

Title	長期植え継ぎ培養を用いた大腸菌のエタノールストレスへの適応に関する研究
Author(s)	堀之内, 貴明
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1470
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ほりのうち たかあき 堀之内 貴明
博士の専攻分野の名称	博士(情報科学)
学位記番号	第 24671 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 情報科学研究科バイオ情報工学専攻
学位論文名	長期植え継ぎ培養を用いた大腸菌のエタノールストレスへの適応に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 清水 浩 (副査) 教授 松田 秀雄 教授 四方 哲也 教授 前田 太郎

論文内容の要旨

微生物を用いた物質生産の際には様々なストレスが生じ、生産性が低下するということが問題となる。そのため、ストレス環境下でも高い増殖速度を示すストレス耐性株の育種が求められている。ストレス耐性株を育種する際には、ストレスに強い株とそうでない株との比較から、ストレス耐性に関与する情報を取得するという方法がしばしば用いられる。しかしながら、対象とするストレス種や目的物質によっては、リファレンスとすべき株が存在しない場合もある。そこで本研究では、このような場合にも有効な手法として、微生物の持つ環境適応能力を利用してストレスに適応した株を取得し、これと元の株との比較により育種のための基盤を与えるという方法について研究を行った。研究にはモデル生物である大腸菌を用い、近年バイオ燃料として注目されているエタノールによるストレスを題材として、長期植え継ぎ培養系によるストレス適応株の取得と、遺伝子発現情報に基づく株間の比較を行った。複数得られたストレス耐性株の遺伝子発現情報より、ストレスに耐性付与を行う遺伝子、代謝経路の抽出を行った。

本学位論文は第1章から第6章より構成される。第1章では本研究の背景と目的、および本論文の構成について記述した。第2章ではストレスに対する適応株の取得について記した。エタノールストレス環境における長期植え継ぎ培養により、比増殖速度が上昇した6株(適応株)を得た。第3章では、第2章で得た適応株と親株の、遺伝子発現情報の解析について記した。適応株と親株についてエタノール存在下および非存在下の2条件における網羅的遺伝子発現量の解析を行った。その結果、適応株ではアミノ酸(Trp, His, Ileなど)の合成が活性化していることが示唆された。また、適応現象の過程で代謝状態の変化が生じていることが示唆された。第4章では代謝ネットワークに着目した遺伝子発現データの解析手法の構築と、ビール酵母のマイクロアレイデータを用いた有効性の検証について記した。第5章では、第4章で構築した代謝ネットワークに着目した解析手法による、大腸菌エタノールストレス適応株と親株の遺伝子発現データの解析について記した。解析の結果、ピルビン酸を中心とするTCA回路近傍の代謝反

応に関わる遺伝子の発現量が、エタノールストレスの有無や、適応株と親株の比較において変化していることが見出され、エタノールストレスによって引き起こされる現象を代謝状態の変化という観点から明らかにすることができた。第6章では本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望について述べた。このように、長期植え継ぎ培養によってストレス適応株を取得し、それを解析するという手法により、ストレス耐性に関する知見を得ることが可能であることを示すことができた。

論文審査の結果の要旨

微生物を用いた物質生産においては、バイオプロセス中で発生する環境ストレスが原因で細胞の増殖能が低下することが問題となる。本研究では、ストレス環境下においても高い増殖速度を示すストレス耐性株の育種を目的とし、微生物の持つ環境適応能力を利用してストレスに適応した株を取得し、親株との遺伝子発現量の網羅的比較により育種のために重要な因子を探索する基盤を与える方法について研究を行っている。

本研究では、まず、大腸菌によるバイオエタノール生産で問題となる高エタノール濃度によるストレス環境において、長期植え継ぎ培養を行って、比増殖速度が適応的に上昇した6株（適応株）を実験的に得ることに成功している。

得られた適応株と親株について高エタノール濃度下およびエタノール非存在下において、DNAマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現量の解析を行っている。主成分分析により耐性賦与のための重要因子を探索し、ストレス応答を示す遺伝子発現量変化と適応による遺伝子発現量変化を切り分けて解析することに成功している。これらの情報からストレス環境下で増殖を改善させる培養法を考案し実験的に検証している。

また、代謝ネットワークの解析システムを構築し、ビール酵母のDNAマイクロアレイデータを用いた有効性の検証している。構築された代謝ネットワークに着目した解析手法により、大腸菌エタノールストレス適応株と親株の遺伝子発現データの解析を行い、エタノールストレスによって引き起こされる現象を代謝状態の変化という観点から明らかにしている。

以上のように、本論文では、工業有用微生物のストレス耐性を賦与することを目的として、ストレス環境下で適応株を取得し、その遺伝子発現の変化を詳細に解析し、耐性を賦与する因子の探索に成功している。このような方法は、大腸菌のエタノール耐性のみならず、多くの有用微生物に適用可能であると考えられる。また、今後、生物システムの全体像を理解する上で重要な貢献をもたらすものである。よって、博士（情報科学）の学位論文として価値あるものと認める。