

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 貴子

本論文は、土壌から単離される C1 資化菌の多くが細胞外多糖 (EPS) 生産能を有していることに着目し、このような能力を有する C1 資化菌を用いて安価な有機化合物であるメタノールから糖物質の発酵生産を試みたほか、その多糖合成系遺伝子を単離、解析したものであり、全四章から構成される。

第一章では、微生物による EPS 合成機構に関する現在までの知見のほか、C1 化合物の有用性や C1 資化菌の特異な代謝経路について詳しく述べている。

第二章では、土壌より EPS 生産能を有する 12S 株を単離し、その属を絶対メタノール資化菌 *Methylobacillus* 属と同定し、さらに、12S 株が生産する EPS “メタノラン” の構成糖比を  $\text{glucose} : \text{mannose} : \text{galactose} = 2.6 : 1.0 : 1.0$  と同定している。*Methylobacillus* 属細菌で、多糖生産が観察されている菌株については、その全てが polyglucose であることから、12S 株は同属の新種である可能性が示された。

第三章では、12S 株にトランスポゾン 5 (Tn5) 変異を導入することで、メタノールを基質として単糖・オリゴ糖を生産する変異株の構築を試みた結果、得られた 11 種の EPS 合成能欠損変異株の内、3 株が培地中に著量の還元糖を蓄積することを見出している。さらに、これら変異株が蓄積する糖は、メタノランの主要構成糖であるグルコースの他、4 炭糖であるエリスロース、スレオース、さらに構造未決定の 2 糖であることを明らかにした。従来の発酵技術では、C1 化合物を基質とする場合、生産菌株は C1 資化菌に限られており、自ずと生産可能な物質種にも制限が生じていたが、得られた変異株とそのほかの有用物質生産株とを 2 段階発酵することで、多様な物質をメタノールから生産し得ることが示された。また、エリスロース、スレオースといった四炭糖を醗酵生産する系については未だ報告例が無いことから、これら菌株は、新種糖質生産菌株としても意義深いことが示唆されている。

第四章では、構築した EPS 合成能欠損変異株 Ma1 株の Tn5 挿入周辺領域をクローン化し、約 10.0-kb の遺伝子領域について塩基配列を決定した結果、多糖合成に関わると推測される 7 個の遺伝子 *epsABCKLDE* の存在を明らかにしている。また、糖転移酵素、輸送タンパク質とそれぞれ相同性を示した EpsB、EpsE、機能未知の EpsC は、遺伝子破壊の結果、メタノラン合成に必須であることが示され、メタノラン合成系遺伝子が少なくとも 2 つのオペロンにコードされていることが明らかとなった。特に EpsB については、lipid carrier へ最初の糖を転移する glucose-1-phosphate transferase であることを明らかにした。さらに、これら EpsB および EpsD は、いずれも大腸菌で提唱されている Wzy 依存型夾膜多糖合成モデルに関与する各タンパク質と相同性を有していたことから、メタノランも本モデルと類似の機構により合成される可能性が示された。LuxR superfamily に属する転写制御タンパク質と有意な相同性を示した EpsA は、遺伝子破壊の結果、メタノラン合成に関与していることが示されたほか、EpsA の構成的な発現は、メタノランの過剰生産を引き起こすことが観察され、本因子がメタノラン合成系遺伝子の正の

転写制御に関わることが強く示された。一方、cAMP-binding motif を保存する EpsK と、ペリプラズムに局在する folding catalyst である peptidyl prolyl isomerase と相同性を示した EpsD はメタノラン合成に必須ではない、もしくは代替する機能を有するタンパク質が他に存在することが示された。

以上、本論文は、土壌より高分子の中性多糖“メタノラン”を生産する *Methylobacillus* sp. 12S 株を単離し、その多糖構造を明らかにした。また Tn5 変異を用いて、メタノールから単糖やオリゴ糖を生産する菌株の構築に成功し、さらに Tn タギングにより、メタノラン合成に関わる2つの遺伝子群を単離、解析した。多糖生産能を有する多くの C1 資化菌が現在までに単離されているが、その遺伝子情報を明らかにした例は本研究が初めてであり、当該分野に新知見を与えたものとして学術上、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（農学）の学位論文として価値あるものと判断した。