

## 論文内容の要旨

申請者氏名 眞鍋 憲二

申請者は新エネルギー産業技術開発機構 (NEDO) によるプロジェクトの一つである「汎用性宿主細胞創製技術の開発(MGF: Minimum Genome Factory) プロジェクト」に参画し、細胞外に大量の酵素を分泌する枯草菌 *Bacillus subtilis* 168 株を題材に産業用酵素の生産に特化した宿主微生物の創製を目指してきた。生育および酵素生産に不要な遺伝子領域を多段階に削除したゲノム縮小株 MGB874 株は、興味深いことにセルラーゼやプロテアーゼといった産業用酵素の生産量が飛躍的に向上することが見出されている。本論文では、MGB874 株を産業用酵素の次世代宿主として捉え、さらなる酵素生産量の向上を進めることを目的として、本株での酵素高生産の機序の解明とその結果を基にした菌株の改良を行った。

まず、遺伝学的手法を用いて MGB874 株の酵素高生産を引き起こす遺伝子欠失領域の同定を試みた。その結果、MGB874 株は、転写因子 RocR をコードする遺伝子欠失により酵素生産量が大幅に向上していることが明らかとなった。種々の解析結果から、*rocR* の欠失はグルタミン酸分解酵素 RocG の発現低下を引き起こし、その結果、細胞増殖や酵素生産に必須なグルタミン酸の分解が抑制されることで高い酵素生産を可能にしていることが示唆された。そこで、さらなる酵素生産の向上を目的に、*rocG* の遺伝子欠失株を構築した。しかしながら、構築した *rocG* 欠失株は細胞増殖が増加する一方で、酵素生産量は大幅に低下することが判明した。転写および代謝解析から、酵素生産の低下は培養中期におけるアンモニア枯渇が原因であることが示唆されたため、アンモニア流加系培養による評価を行った。その結果、アンモニア流加により MGB874 株の 1.5 倍にまで生産量が向上することが判明した。

MGB874 株が他の有用酵素生産にも有用であることを検証する目的で、酸化剤耐性およびキレート剤耐性を有し、産業的に有用な酵素  $\alpha$ -amylase AmyK38 の生産検討を行った。マルチコピープラスミドを用いて AmyK38 の高発現を行った結果、予想に反して MGB874 株の AmyK38 生産量は野生株(168 株)よりも大幅に低下することが判明した。リアルタイム PCR 等の解析を行った結果、MGB874 株の AmyK38 生産量低下は分泌段階以降において生じていることが示唆された。詳細な解析を進めた結果、*rocG* の発現低下に伴う培養液 pH の低下が MGB874 株における AmyK38 の生産量低下原因であることが判明し、pH 至適化条件では MGB874 株は従来の野生株である 168 株よりも優れた生産量を発揮することが確認された。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 眞鍋 憲二

本論文は、産業用酵素を効率よく生産する枯草菌改良株 MGB874 について、その酵素高生産能力の原因を様々な観点から検討し、同株を用いた実際の酵素生産においてさらに効率よく生産量を向上させる具体的な培養条件などを明らかにしている。

MGB874 株は枯草菌標準株である 168 株を数段階のゲノム改変を経て作成され、本来のゲノムの 20% 程度が削除されている。このゲノム縮小そのものが原因であるかどうかは不明であったが、MGB874 株ではセルラーゼなどの有用酵素の生産効率が飛躍的に向上しており、申請者は、その理由の解明を当初の目的として研究を開始している。ゲノム縮小株で削除された多数の遺伝子群を解析した結果、*rocDEF-rocR* 領域が酵素高生産能に最も大きく影響していることを見いだしている。この領域に含まれる遺伝子の中でも *rocR* が欠失することにより、グルタミン酸の細胞内濃度が上昇することが酵素高生産能に関与することを明らかにし、これにより細胞内での全てのアミノ酸合成のレベルが向上することが酵素高生産能の基盤となっている可能性を考察している。さらに、グルタミン酸分解酵素の遺伝子である *rocG* の破壊株の解析により、*rocG* 破壊株ではアンモニア流化培養をすることで MGB874 株の生産性を 50% 上昇させることに成功している。

さらに、MGB874 株では  $\alpha$  アミラーゼの生産は逆に低下することを見だし、その原因を追及している。この生産性の低下は、培養液の pH の低下が原因であることを見だし、それは *rocR* 欠失による *rocG* 発現の低下に起因していることを明らかにしている。この発見が契機となり、培養液の pH を至適化することにより、 $\alpha$  アミラーゼの生産量が飛躍的に向上することに成功している。

以上のように、本論文はゲノム改変宿主枯草菌での酵素高生産能の基盤を明らかにし、それを基として、安定した酵素高生産を可能にする培養条件を確立したもので、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。