

## 学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目 (Dissertation Title)	<b>Study on thermotolerant mechanisms of thermotolerant acetic acid bacteria by experimental evolution</b> (耐熱化育種酢酸菌の耐熱化機構に関する研究)
氏 名(Name)	松本 奈実

酢酸菌は、グラム陰性の絶対好気性菌で、自然界では植物の花や果物に生息し、果実の腐敗に関連して様々な(自然)発酵にも関与している。酢酸菌は、細胞膜表層にある酵素によって糖やアルコールを酸化する酸化発酵を行う特徴を持ち、酢酸発酵やソルボース発酵等の産業的な発酵にも用いられている。しかし、大規模な発酵装置を用いた発酵では、機械熱や発酵によって生じる熱が、菌の生育や発酵能力を阻害するため、厳密な温度コントロールが必要となっている。そこで、耐熱性を有する微生物を用いて厳密な温度制御を必要としない発酵を行うことが出来れば、エネルギーやコストを削減でき、脱炭素社会の実現に貢献しうる新しい発酵技術となることが期待できる。そのため、常温性の発酵微生物を耐熱化する育種技術の開発と得られた耐熱化株の耐熱化機構の解明が望まれている。

本研究では、耐熱化機構を解明するために、いくつかの酢酸菌を実験室進化の手法を用いて高温発酵条件下で耐熱性を示す耐熱化育種株を得て、その耐熱化機構を解析した。CHAPTER 1では、*Gluconobacter* 属、CHAPTER 2、3では *Acetobacter* 属の酢酸菌を用い、さらに CHAPTER 3では、実用的な発酵条件と菌株を用いて、高温酢酸発酵能を持つ実用株の取得とその実用化発酵試験を行った。

CHAPTER 1では、ソルボース発酵性酢酸菌 *Gluconobacter frateurii* CHM43 株の耐熱化育種株の耐熱化機構について解析した。この耐熱化株は、ゲノム上の多剤耐性輸送体の一塩基挿入によるフレームシフト変異が唯一の変異であった。そこで、人工的に多剤耐性輸送体の一塩基を挿入した株(Wild-G)を作製し、その耐熱性が向上することを確認した。同時に、細胞内でトレハロースの蓄積が観察されたことから、多剤耐性輸送体はトレハロースの排出に関与しており、トレハロースの菌体内蓄積が耐熱性を導くと予想した。そこで、トレハロース合成経路破壊株( $\Delta$ *otsAB*)を作製したが、予想に反してトレハロースを生成しないにも拘らず、耐熱化株よりも高温での生育能が向上した。 $\Delta$ *otsAB* は、野生株や Wild-G 株に比べ、より多くの酢酸を最終代謝産物として生成するようになったことから、トレハロースの細胞内蓄積は、代謝フラックスを変動させ、ペントースリン酸経路への炭素の流入を増加させたと予想した。予想通り、Wild-G の NADPH/NADP<sup>+</sup>比は野生株よりも高く、 $\Delta$ *otsAB* では、さらに大幅に増加していた。加えて、NADPH/NADP<sup>+</sup>比の上昇に比例して、細胞内 ROS レベルが低下することも明らかとなった。これら結果より、耐熱化株では、輸送体の変異によって NADPH 生成を増加させる代謝変動が引き起こされ、そのことによって耐熱性が向上したと結論づけた。

CHAPTER 2では、酢酸発酵菌株である *Acetobacter pasteurianus* IFO 3283-32 の耐熱化育種を酢酸発酵条件下で行い、37°C から 40°C まで段階的に温度を上昇させて 6 株の耐熱化株を取得した。これらの耐熱化株は、高温での酢酸発酵能が上昇している代わりに低温域ではその発酵能が低下するトレードオフの関係を示した。ゲノム解析と PCR シーケンス解析によって、最終適応株では、11 箇所の変異と 64-kb の大規模ゲノム欠失、1 プラスミドの欠失が明らかとなった。耐熱化株の特徴から、大規模領域(多数の ribosomal RNA や tRNA 遺伝子が含まれる)の欠失と DNA polymerase (11 箇所の変異のうちの 1 つ)の変異が耐熱化に大きく寄与していることが示唆された。この耐熱化株の生理学的な特



徴と遺伝子変異の関係について他の *A. pasteurianus* 株の耐熱化株の特徴と比較した結果、この株では複製や翻訳を抑え細胞増殖を緩やかにすることで高温ストレスを回避し、引き替えに中温域での生育能が相対的に低下するようになったと考察した。

上述の CHAPTER 1 や 2 では、耐熱化育種を栄養豊富な実験用培地条件で行ったが、このような栄養豊富な培地で耐熱化育種した株は実際の食酢醸造に用いられている低栄養な“米もろみ”培地では、耐熱性が低いことが明らかとなった。そこで、CHAPTER 3 では、“米もろみ”のような実用的な培地で高温発酵できる株を単離するために、実用的酢酸発酵に用いられている株 *A. pasteurianus* K-1034 を用いて擬似“もろみ”培地で耐熱化育種を行い、2つの耐熱株 RH と SY を取得した。2つの耐熱化株は、低栄養培地条件下のフラスコ培養では 40°C、jar fermentor 培養では 39°C で酢酸発酵を行うことが可能であった。これらの株の変異箇所を特定したところ、RH と SY 株は、5ヶ所の重複を含む、それぞれ 7 及び 6ヶ所の変異を有していた。これらの耐熱化育種株を、先行研究で取得された低栄養適応育種株 G-40 株とともに、実用的な「高通気酢酸」発酵装置である‘Acetofermenter’を用いて“米もろみ”での高温酢酸発酵を試験したところ、親株が全く発酵できない 37°C において効果的な食酢醸造が行えることが明らかとなった。

## 学位論文審査の結果及び試験，試問の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	松本 奈実
審査委員	主 査： 薬 師 寿 治
	副 査： 井 内 良 仁
	副 査： 星 田 尚 司
	副 査： 高 坂 智 之
	副 査： 片 岡 尚 也
論文題目	Study on thermotolerant mechanisms of thermotolerant acetic acid bacteria by experimental evolution (耐熱化育種酢酸菌の耐熱化機構に関する研究)
<p>【論文審査の結果及び試験，試問の結果】</p> <p>(1) 学位論文審査の結果について</p> <p>松本奈実氏による学位論文「Study on thermotolerant mechanisms of thermotolerant acetic acid bacteria by experimental evolution (耐熱化育種酢酸菌の耐熱化機構に関する研究)」について，その論文審査と口頭発表による最終試験を行った。本学位論文は，三章構成となっており，グルコノバクター属（第一章）とアセトバクター属（第二，三章）酢酸菌の耐熱化株を取得し，その発酵特性を調査した。耐熱化獲得機構の解明に向かって，遺伝子工学，分子生物学，生化学的なアプローチで解析した。学位論文について審査委員による審査が行われ，研究内容の説明が口頭により行われた。その後，審査委員ならびに出席者からの質問に対して的確に回答した。これらの結果から，本論文が高度な内容を有していること，また本人が十分に本研究内容を理解して主体的に本研究を推進したことが明らかになった。また，本研究は，本人の独創的な発想と研究によって行われたものと判断された。</p> <p>以上のことより，松本奈実氏による本研究は十分に博士号を与えるにふさわしい内容を有するものと判定された。</p> <p>(2) 試問の結果について</p> <p>6 月 10 日，専攻関連分野及び外国語（英語）について口頭で試問を行った。専攻関連分野について，微生物学，遺伝子工学と生化学についての質問に明確に回答するなど微生物の生理，発酵や代謝に深い知識を有することを確認した。また，外国語（英語）についても実験方法についての英語による質問に対し明確に回答があったほか，英語での筆頭論文を 3 編有することなどを踏まえたうえで，十分な英語能力を有することを確認した。</p> <p>以上のことより，本学大学院の博士課程を修了した者と同等以上の学力を有することを確認した。</p>	