

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	竹谷 友之
論文題目	<b>Synthetic biological studies on production of methanol from natural resource-derived carbon compounds</b> (天然資源由来炭素化合物を基質としたメタノール生成反応に関する合成生物学研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>メタノールは、化学原料や微生物の培養原料として用いられるほか、燃料や燃料電池としての利用も可能である。その製造は主にメタンを主成分とする天然ガスから合成ガス化を経て行われているが、バイオマスや二酸化炭素など様々な炭素資源も製造原料とできることから、メタノールを中心とした物質生産・社会体系である「メタノール・エコノミー」が、ノーベル化学賞を受賞したOlahらにより提唱されている。一方、自然界には、メタンからメタノールへの直接酸化を常温常圧条件で触媒するメタン酸化生体触媒 (MOB) や、植物細胞壁成分であるペクチンのメチルエステル基を加水分解するペクチンメチルエステラーゼ (PME) などの、メタノール生成反応を触媒する酵素 (メタノール生成酵素) が存在する。また細菌のメタノール代謝経路 (C1代謝経路) に関わる酵素の中には、逆反応、すなわちバイオマス成分からメタノールを生成する方向の反応を触媒するものも知られている。これらの酵素によるメタノール生成反応を用いることによって、各種天然資源に由来する炭素化合物からのメタノール生産に合成生物学的な利用が可能であると考えられた。</p> <p>本論文では、メタノール生成酵素を異種発現させた菌株におけるメタノール生成活性を検出すべく、メタノール資化性酵母<i>Komagataella phaffii</i> (<i>Pichia pastoris</i>) を用いたメタノールの高感度一細胞バイオセンシング技術として「メタノールセンサー酵母」を開発し、その技術検証として本センサー酵母に異種発現させたPME活性を一細胞単位で可視化することに成功した。さらに、センサー酵母とMOB活性を有する細菌の共培養により、そのMOB活性の可視化と、メタンを用いた異種タンパク質の合成に成功した。また、細菌のC1代謝経路を構成し逆反応の触媒活性も示す酵素群を大腸菌で同時発現させることで、グルコースからメタノールを生成する「逆行C1代謝経路」を構築した。主な内容は、以下の通りである。</p>			
<ol style="list-style-type: none"><li>1. <i>K. phaffii</i>を宿主としてメタノールの濃度に応じた強さで転写誘導される<i>AOX1</i>または<i>DAS2</i>のプロモーターの下流に蛍光タンパク質を発現する株を作製し、グルコース培地で対数増殖中期または後期まで前培養した細胞をメタノール培地に移し、細胞の蛍光強度を顕微鏡画像解析で定量化した。その結果、<i>DAS2</i>プロモーターを用いた株の対数増殖後期の細胞を用いる条件で、最も低い濃度のメタノール (25 <math>\mu\text{M}</math>) に対して蛍光強度が増大することを見出した。</li><li>2. 1.で確立した条件の細胞集団を、蛍光強度測定のスループット性が高いフローサイトメトリーに供し、メタノール濃度に応じた細胞の蛍光強度分布を解析した結果、2.5 <math>\mu\text{M}</math>のメタノールに対し細胞の蛍光強度分布が高強度側へとシフトし、相</li></ol>			

乗平均も増大した。以上の結果により、 $\mu\text{M}$ レベルの検出下限を有するメタノールの一細胞バイオセンシング技術を確立した。

- 糸状菌 *Aspergillus niger* 由来のPME遺伝子の発現カセットをセンサー酵母に導入し、基質であるペクチンを添加してメタノール生成反応を行わせた結果、発現カセットのコピー数に比例してセンサー酵母の蛍光強度が増大し、その増大量が生化学的に評価したPMEの生産量および活性評価とも合致したことから、メタノール生成酵素活性の一細胞単位での活性の可視化に成功した。さらにセルソーターを用いれば活性の高い細胞をハイスループットに選抜できることを示した。
- MOB活性を有する *Mycolicibacterium sp.* TY-6株（以下、TY-6株）をセンサー酵母とを、メタンをメタンを単一の炭素源とする培地において共培養した結果、メタンおよびTY-6株の菌体濃度に依存してセンサー酵母の蛍光強度が増大したことから、本共培養系によって異種タンパク質である蛍光タンパク質をメタンからワンポット合成できることを示した。
- メタノール資化性細菌においてメタノールからフルクトース6-リン酸（F6P）への炭素固定を担う酵素である、*Bacillus methanolicus* S1株由来の $\text{NAD}^+$ 依存型メタノール脱水素酵素（MDH）および *Mycobacterium gastri* MB19株由来の3-ヘキサロース-6-リン酸シンターゼと6-ホスホ-3-ヘキサロイソメラーゼの人工融合酵素（HPS-PHI）の遺伝子を大腸菌で同時発現させ、その菌体を用いて菌体反応を行った結果、F6Pおよびその前駆体となるグルコースからメタノールが生成することを示し、大腸菌における逆行C1代謝経路の構築に成功した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、メタノール生成酵素の活性が高い菌株の選抜、メタンからのワンポット異種タンパク質合成、およびメタノール代謝に関わる酵素の逆反応を利用したメタノール生産を行うための合成生物学的研究を行うとともに、その技術を開発したものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. メタノールの高感度一細胞バイオセンシング技術として*Komagataella phaffii*を用いたセンサー酵母を開発し、高感度検出が可能なプロモーターや培養条件を見出し、フローサイトメトリーによる一細胞解析と組み合わせることで、2.5  $\mu\text{M}$ の検出下限を実現した。
2. センサー酵母に異種発現させたペクチンメチルエステラーゼのメタノール生成活性の一細胞単位での可視化に成功した。
3. センサー酵母とメタン酸化生体触媒活性を有するTY-6株の共培養によりメタンから異種タンパク質をワンポット合成可能なことを示した。
4.  $\text{NAD}^+$ 依存型メタノール脱水素酵素および3-ヘキソース-6-リン酸シンターゼと6-ホスホ-3-ヘキソイソメラーゼの人工融合酵素を大腸菌で同時発現させて逆行C1代謝経路を大腸菌内に構築し、グルコースからのメタノール生成に成功した。

以上のように、本論文は、メタノール生成酵素の活性が高い変異体の高感度・ハイスループットな選抜技術、メタンから異種タンパク質のワンポット合成、C1代謝酵素の逆反応を利用したグルコースからのメタノール合成など、多様な天然資源に由来する炭素化合物を合成生物学的に利用するための新たなアプローチを示したものであり、制御発酵学、応用微生物学、合成生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和3年2月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：令和3年6月25日以降（学位授与日から3ヶ月以内）