

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 13124 号
------	---------------

氏 名 宇佐見 享嗣

論文題目

高付着性細菌によるモノテルペノイドの生産に関する研究
(Study on the production of monoterpenoid by a highly adhesive bacterium)

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	石原 一彰
委員	名古屋大学	教授	人見 清隆
委員	名古屋大学	講師	中谷 肇

論文審査の結果の要旨

宇佐見享嗣君提出の論文「高付着性細菌によるモノテルペノイドの生産に関する研究」は、多様な毒性化合物に対し代謝および耐性を有する高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 を生体触媒に利用した高付加価値モノテルペノイドの生産についてまとめた論文である。四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。モノテルペノイドとそのバイオプロダクションについて背景と問題点をまとめた上で、生体触媒として用いる高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 についての詳細と本論文の目的について述べている。

第2章では、*Acinetobacter* sp. Tol 5 による有用物質生産能を検討するため、安価で工業的に重要なモノテルペノイドであり、ゲラニールとネラールの幾何異性体混合物であるシトラールの選択的生物変換を行い、生物変換に関与する代謝経路を特定している。まず、Tol 5 のシトラールに対する耐性を増殖阻害試験により評価し、生物変換に使用する生体触媒として十分な耐性を有することを示している。次に、Tol 5 野生株によるシトラールの液相反応での生物変換能の評価を行い、7種の自然酸化生成物と少なくとも1種の生物変換生成物を確認している。続いて、Tol 5 の細胞内にシトラール各異性体をそれぞれ供給する目的でゲラニオールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 *geoA* を異種発現させ、各シトラール前駆体（ゲラニオールおよびネラール）を基質に生物変換を行うことにより、シトラールの自然酸化を抑制できること、Tol 5 がシトラールを構成するネラールからは反応が進行しなかったのに対し、ゲラニールから (1*R*, 3*R*, 4*R*)-1-メチル-4-(1-メチルエチニル)-1,3-シクロヘキサジオールおよび (*E*)-ゲラン酸を特異的に生成することを明らかにしている。これらの結果は、基質の適用範囲がシトラールだけでなく、構造上不安定または異性体を含む基質の生体内変換経路の特定にも拡張できることを示す重要な知見である。

第3章では、第2章にて得られた生体内変換生成物のうち高付加価値モノテルペノイドである (*E*)-ゲラン酸 [(*E*)-GA] の気相バイオプロダクションを目的に、代謝改変した Tol 5 変異体を作製後、Tol 5 が有する *AtaA* による担体固定化法を用いて気相バイオプロダクションを世界で初めて実証している。基質ゲラニールと生産物 GA の影響を増殖阻害試験にて評価した結果、閾値濃度は認められなかったことから第2章で作成した Tol 5 (pGeoA) によるゲラニールの液相における生物変換を行い、(*E*)-GA 蓄積量が8日目から減少することを明らかにしている。その後、Tol 5 が GA を単一炭素源に増殖できることを示し、配列類似性解析により FadD4-オルソログを同定し相同組換え法にて欠損株の取得に成功している。取得した欠損株に pGeoA を導入することで Tol 5 Δ *fadD4* (pGeoA) を作製し (*E*)-GA の液相生産を行い、生産性の向上にも成功している。また、Tol 5 がゲラニールの代謝における中間体ゲラニールを代謝することを Tol 5 Δ *fadD4* (pGeoA) を用いた増殖試験により明らかにしている。この結果から、Tol 5 がゲラニールを内在的に微量代謝し、未知の中間体や (*E*)-GA を介して単一炭素源として細胞維持などに使用していることが示唆されている。また、Tol 5 Δ *fadD4* (pGeoA) は Tol 5 野生株と同様にポリウレタン担体に対して効率的な固定化が可能であり、菌体周辺にはバルク水がないことを明らかにしている。次に、固定化 Tol 5 Δ *fadD4* (pGeoA) による (*E*)-GA のバッチ式気相バイオプロセスを構築するため、系中のガス状ゲラニール飽和濃度を明らかにし、ガス状ゲラニールと GA を用いて Tol 5 に対し CFU 試験を行い、飽和濃度においても毒性がないことを明らかにしている。続いて、(*E*)-GA の気相バイオプロダクションを行い、ヘッドスペース成分と担体への吸着成分を GC-MS にて解析し、世界で初めて高付加価値化合物の気相バイオプロダクションに成功したことを示している。この結果は、反応から生産物分離に至る真のグリーンバイオプロセスの開発を示している。さらに、繰り返し反応を行うことで、菌体の再利用が可能なることも明らかにしている。これらの結果から、Tol 5 は気相バイオプロダクションにおける非常に有望なプラットフォームであることを示唆し、気相において揮発性化合物のより環境に優しい生産が可能となることを示す重要な知見である。

第4章では、本研究の結論を与えている。

以上のように、本論文では遺伝子工学や、機器分析技術などを駆使して高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 によるモノテルペノイドの生産について明らかにしている。これらの評価方法並びに得られた本研究成果は、モノテルペノイドをはじめとした様々な高付加価値揮発性化合物生産に応用され、新たな有用物質生産プロセスを実現するために重要であり、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宇佐見享嗣君は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格があると判断した。