

論文の要旨

氏名 阿部 健二

論文題目

Expansion of assimilable substrates in *Escherichia coli* for efficient fermentation and biocontainment applications

(大腸菌における資化可能な基質の拡張の研究：発酵生産の効率の向上と生物学的封じ込め技術への応用)

序論 (Chapter 1)

発酵法による医薬、アルコール、酵素、アミノ酸等の有用物質の生産は世界中で広く行われている。中でもアミノ酸は調味料や飼料添加物、甘味料原料等に使われる有用物質で、主に*Escherichia coli*や*Coryne*型細菌を用いた発酵法により生産されており、その需要は2022年には1,000万トンを超えると予想されている。生産菌株は、遺伝子組み換え技術を用いて基質の取込系改変、生合成経路の強化、フィードバック阻害や分解系の除外、排出能強化等の育種改良がなされた所謂GMOが一般的である。

アミノ酸発酵において最も多用される糖源はとうもろこしなどの植物から抽出したデンプン(グルコースが一部の α -1,6結合と多数の α -1,4結合で重合した高分子化合物)を酵素により加水分解したグルコース系発酵原料である。しかしながら完全な分解は困難であること、逆反応が起こること、 α -1,6結合は分解できないことから、マルトースやイソマルトースなどの2糖やパノースなどの3糖が数%混入する。これらの糖はグルコース抑制や資化能の欠如等の理由により発酵液に残存し、処理収率の低下や製品品質への悪影響を齎すことが課題となっている。本研究では*Bacillus subtilis*由来のマルトースPTSとして報告されているGlvA (phosphor- α -glucosidase)とGlvC (PTS Enzyme IICB)を用いてイソマルトースとパノースの資化能を付与する技術の開発を行った。

一方、前述のように発酵生産で使われる生産菌はGMOであり、環境中へ漏洩し、伝播して人や環境へ悪影響を齎す可能性が懸念されるため、各国にカルタヘナ法を主とするレギュレーションが存在し、密閉系で取り扱う必要がある(物理的封じ込め)。近年、漏洩リスクの極小化のために、生物学的封じ込め技術への注目が増している。技術確立が進めば、環境浄化や医療分野など、これまで組み換え体の利用が困難であった領域にもGMOの活用が広がる可能性ある。研究の二つ目の主題として、微生物のリン酸とその類縁体の資化様式に着目した新たな生物学的封じ込め技術の開発を行った。

E. coliへのイソマルトースとパノースの資化能付与 (Chapter 2)

これまでに *Klebsiella pneumoniae* の *aglA* (PTS Enzyme IICB) と *aglB* (phosphor- α -glucosidase)を*E. coli*内で発現させることで、イソマルトースの資化能が付与されるとの報告がある。*B. subtilis*由来のホモログである*glvA*と*glvC*を*E. coli*内で発現させることで、イソマルトースとパノースの資化能を付与出来ることを見出した。その他にも複数の3糖や糖アルコールが新たにGlvAとGlvCにより資化されることを確認した。また、*E. coli*はグルコース抑制によりグルコースの存在下ではマルトースを資化しないが、異種の経路であるGlvAとGlvCの発現により同時資化が可能となった。更に、GlvAとGlvCを発現させ

たアミノ酸発酵モデル菌を用いてアミノ酸発酵を行った結果、構築した株はイソマルトースとパノースを有意に資化し、蓄積の向上を示した。以上の結果から、従来発酵されることなく廃棄されていたマルトース、イソマルトース及びパノースを有効に利用する技術の開発に成功したと結論した。

亜リン酸を利用した菌株の生物学的封じ込め技術の開発 (Chapter 3)

これまでに提案された生物学的封じ込めの方法論としては①通常的环境中には存在しない化合物依存的に生育させる(要求性付与)、②外部環境への暴露の際に自発的な細胞死を誘発、③特定の条件(高pH、低pH、高温等)でのみ生育させる、等の育種改変がある。今回、微生物のリン酸とその類縁体の資化様式に着目した新たな生物学的封じ込め技術の開発を行った。

亜リン酸(HPO_3^{2-})は通常的环境中には存在しない化合物である。微生物を亜リン酸存在下でのみ生育し、リン酸では生育出来ない微生物に改変することが出来れば、新たな生物学的封じ込め技術になると考えた。その為の必要要件として、①内在性のリン酸/リン酸エステル化合物の取込能の欠失、②亜リン酸資化能の付与(亜リン酸特異的なトランスポーターの導入と亜リン酸→リン酸に変換する亜リン酸デヒドロゲナーゼの導入)、の2点が挙げられた。まず、①の要件に対して、リン酸取込系(PitA, PitB, PstSCAB, PhnCDE)とリン酸エステル取込系(UhpT, UgpB, GlpT)を欠損することで、*E. coli*が有するリン酸/リン酸エステル資化能を欠失した。次に、②の要件に対して*Ralstonia* sp. 4506株から単離した亜リン酸トランスポーターPtxABCと亜リン酸デヒドロゲナーゼPtxDを*E. coli*で発現させることで、亜リン酸資化能が付与出来た。しかし、生育試験とRIラベルをした基質を用いたPtxABCの機能解析を行った結果、PtxABCはリン酸も取り込むことが分かった。亜リン酸特異的なトランスポーターを探索すべく、*Pseudomonas stutzeri* WM88株の次亜リン酸トランスポーターHtxBCDEの機能解析を行った結果、次亜リン酸と亜リン酸は取り込むものの、リン酸は取り込まないことを見出した。以上の知見を組み合わせ、*E. coli*内在性の*pitA*, *pitB*, *pstSCAB*, *phnCDE*, *uhpT*, *ugpB*, *glpT*を欠損し、*P. stutzeri* WM88株由来の亜リン酸特異的なトランスポーター*htxBCDE*と4506株由来の*ptxD*発現させたRN1008株を構築した。本株はリン酸をリン源とするLB培地などの一般的な複合培地では生育せず、亜リン酸を含む培地でのみ生育した。以上の結果から、亜リン酸を利用した菌株の生物学的封じ込め技術の開発に成功したと結論した。

結論 (Chapter 4)

本研究の課題とした*E. coli*へのイソマルトースとパノースの資化能付与と亜リン酸を利用した菌株の生物学的封じ込め技術の開発に関する研究成果を統括した。