

論文審査の結果の要旨

氏名 土井 秀高

本論文は、藻類の重要なバイオマス成分である脂肪酸とアルギン酸の分解代謝について微生物を材料に研究したものである。本論文は5章からなり、第1章では、研究の背景が記されている。第2章では大腸菌中での脂肪酸代謝のボトルネックの解析結果が述べられている。第3章では、アルギン酸を効率よく分解する微生物の探索と新種 *Vibrio algivorus* SA2^T の同定について、第4章では、*Vibrio algivorus* SA2^T におけるアルギン酸分解代謝系の解析とこれを用いた、大腸菌中でのアルギン酸分解の解析について述べられている。第5章は研究全体の総括が記されている。

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、論文提出者は、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することを目指した。

まず、論文提出者は、大腸菌の試験管内進化実験を行い脂肪酸代謝のボトルネックを解析した。その結果、脂肪酸代謝のボトルネックは代謝過程で副産物として産出される過酸化水素による成長阻害であることが明らかとなった。そこで、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。また、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。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 β 酸化経路から発生する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可能であることが示された。

次に、論文提出者は環境中から、アルギン酸を分解・資化できる微生物の単離を試みた。

その結果、褐藻類を補食しているサザエ (*Turbo cornutus*) 消化管からアルギン酸を単一炭素源として分解・資化可能な微生物株を単離することに成功し、SA2 株と命名した。SA2 株の遺伝子配列解析、生理・生化学解析、ゲノム比較解析などの結果から、SA2 株は新種微生物であることが判明し、*Vibrio algivorus* SA2^T (= DSM 29824^T = NBRC 111146^T) 株として新種認証された。

次に、論文提出者は、*Vibrio algivorus* SA2^T 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を解析した。まず、細胞外アルギン酸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、細胞外アルギン酸を分解できる酵素 AlyB を同定した。AlyB は、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、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。さらに、*Vibrio algivorus* SA2^T 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*) 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。さらに、L-リジンを生産する大腸菌 AJIK01 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。上述の *Vibrio algivorus* のアルギン酸代謝 7 遺伝子を AJIK01 株に異種発現した菌株(D3000 株と命名)を構築したところ、可溶化したアルギン酸を単一炭素源とする液体培地で生育し、L-リジンの有意な蓄積を示した。以上、論文提出者は、*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明らかにすると共に、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。

以上の成果は、藻類の重要なバイオマス成分である脂肪酸とアルギン酸の分解代謝のボトルネックを明らかにし、合成生物的に大腸菌中で藻類バイオマスからリジン合成に成功した初めての成果として、高く評価された。

なお、本論文に記載された研究は星野康、中瀬健太郎、臼田佳弘、知念秋人、福田裕穂氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、土井秀高提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。