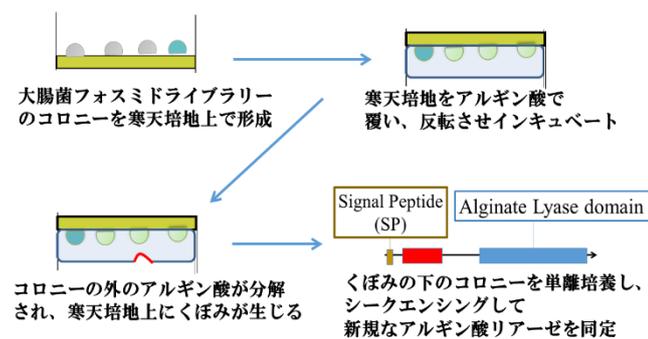


図 3. 新規細胞外粘性多糖類分解酵素のスクリーニング

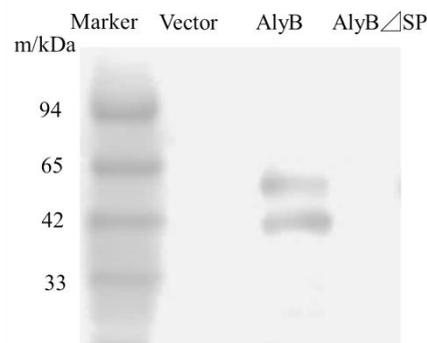


図 4. *V. alginivorus* 由来 AlyB の大腸菌培養上清中での検出

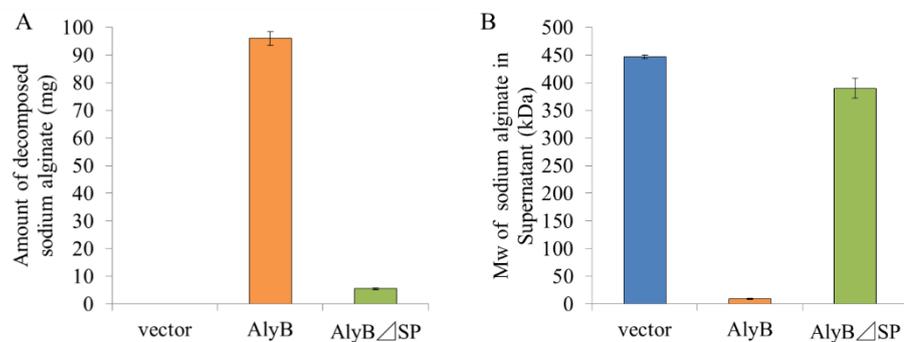


図 5. AlyB 発現大腸菌培養上清によるアルギン酸の分解

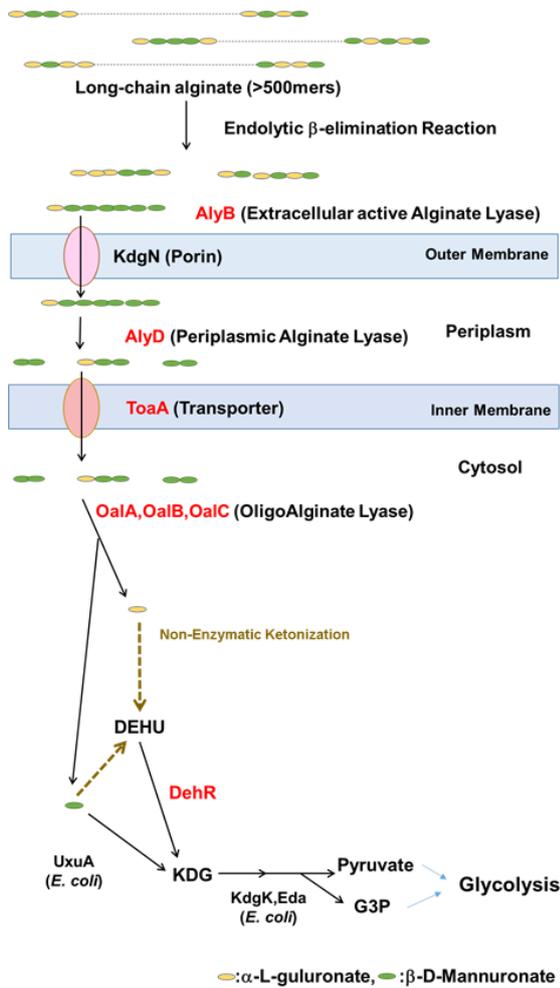


図 6. *V. alginovorius* 由来アルギン酸分解酵素と代謝経路

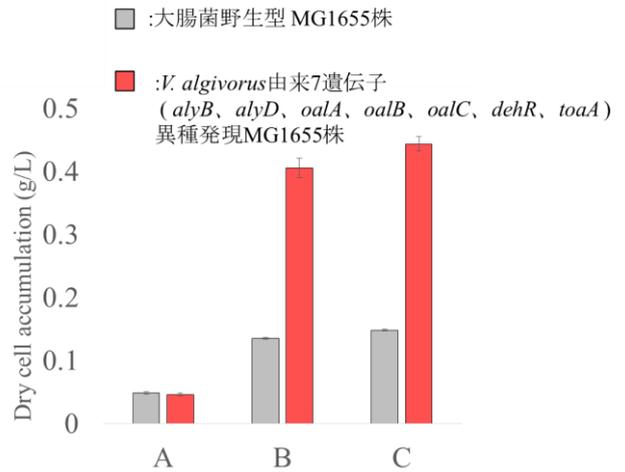


図 7. 大腸菌のアルギン酸資化依存的生育  
 A: アルギン酸無添加 B: 精製アルギン酸分解酵素 (*Flavobacterium.sp* 由来)で処理したアルギン酸を添加 C: *V. alginovorius alyB* 発現大腸菌菌体で処理したアルギン酸を添加

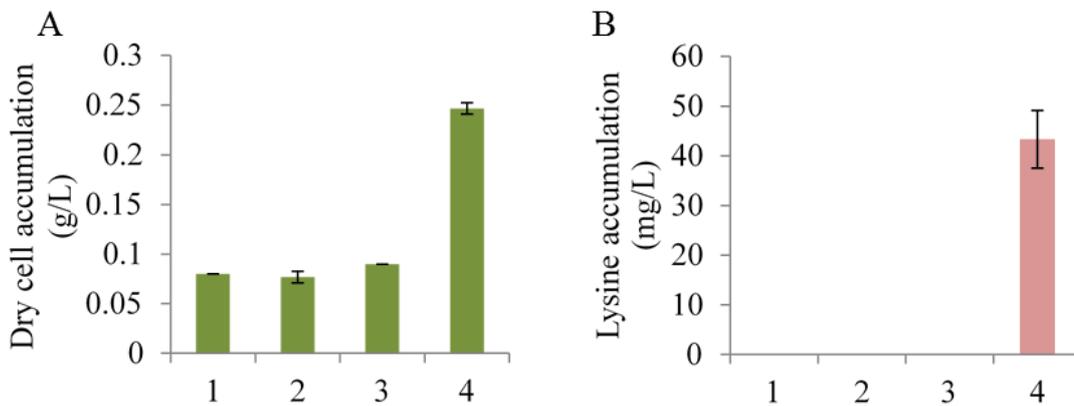


図 8. アルギン酸を炭素源とした組み換え大腸菌による L-リジン発酵の成立

A: 菌体生育 B: L-リジン蓄積

(D3000 株: *Vibrio alginovorius* 由来 *alyB*, *alyD*, *oalA*, *oalB*, *oalC*, *dehR*, *toaA* 異種発現 AJIK01 株)

1: AJIK01 株を使用し炭素源無添加条件での培養結果,

2: D3000 株を使用し炭素源無添加条件での培養結果,

3: AJIK01 株を使用し *V. alginovorius alyB* 発現大腸菌菌体で処理したアルギン酸を添加した培養結果,

4: D3000 株を使用し *V. alginovorius alyB* 発現大腸菌菌体で処理したアルギン酸を添加した培養結果