

Title	Studies on Modification of Microbial Cells by Using Stress-responsive Genes
Author(s)	尾島, 由紘
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49620
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	お尾 じま よし ひろ 尾 島 由 紘
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 2 2 9 9 8 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学位論文名	Studies on Modification of Microbial Cells by Using Stress-responsive Genes (ストレス応答性遺伝子を用いた微生物細胞の改変に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教 授 田 谷 正 仁 (副査) 教 授 久 保 井 亮 一 教 授 上 山 惟 一 准 教 授 西 岡 求

論 文 内 容 の 要 旨

二酸化チタン光触媒による酸化ストレスに対する大腸菌や麹菌などの微生物細胞の生理応答を解析した。得られた結果を基に、新規ストレス応答遺伝子を用いた微生物細胞の改変を行い、組み換えタンパク質生産やアミノ酸発酵の効率向上を実現した。第1部では、増殖能力の低下が著しい大腸菌のSOD欠損株に対して二酸化チタン光触媒による酸化ストレスを加えることで、かえって増殖速度が向上し、理由として中枢代謝経路が嫌気代謝側に移行していることや新規ストレス応答性遺伝子の発現が誘導されることを見出した。さらに、真核微生物である麹菌においても大腸菌の場合と同様に、二酸化チタン光触媒からの刺激による増殖の向上が引き出され、酸化ストレス応答性遺伝子の高発現が確認された。第2部では、二酸化チタン光触媒の刺激に対する応答が確認された大腸菌の新規ストレス応答性遺伝子の1つである*yggE*遺伝子と、反応の副産物として過酸化水素を生成し細胞を損傷する酵素モノアミンオキシダーゼ(MAO)を同時に大腸菌細胞内で発現させたところ、*yggE*遺伝子との共発現条件下でMAOの発現量が向上し、またそのときの細胞生存率も高く維持できることを示した。次に、大腸菌の4つの新規ストレス遺伝子(*yfiD*, *yggB*, *yggE*, *yggG*)を野生型大腸菌に組み込み中枢代謝に与える影響を試験した結果、*yggG*遺伝子組み換え株では、酢酸生成経路に対して分岐代謝となるTCA回路の活性が低下するにもかかわらず酢酸生成が抑制され、中枢代謝経路においてボトルネックが形成された。さらに、この効果の応用として、アミノ酸の一種であるフェニルアラニン生産大腸菌に*yggG*遺伝子を組み換えることで、副代謝生成物である酢酸の生産を抑制しフェニルアラニンの収率を大幅に向上させることに成功した。また、*yggG*遺伝子欠損株の培養特性や中枢代謝経路の活性を調べたところ、欠損株は培養中に酢酸を蓄積し、この原因として酢酸の取り込みを行う制御因子の発現バランスが崩れていることが確認され、*yggG*遺伝子が酢酸生成やその取込みに深く関与していることを示した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

SOD欠損大腸菌に対してTiO₂光触媒による非致死的な酸化ストレスを負荷し、増殖速度の向上、中枢代謝経路の嫌気的応答へのシフト、ストレス応答性遺伝子の発現誘導が起こることを見出した。このTiO₂光触媒の増殖促進効果は、真核微生物である麹菌でも認められ、生理応答として、酸化ストレス応答性遺伝子の高発現が確認された。高発現が確認された大腸菌の新規ストレス応答性遺伝子の1つである*yggG*遺伝子について、過酸化水素の発生により細胞損傷を誘起するモノアミンオキシダーゼとの共発現系を構築したところ、*yggG*遺伝子との共発現細胞では本酵素の活性が著しく向上し、細胞生存率も高く維持できることを示した。次に、大腸菌のストレス応答性遺伝子(*yfiD*, *yggB*, *yggE*, *yggG*)を野生型大腸菌に導入した。その結果、*yggB*, *yggE*, *yggG*組換え株では、主要な副産物である酢酸の生成が抑制され、特に、*yggG*組換え株においては、酢酸生成経路に対する分岐点となるTCA回路への導入遺伝子の発現が低下しているにもかかわらず、酢酸生成が抑制され、中枢代謝経路においてボトルネックが形成されることが分かった。このような*yggG*遺伝子機能の応用として、L-フェニルアラニン生産大腸菌に対する*yggG*遺伝子多量発現の効果を調べた。その結果、*yggG*を組み込むことにより、酢酸の生産を抑制しL-フェニルアラニンの収率を大幅に向上させることに成功した。さらに、*yggG*遺伝子の機能を明らかにするために、*yggG*欠損大腸菌の培養特性や中枢代謝経路の遺伝子発現を調べた。*yggG*欠損株は、培養中に著量の酢酸を蓄積することが判明し、この原因として酢酸取込みの制御因子の発現バランスが乱れていることが分かり、*yggG*遺伝子は酢酸生成やその資化に深く関与していることを示した。

以上、本論文は、微生物細胞の酸化ストレス応答から得られた新規遺伝子の機能を解明し、その利用による組換えタンパク質やアミノ酸の生産効率の向上を図る新たな細胞設計手法を開拓したものであり、博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。