

(別紙1)

## 論文内容の要旨

申請者氏名 辻本 敏博

*Corynebacterium glutamicum* は、有用物質であるイソブタノールに対して高い耐性と他の有用微生物を凌ぐ高い生産性を示すことから、イソブタノール生産の宿主として有望な細菌である。しかしながら、イソブタノールの細胞毒性によって、その生産量は2%程度に留まっている。当研究室では、培地中からイソブタノールを除去することで、その生産量が向上することを見出しており、この知見はイソブタノール生産の効率化には細胞毒性の緩和が重要であることを示している。その方法の一つが宿主への耐性付与である。これまでに突然変異を利用したアルコール耐性株の育種が行われてきたが、耐性の向上は必ずしも生産性の向上に繋がっていなかった。生産性向上を目指した戦略的な耐性付与には、耐性機構を分子レベルで解明することが重要である。

本研究では、*C. glutamicum* のトランスクリプトーム解析によって、イソブタノールに応答して発現が変化する遺伝子を明らかにした。その発現パターンから、トリプトファン生合成遺伝子の発現を制御するアテニュエーション、ロイシン生合成遺伝子の転写制御因子 LtbR、NAD 生合成遺伝子の転写制御因子 NdnR、シキミ酸利用遺伝子の転写制御因子 QsuR が、イソブタノールに応答して制御下の遺伝子の発現を変化させることが示唆された。また、*C. glutamicum* の様々なストレス応答に関与するシグマ因子 SigB および SigE をコードする遺伝子 (*sigB* および *sigE*) の発現が大きく上昇していることが見出された。そこで、これら遺伝子の欠損株を構築し、イソブタノール耐性への影響を検証したところ、*sigB* 欠損株はイソブタノールに対して感受性を示すことが明らかとなった。*sigE* 欠損株ではイソブタノール感受性への影響は見られなかったが、イソブタノールに応答した *sigB* の発現上昇が著しく低下することが示された。さらに、*sigE* は *sigB* 以外にもイソブタノールに応答して 12 遺伝子の発現を制御していることが判明した。

次に、*sigE* の発現制御機構を解析する目的で、近縁種 *Mycobacterium tuberculosis* の知見に基づき二成分制御系に着目し、その解析を行った。その結果、リン酸欠乏応答を制御する二成分制御系 *phoSR* はイソブタノールにより発現が強く誘導され、*phoSR* 欠損株では *sigE* のイソブタノール応答が完全に消失することが見出された。さらに、PhoSR はイソブタノールと同様に「細胞表層ストレス」と考えられるエタノールや SDS に対するストレス応答にも関与していることが示された。これらの結果から、イソブタノールストレス応答に PhoSR が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上、本研究では *C. glutamicum* におけるイソブタノール耐性に寄与するストレス応答機構の一つとして、二成分制御系 PhoSR およびシグマ因子を介する転写制御ネットワークを見出した。本転写制御ネットワークの制御下には、*C. glutamicum* のイソブタノール耐性に関与する重要な遺伝子が含まれていると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 辻本 敏博

近年、バイオイソブタノールは、ガソリン代替、ジェット燃料や各種化学品の原料として期待されているが、その強い細胞毒性によって、これまで微生物による最終生産濃度は2%程度に留まっている。有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* は他の微生物と比較して、イソブタノールに対して高い耐性を示すことから、生産宿主として有望である。申請者の所属研究室ではこれまでに、遺伝子組換え型 *C. glutamicum* により世界最高の生産性を達成しているが、工業生産の実現にはさらなる生産性の向上が必要である。その方法の一つとして、菌体を含む反応液から連続的にイソブタノールを溶媒層に除去し、反応液中のイソブタノール濃度を低く抑える方法(溶媒重層法)により、飛躍的に生産性が向上したことから、宿主へのイソブタノール耐性付与が考えられる。申請者の所属研究室では、*C. glutamicum* へイソブタノール耐性の付与を試みている。一つは、ミューテーター法により取得したイソブタノール耐性株の全ゲノム解析と各変異の機能解析に基づき、耐性に関与する有効な変異を同定し、親株に導入することで理想的なイソブタノール耐性株を取得する方法である。もう一つは、細胞のイソブタノール応答機構を解明し、その機構を強化することでイソブタノール耐性を付与する試みである。申請者は、本研究において後者の手法を担当し、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) トランスクリプトーム解析により、イソブタノールに応答してトリプトファン合成遺伝子の発現を制御するアテニュエーション、ロイシン合成遺伝子の転写制御因子 *LtbR* が、それぞれ制御下の遺伝子の発現を変化させることが示唆された。
- 2) イソブタノールに応答して、シグマ因子 (*SigB*, *SigE*) をコードする遺伝子 (*sigB*, *sigE*) の発現が大きく上昇することを見出した。*sigB* 欠損株はイソブタノールに感受性を示し、*sigE* 欠損株では感受性に影響はなかったが、*sigB* のイソブタノールに応答した発現上昇が著しく低下していた。さらに、*sigE* は *sigB* 以外にもイソブタノールに応答して 12 遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。
- 3) リン酸欠乏応答を制御する二成分制御系 *phoSR* は、イソブタノールにより発現が強く誘導され、*phoSR* 欠損株では *sigE* のイソブタノール応答が完全に消失したことから、イソブタノールストレス応答機構の一つとして、*PhoSR* およびシグマ因子を介する転写制御ネットワークを見出した。本転写制御ネットワークの制御下には、イソブタノール耐性に関わる重要な遺伝子が含まれていると考えられる。

以上のように、本論文はこれまで未知であった *C. glutamicum* におけるイソブタノール応答機構の一端を明らかにし、新たな仮説を提唱したものであり、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。