

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 13125 号
------	---------------

氏 名 小原 優季

論 文 題 目

微生物固定化プロセスの構築とバイオ燃料生産に関する研究
(Study on the immobilization process for bacterial cells and
biofuel production)

論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	堀 克敏
委員	名古屋大学	教授	馬場 嘉信
委員	名古屋大学	教授	井藤 彰
委員	名古屋大学	講師	中谷 肇

論文審査の結果の要旨

小原優季君提出の論文「微生物固定化プロセスの構築とバイオ燃料生産に関する研究」は、接着性ナノファイバータンパク質AtaAを用いた新規微生物固定化の手法と微生物代謝を利用したバイオ燃料生産についてまとめた論文である。七つの章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第1章では、本論文の研究背景と研究目的について述べられている。既存の微生物固定化法、微生物によるバイオ燃料生産の例や代謝改変技術について述べた上で、本論文の研究目的について述べている。

第2章では、*ataA* 遺伝子を導入した *Acinetobacter baylyi* ADP1株を宿主として、AtaAを用いた微生物固定化の利点について検証を行なっている。まず、AtaAを用いた固定化は、微生物の増殖条件、休止状態のいずれの条件下でも利用可能であることを示しており、ポリウレタン、ガラス、ヘチマなど様々な素材の固定化担体を用いた場合でも固定化可能であることを実証している。また、AtaAを用いた固定化は、既存のバイオフィルムを用いた固定化手法よりも短時間で完了することについても示している。これらの結果は、AtaAを利用した固定化の利点についてまとめた有用な知見である。

第3章では、AtaAを介した細胞付着が阻害、あるいは剥離される条件についてまとめられている。はじめに、LB培地を用いた培養条件でAtaAを利用した固定化が阻害されることを発見し、このような阻害が *ataA* 遺伝子の発現量の低下に由来するものではなく、AtaA提示細胞への物理的な要因による阻害であることを明らかにしている。次に、培地に用いられる代表的な基質や誘導剤によるAtaA提示細胞への付着阻害効果について検証がされており、グルコースなどの糖類が付着を阻害しない一方で、カザミノ酸テクニカルグレードなどのカゼイン由来の加水分解物によって細胞付着が阻害されることを明らかにしている。また、このようなカゼイン由来の加水分解物を利用することで、AtaAを介して固定化された細胞が剥離可能であることを示しており、AtaAを介した細胞固定化において、固定化と剥離が可逆的に実行可能であることを実証している。これらの結果は、AtaAを用いた微生物固定化を制御する上で重要な知見である。

第4章では、AtaAを用いた水素生産菌の固定化と水素の連続生産について述べている。水素生産菌の一つである *Enterobacter aerogenes* に *ataA* 遺伝子を導入し、AtaAの表層提示と付着性の付与が可能であることを示している。また、AtaAによって付着性を付与した水素生産菌は、多孔性のポリウレタン担体へ固定化可能であることを示している。水素生産菌を固定化したポリウレタン担体を用いて基質溶液を連続的に供給するフロー型のリアクターを構築することで、水素の連続生産反応が可能であることを実証している。第3章の結果は、AtaAを利用した固定化が *Acinetobacter* 属以外の宿主で利用可能であり、微生物の多段階の代謝を介した物質生産を成功させた初めての例であり、AtaAによる微生物固定化の有用性を示す重要な知見である。

第5章では、AtaAが同定された宿主である *Acinetobacter* sp. Tol 5株の代謝制御について述べられている。まず、CRISPR interference (CRISPRi) を機能させるためのシャトルベクターを構築、導入することで、ターゲットとなる遺伝子の発現を任意に抑制できることを示している。また、CRISPRiを用いてカテコール代謝遺伝子の発現を抑制することで、トルエンからの3-メチルカテコール生産が可能であることを示している。CRISPRiは様々な微生物宿主の代謝制御を行うために広く利用されている技術であり、同手法が高付着性細菌Tol 5株上でも利用可能であることを示したのは、AtaAを介した固定化と有用物質の生産を組み合わせる上で有用な知見である。

第6章では、メタン資化細菌である *Methylococcus capsulatus* Bath株を用いたメタンからのメタノール変換について述べている。まず、Bath株でのRNA interference (RNAi) を行うためにsRNA発現用プロモーターを新たに構築し、既存のプロモーターシステムよりも高い転写活性が得られることを示している。次に、新たに構築したプロモーターシステムを用いてBath株のメタノール代謝遺伝子をノックダウンするためのシャトルベクターを構築し、Bath株へ導入することで、メタノール代謝遺伝子をノックダウン可能であることを示している。また、sRNAの発現のON/OFFを切り替えることによって、メタノールを代謝し、Bath細胞の生育を担保する生育モードと、メタノール代謝をノックダウンし、メタノールの蓄積を行う生産モードを繰り返し切り替え可能であることを示し、メタンからのメタノール生産が可能であることを実証している。これらの結果は、メタン資化細菌の代謝を改変し、メタノール生産が可能であることを示した初めての例であり、微生物を用いたメタンの有効利用を行う上で重要な知見である。

第7章では、本研究の結論を与えている。

以上のように、本論文ではAtaAを利用した新しい微生物固定化手法の構築とその有用性について明らかにし、また、固定化可能微生物の代謝をCRISPRi, RNAiといった手法で制御可能であり、有用物質の生産が可能であることを示している。本研究成果は、新規微生物固定化技術を利用した効率的なバイオ燃料生産プロセスを構築するにあたり重要であり、工学の発展に寄与するところが大きいと判断できる。よって、本論文の提出者である小原優季君は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格があると判断した。