

論文内容の要旨

申請者氏名 久下 貴之

農業残渣などのリグノセルロース系バイオマスは、食料資源と競合せず、グルコース、キシロース、アラビノースなどを豊富に含有する再生可能資源あり、微生物を用いたバイオ燃料・化成品生産における原料として利用することができる。

コリネ型細菌の *Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸をはじめとするアミノ酸の発酵生産に古くから利用されてきた有用工業微生物であるが、一般的にペントースを資化できない。したがって、*C. glutamicum* をリグノセルロース系バイオマスを原料とした物質生産における宿主として利用するためには、糖質代謝能の改善を行うことが必要である。以上の背景から、本研究ではペントース資化能を有する *C. glutamicum* を宿主としたリグノセルロース系バイオマスからの物質生産を可能とするため、多糖分解酵素遺伝子の機能およびペントース代謝遺伝子の発現制御機構を解析した。

まず、農業残渣に豊富に含まれるペントースからなる多糖（アラビノキシラン）の分解酵素遺伝子を解析し、その直接資化能を *C. glutamicum* に獲得させることを試みた。先行研究において、*Corynebacterium alkanolyticum* 由来のキシロオリゴ糖（以下 XOS）およびアラビノキシロオリゴ糖（以下 AXOS）の両方の取り込み体をコードする *xylEFG* 遺伝子、 β -キシロシダーゼをコードする *xylD* 遺伝子、および大腸菌由来のキシロース資化関連酵素（キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ）をコードする *xylAB* 遺伝子を導入した *C. glutamicum* の遺伝子組換え株は XOS の資化能を獲得したが、AXOS は利用されずに細胞内に蓄積することが分かっていた。そこで、*C. alkanolyticum* のゲノム上からアラビノフラノシダーゼをコードする *abf51B* 遺伝子および分泌型キシナーゼをコードする *xylI* 遺伝子を見出し、上記の XOS 資化性 *C. glutamicum* に両遺伝子を導入したところ、アラビノキシランの直接資化能を獲得することが明らかになった。

次に、*C. glutamicum* の中で例外的にアラビノースを資化できる ATCC 31831 株のアラビノース代謝制御機構を解析した。まず、*C. glutamicum* におけるアラビノース代謝関連遺伝子の発現制御に転写因子 AraR が直接的に関与するかどうかを調べるため、精製した AraR を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、アラビノース資化遺伝子オペロン（*araBDA*）とアラビノース取り込み体をコードする *araE* 遺伝子上流領域の DNA 断片に AraR が特異的に結合することが示された。また、この DNA-AraR 複合体の形成はアラビノースの添加により阻害された。次に、DNase I フットプリント法により AraR 結合部位を検出し、5'-RACE 法により *araB* と *araE* の両遺伝子の転写開始点を明らかにした。以上の結果から、アラビノース非存在下において、AraR はアラビノース資化・取り込み遺伝子のプロモーター領域に結合し、それらの発現を抑制するが、アラビノーが存在すると AraR の DNA 結合活性が低下することにより、発現抑制が解除されることが示された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 久下 貴之

近年、食料資源と競合しないリグノセルロース系バイオマス为原料としたバイオプロセスの開発（バイオリファイナリー研究）が注目されている。コリネ型細菌の一種である *Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸をはじめとする多くのアミノ酸の発酵生産に古くから利用されてきた有用工業微生物であるが、セルロース、ヘミセルロース、およびこれらから生成されるキシロースやアラビノースなどのペントースを資化する能力を有していない。申請者の所属する研究室では、リグノセルロース系バイオマス为原料とした高効率な微生物バイオプロセスを構築するために、*C. glutamicum* における糖代謝関連遺伝子の発現制御機構の解析および外来遺伝子の導入による様々な糖質代謝能の改善、付与などを行っている。

申請者は、*C. glutamicum* を宿主としたリグノセルロース系バイオマスからの物質生産を可能とするため、多糖分解酵素遺伝子の機能およびペントース代謝遺伝子の発現制御機構を解析し、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) リグノセルロース系バイオマスの主要構成成分であるキシランに着目し、微生物由来のキシラン分解酵素遺伝子について機能解析を行った。その結果、*Corynebacterium alkanolyticum* 由来のキシロオリゴ糖およびアラビノキシロオリゴ糖の取り込み体をコードする *xylEFG* 遺伝子、 β -キシロシダーゼをコードする *xylD* 遺伝子、大腸菌由来のキシロース資化関連酵素（キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ）をコードする *xylAB* 遺伝子、アラビノフラノシダーゼをコードする *abf51B* 遺伝子および分泌型キシラナーゼをコードする *xylII* 遺伝子を導入した *C. glutamicum* の遺伝子組換え株を構築したところ、稲わらなどにおいて豊富なアラビノース側鎖の多いキシランの資化能を付与することに成功した。
- 2) 一般的にアラビノースを資化できないとされている *C. glutamicum* の中で、例外的にアラビノース資化能を有する *C. glutamicum* ATCC 31831 株に着目し、解析を行った。その結果、アラビノース非存在下において、転写因子 AraR はアラビノース資化遺伝子のオペロン (*araBDA*) およびアラビノース取り込み体をコードする *araE* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、それらの発現を抑制するが、アラビノースが存在すると AraR の DNA 結合活性が低下することにより、発現抑制が解除されると言う新規なアラビノース代謝制御機構を明らかにした。

以上のように、本論文は *C. glutamicum* にアラビノキシラン資化能を付与することに成功するとともに、他の微生物とは異なるアラビノースの代謝制御機構の一端を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。