



TITLE:

Synthetic Constitution and Modulation of
Microbial Metabolic Systems for Advanced
BioChemical Generation(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sasaki, Yusuke

CITATION:

Sasaki, Yusuke. Synthetic Constitution and Modulation of Microbial Metabolic Systems for
Advanced BioChemical Generation. 京都大学, 2020, 博士(総合学術)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22613>

RIGHT:

許諾条件により本文は2021-03-01に公開

京都大学	博士 (総合学術)	氏名	佐々木 勇輔
論文題目	Synthetic Constitution and Modulation of Microbial Metabolic Systems for Advanced BioChemical Generation (バイオ化成品創製に向けた微生物代謝システムの合成的構築と調整)		
(論文内容の要旨)			
<p>エネルギーシステムの変遷は、様々な世界情勢や経済混乱などに起因する。国家間の紛争による石油危機、エネルギー保障問題 (限られた石油産出国への依存による地政学的リスク)、地球温暖化ガスの排出などの環境的要因、チェルノブイリ原子力発電所事故や東北地方太平洋沖地震に伴う福島第一原子力発電所事故などの自然・人的災害がある。再生可能エネルギーは、従来の原油に依存するエネルギー供給構造からの脱却をもたらすエネルギー源として注目されている。多岐にわたるバイオマス資源から産生されるバイオ燃料は、エンジンや燃料添加剤として利用できる。第一世代の供給原料として、サトウキビやトウモロコシといった可食バイオマスがバイオマス資源として利用されてきた。しかしながら、近年、食糧安全保障の点から、非可食バイオマスの第二および第三世代のセルロース系バイオマスと藻類バイオマス利用への移行が推進されている。合成生物学は、遺伝子の構成や制御に関する要素を組み合わせた合理的な代謝経路設計に基づく新奇な代謝経路の創製を実現する。そのテクノロジーを用いることで、目的の領域 (産業・環境・医薬品分野など) に合わせた宿主微生物の改変が可能となった。</p> <p>本論文では、合成生物学の見地から、微生物の改変を行い、次世代のバイオ燃料創製を目指してきた。第一章では、キシロース異性化酵素に対する金属コファクターの最適戦略によりヘミセルロースからのエタノール生産を達成した事例を紹介する。第二・三章では、コリネ菌へのメバロン酸経路導入により、イオン液体処理後の植物バイオマスから次世代ジェット燃料生産を実現した。主な内容は以下の通りである。</p>			
<ol style="list-style-type: none"> 1. キシロース異性化酵素は、セルロース系バイオマスの主成分であるキシロースの異性化と発酵を一斉に行う魅力的な酵素であり、本研究ではクロストリジウム属 (学名 <i>Clostridium cellulovorans</i>) より単離した (XylC)。本論文では、先行研究により樹立された XylC 細胞表面提示酵母に対する金属カチオンの最適化を実施し、触媒活性、発酵能の向上を試みた。二価コバルトカチオンを至適濃度で加えることにより、XylC の触媒活性を 46 倍向上させることに成功した。さらに、エタノール収率を 6 倍、キシロース消費量を 2.7 倍高めることに成功した。また、細胞外でのキシロース異性化は、キシロースの消費速度を促進することを示した。エンド型およびエキソ型のキシラン分解酵素を各々 <i>Saccharophagus degradans</i> (Xyn11B) と <i>Aspergillus niger</i> (XlnD) から単離し、酵母の細胞表面に提示させた酵母株との共培養発酵系を確立させることで、キシランからのエタノール発酵を試みた。その結果、Xtn11B:XlnD:XylC を 1:1:2 (1.39×10^{13}: 1.39×10^{13}: 2.78×10^{13} 分子) の比率で生産させた発酵条件下において、キシランから 6 g/L のエタノール生産に成功した。 2. ガソリン燃料の候補であるイソペンテノールの異種生合成経路はこれまでに確立されてきたが、宿主微生物に対するイソペンテノールの毒性が問題であった。また、植物バイオマスの前処理に利用されるイオン液体などの毒性も問題であった。そこで、コリネ菌に着目し、これらの問題点を克服する微生物宿主の構築を目指した。まず、コリネ菌は、イソペンテノールと代表的な 3 種類のイオン液体に対して従来の宿主である大腸菌と比較して、耐性能があることを示した。次に、イソペンテノール生合成経路であるメバロン酸経路を異種発現させた。ターゲットプロテオーム解析により、メバロン酸経路を異種発現させた際の律速酵素は、NADPH 依存性の 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルル (HMG) -CoA レダクターゼであることを同定した。その HMG-CoA を <i>Silicibacter pomeroyi</i> より単離した NADH 			

依存性の HMG-CoA レダクターゼに置換し、poxB と ldhA 欠損株で発現させることによって、1.25 g/L のイソペンテノール生産に成功した。さらに、イソペンテノールと同時にテトラメチルピラジン (TMP) を生産する株を同定し、イオン液体が TMP 生産の一要因になっていることを示した。流加培養系を用いることで、最終的に 2.2 g/L の TMP 生産を実現した。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、第一に、多糖キシランの加水分解、単糖キシロースの細胞外異性化、エタノール変換を行うパン酵母の共培養系を精緻に研究し、6.0 g/Lのエタノール生産を実現した。特に、キシロース異性化酵素に対する金属コファクターを検討し、2価コバルトを反応に用いることで、47倍活性を向上させることを発見した。

第二に、コリネ菌に着目して、宿主の遺伝子経路への改変（遺伝子ノックアウト）を行うことで、最終的に1 g/L以上のイソペンテノール生産を実現した。特に、コリネ菌においてイソペンテノール生合成経路を活性化させる条件を検討し、炭素源としてのグルコースを4% (w/v)以上の濃度で加えると活性度が劇的に上がることを発見した。

第三に、コリネ菌にイオン液体による細胞ストレスを加えることで、テトラメチルピラジン生合成経路が活性化されることを発見した。培養条件・方法を検討した結果、バッチ方式で6.0 g/L、流加培養方式で2.0 g/Lのテトラメチルピラジンを生産させることに成功した。

以上によって、本論文は博士（総合学術）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年1月29日、論文内容とそれに関連した事項について試問した結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降