

# 論文審査の結果の要旨

氏名 桑原 (朝倉) 陽子

本論文は5章からなり、第1章が序、第2章から第4章が結果と考察、第5章が総合考察となっている。

第1章では、微生物育種のための微生物ゲノム改変について、特に、合理的にデザインするアプローチと進化的なアプローチについて、その方法と関連する基礎的な研究の歴史や現状が説明されており、本研究全体の導入となっている。

第2章では、*Corynebacterium glutamicum*のグルタミン酸生成機構の解明とグルタミン酸発酵への応用について述べられている。*C. glutamicum*はグラム陽性桿菌で歴史的にグルタミン酸発酵等に用いられているが、そのグルタミン酸過剰生成機構は未解明であった。申請者は、*C. glutamicum*の2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC)のE1 $\alpha$ サブユニットをコードする*odhA*遺伝子の欠損株を構築し、*C. glutamicum*のグルタミン酸過剰生産にはODHC活性の欠損または弱化による代謝改変が有効であることを明らかにした。さらに、*odhA*遺伝子欠損株ではグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が律速であることを見出し、本酵素活性を調節して2-オキソグルタル酸からグルタミン酸への代謝フラックスを最適化することによりグルタミン酸生産が向上することを示した。また、*C. glutamicum*に特有なグルタミン酸過剰生成誘導処理と代謝変化との関係についても解析し、これらの誘導処理の作用について考察している。

第3章では、制限修飾遺伝子を用いたゲノム進化工学について述べられている。申請者は、*Escherichia coli*で、制限修飾遺伝子を用いてゲノム進化を加速させて適応進化実験を行った。まず、*E. coli*で、制限修飾遺伝子の脱落に起因する染色体DNA損傷により細胞死が引き起こされる際の遺伝子発現変化を解析し、制限修飾遺伝子による自己選択とゲノム再編の可能性を示唆する結果を得た。また、この染色体損傷から細胞死/溶菌に至る過程での遺伝子発現変化を解析し、この過程において、制限酵素による染色体DNA切断、SOS誘導、DNA二重鎖切断修復やDNA組換え修復遺伝子の活性化、*rpoE*( $\sigma^E$ の遺伝子)と $\sigma^E$ レギュロンの誘導、染色体複製の抑制、ペリプラズムストレスや酸化ストレス等を含むストレスへの応答、エネルギー代謝の抑制、細胞膜合成の抑制、細胞膜の崩壊と溶菌が起こっていることを示唆する結果を示した。*rpoE*の発現上昇から示唆された様に、この細胞死の際に溶菌が起こっていること、さらに、細胞死誘導後に発現上昇が見られた $\sigma^E$ レギュロンの遺伝子を過剰発現させると溶菌が起こることを明らかにした。

次に、制限修飾遺伝子によってゲノム再編が促進され進化が加速されることを示し、これを利用して*E. coli*の細胞集団をモデル培養環境に適応進化させ生育を向上させた。適応進化の各段階から単離したクローンを用いて、ゲノムやトランスクリプトームの変化を解析することにより、菌体形成やエネルギー効率向上のみでなく、細胞間情報伝達やアミノ酸飢餓への応答を介した増殖への負の制御の解除等に関与する、6種類の変異を同定し、

適応進化による生育向上が、これらの変異の協調的な働きによることを示した。

第4章では、第2章及び第3章の結果に基づき、微生物育種において合成生物学的手法と進化的手法を相補的に用いることの有効性が検証されている。例として、第2章で用いた ODHC の変異によるデザインされた生合成系改変に、第3章で同定された変異を組み合わせることにより、グルタミン酸の生産能が上がることを示されている。

以上の様に、本論文は、長い間未解明だった *C. glutamicum* のグルタミン酸生成機構の解明に大きく寄与した。また、制限修飾系によって微生物の実験進化をドライブできることを示して、ゲノム進化工学という新規性の高い方法論を開発したのみでなく、微生物ゲノム進化の機構やプロセスの理解に寄与している。さらに、これらの得られた知見を統合的に用いてバイオ産業への応用を達成している。

なお、本論文の第2章は木村英一郎、臼田佳弘、河原義雄、松井和彦、大住剛、中松亘との、第3章は小林一三との、第4章は児島宏之、小林一三との共同研究であるが、何れも論文提出者が主体となって研究の立案と遂行を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。