

氏 名	村 松 正 善
-----	---------

(論文内容の要旨)

本論文は、ビタミンA、E類、コエンザイムQ類に代表されるファインケミカルまたは医薬品原料として重要な化合物である(*E,E*)-ファルネソール(FOH)と(*E,E,E*)-ゲラニルゲラニオール(GGOH)の微生物生産を研究対象とした。

(1) これまでに唯一 FOH 産生が報告されていたスクアレン合成酵素遺伝子欠損酵母

Saccharomyces cerevisiae ATCC64031 をモデル株として用い、FOH の生産に最適な培養条件の検討を行った。その結果、大豆油などの油脂、界面活性剤、消泡剤を添加したグルコース含有培地を用いることにより FOH 生産が上昇すると同時に、菌体外に分泌されることが判明した。さらに、培養 pH を弱アルカリ性にするにより FOH の生産量が上昇することも判明した。よって、適切な培地を用いることで FOH の生産量を増大できることが示された。次に、培地に種々のテルペノイド生合成阻害剤を添加するとプレニルアルコール生産が上昇することを明らかにした。特に、スクアレン合成酵素阻害剤の添加は種々の酵母のプレニルアルコール生産を増大させ、*Candida albicans* NBRC1060 では 109 mg/l の FOH が、*Rhodotorula rubra* NBRC 0870 では 24.4 mg/l の GGOH が産生した。カロチノイド生合成阻害剤であるジフェニルアミンを併用すると *R. rubra* では GGOH 生産が 53.7 mg/l に上昇した。また、*Gibberella fujikuroi* NBRC 30336 ではエントカウレン合成酵素の特異的阻害剤を培地に添加して培養するとプレニルアルコールの生産が上昇した。このように阻害剤によってファルネシル二リン酸とゲラニルゲラニル二リン酸が蓄積する条件を設定すれば、プレニルアルコールが産生することが明らかになった。

(2) 組換え微生物のプレニルアルコールの生産性を調べたところ、*Escherichia coli* の生産性は低く、メバロン酸合成経路の酵素をコードする遺伝子を強化した *S. cerevisiae* の生産性は高かった。ヒドロキシメチルグルタリル-CoA 還元酵素をコードする *HMG1* 遺伝子を高発現させた *S. cerevisiae* A451 株を培地の pH を 7.0 に保って培養すると 146 mg/l の FOH が産生した。また、*HMG1* 遺伝子を強化すること以外にもスクアレン合成酵素遺伝子 (*ERG9*) のプロモーターを誘導型にし、発現量を制御することも FOH を生産する上で有用な手法であることが明らかになった。このように、FOH の生産は上昇したが、GGOH については上記の方法ではほとんど生産量の上昇は認められなかった。この原因はゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素をコードする *BTS1* 遺伝子の発現量が低いためと推定し、発現量が多いファルネシルニリン酸合成酵素をコードする *ERG20* 遺伝子との融合遺伝子を設計し *HMG1* 遺伝子と共に高発現させたところ、高い GGOH 生産が得られた。さらに、ピルビン酸バイパス経路の代謝産物である酢酸 (アンモニウム塩) とエタノールをグルコースと共に用いた流加培養を行うと、同組換え体による GGOH の生産量は 2.50 g/l に達した。

以上、プレニルアルコールの生産に適する培養法を始めとする細胞外環境からのアプローチと分子生物学的手法を用いた細胞内の最適化アプローチの両面から生産方法を最適化することで、プレニルアルコールの工業生産のための基盤が確立された。

氏 名	村 松 正 善
-----	---------

(論文審査の結果の要旨)

プレニルアルコールはビタミン K、ビタミン E、コエンザイム Q などに代表されるファインケミカルまたは医薬品原料として用いられている。現在、香料以外のこれらの化合物は化学合成によって生産されているが、複数ある二重結合を選択的にイソプレレン分子に導入することの困難さから量産が難しいという課題があった。本研究はプレニルアルコールを発酵生産することを研究対象としている。プレニルアルコールの生産に適する培養法を始めとする細胞外環境からのアプローチと遺伝子組換え技術を用いた細胞内の最適化アプローチの両面から効率的な生産方法の確立について検討したものである。以下、本研究の主な成果を挙げる。

- (1)これまで自然界からプレニルアルコールを生産する微生物が単離された報告はなかったが、GC/MS を用いた高感度分析により多くの微生物でごくわずかにプレニルアルコールが産生されることを見いだした。さらに、大豆油を始めとする油脂、界面活性剤、消泡剤を添加したグルコース培地を用いることによりプレニルアルコールの蓄積量が上昇すると同時に、菌体外に分泌されることを見出している。また、テルペノイド生合成阻害剤であるスクアレン合成酵素阻害剤、カロチノイド生合成阻害剤、エントカウレン合成酵素阻害剤を培地に添加してプレニルアルコールを生産させることが可能なことも明らかにしている。これまでプレニルアルコールを微生物生産することは困難であったが、これらの結果は、培養方法の検討等により細胞外環境条件を整えればある程度生産できることを示す知見である。これはプレニルアルコールの発酵生産の可能性を実証するものである。

(2) 遺伝子組換えの方法を用いた細胞内の最適化アプローチを行い、プレニルアルコール生産酵母を創製することに成功した。特に、*S. cerevisiae* A451 株を宿主として、*HMG1* 遺伝子の高発現で FOH が、*HMG1*、*BTS1* と *ERG20* 遺伝子の共発現で GGOH が生産されることを示した。これらの成果は、遺伝子と宿主株との組合せでプレニルアルコールを特異的に生産できることを示すもので、代謝工学的視点と工業的応用の観点から意義深い知見である。また、*ERG20* と *BTS1* 遺伝子を融合させることにより効率的に GGOH を合成できることを明らかにした。これは一連の連続酵素反応を細胞内で効率的に行うためには融合酵素として発現させることが効率的であることを示すものであり、代謝工学的手法を用いた種々の有用物質の発酵生産へも利用しうる価値の高い知見である。さらに、ピルビン酸バイパス経路の代謝産物を用いた流加培養によって、GGOH の生産量を工業レベルで適用可能な濃度にまで高めたことは実用的な観点からも意義深い。このように、本論文で確立された方法は、プレニルアルコールの一般的な微生物生産法となり得るものである。また、プレニルアルコール以外の油状物質を微生物で生産する上でも参考になる知見が多い研究である。

以上の成果は、発酵生理学的手法と代謝工学的手法による分子育種により、従来発酵生産が困難であったプレニルアルコールの工業的生産法確立への道を拓いたものであり、応用微生物学領域での価値ある成果として評価できる。

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、平成 21 年 1 月 15 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。