

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（学術）	氏名	Perez Charose Marie Ting
学位授与の要件	学位規則第4条第1・②項該当		
論文題目 Physiological characterization of thraustochytrids in acetate assimilation and development of molecular breeding platforms for efficient lipid production (効率的脂質生産に向けた Thraustochytrids の酢酸代謝特性の解析及び分子育種基盤の開発)			
論文審査担当者			
主査	教授	秋庸裕	印
審査委員	教授	中島田豊	印
審査委員	教授	岡村好子	印
〔論文審査の要旨〕			
<p>近年、海洋バイオマスは再生可能エネルギーや高付加価値バイオ製品の生産のための持続可能な原料及び生体触媒として注目されている。なかでも、海洋に広く分布する藻類様原生生物である <i>thraustochytrids</i> は、高度不飽和脂肪酸やカロテノイド、炭化水素類などの有用脂質を著量生産する特性を有することから、健康食品、医薬品、飼料、化学品やバイオ燃料など多様な産業分野での応用が期待されている。しかし、従来の発酵原料は主に植物バイオマス由来の糖質であり、生産コストの低減に支障となっていることから、糖化处理などの工程改善が試みられている。一方、当研究室では、海藻糖質を原料としたバイオリアファイナリーシステムの開発をめざした研究を通じて、各種有機酸も利用可能であることを見出した。<i>thraustochytrids</i> の中でも特に脂質生産性が高い <i>Aurantiochytrium</i> 属株が酢酸に対して高い資化性を示したことは、CO₂ から酢酸を生成する嫌気性酢酸生成菌との二段階発酵システムの構築を可能とした。本研究では、酢酸を原料とした脂質発酵系での代謝特性の俯瞰的解析と、その生産性向上に向けた分子育種技術の確立をめざした。以上の研究背景と目的について、第1章に記述した。</p> <p>第2章では、<i>Aurantiochytrium limacinum</i> SR21 株の脂質発酵における酢酸の代謝特性を解析した。まず、酢酸培地での比増殖速度や脂肪酸生産性をグルコース培地の場合と比較したところ、いずれも顕著に劣っていたことから、細胞増殖や脂肪酸合成に関する代謝系が全体的に停滞していることが分かった。そこで、GC-MS 及び LC-MS を用いたメタボローム解析によって代謝物を網羅的に比較定量したところ、ステロール類の生合成に関わるメバロン酸経路が活性化しており、脂肪酸合成の基質であるアセチル CoA が競合的に消費されていることが示唆された。また、トリカルボン酸回路の一部を短絡して補酵素 NADH や FADH の生成反応を回避するグリオキシル酸経路の活性化が見られた。さらに、グルコース代謝で活性化されるペントースリン酸経路も酢酸培地では低調であり、脂肪酸合成に要する補酵素 NADPH の主たる供給経路が断たれた状態となっていた。したがって、これらの代謝経路を活性化させて細胞増殖や脂肪酸合成に要する基質や補酵素の</p>			

供給を促す培養条件の策定や分子育種が必要であることが示された。

第3章では、*A. limacinum* SR21 株においてゲノム編集技術を確立し、脂肪酸生産性を向上させる育種を試みた。ゲノム編集技術は近年、多様な生物種に対して適用可能な育種法として注目されており、なかでも CRISPR-Cas9 システムは簡便性に優れることから、多数の標的候補遺伝子に対するスクリーニングに有用であり、本研究でもその目的で導入をめざした。まず、 β -カロテン合成酵素の遺伝子破壊によってコロニーが呈する橙色が消失する表現型を利用して、当該遺伝子の標的部位における塩基挿入・脱離や薬剤耐性マーカーの導入が起こったゲノム編集株が得られる条件を鋭意検討した結果、guide RNA 非存在下で起こる相同組換えと比較して有意に高い効率を与える条件を決定した。この条件で、脂肪酸分解に関わる β -酸化系酵素 Acox1 及び Acox2 の遺伝子を破壊したところ、脂肪酸蓄積量が特定の培養時間で有意に向上した変異株が得られた。このように脂質生産性の向上に適した育種標的を迅速に探索して適用する基盤技術を確立することができた。

第4章では、これらの研究結果を総括して、酢酸を安価な持続的原料として脂質発酵に利用する技術について結論した。さらに、CO₂のみならず様々な未利用・廃棄バイオマスをも原料化できる酢酸生成菌と組み合わせることにより、多様な物質変換系が提供できる可能性を考察した。

以上の成果は、地球環境に優しい持続的な物質循環システムの構築に向けて有用な知見を与えるものであり、産業的及び学術的に極めて意義が大きい。したがって、本論文の著者は、博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認められた。

備考 審査の要旨は、1,500 字程度とする。