

## 論文審査の結果の要旨

氏名：瀧原 速仁

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：培地/アルカン二相培養系における *Rhodococcus* 属細菌細胞の局在性の制御に関する研究

審査委員：(主査) 教授 砂入 道夫

(副査) 教授 上田 賢志

教授 片山 義博

准教授 岩淵 範之

本論文は、将来的に環境負荷低減型社会を目指す上で重要な技術であるホワイトバイオテクノロジー (WB) や、汚染された環境を安価に浄化する方法であるバイオレメディエーション (BR) の効率化を目指した基礎的知見や応用的知見を得ることを目指している。そして、それらの技術の確立のための重要な課題の一つとして、宿主が特殊な有機溶媒耐性を有していることが求められると指摘し、*Rhodococcus* 属細菌が石油、塩素系有機溶媒などの難分解性化合物に対する高い耐性・資化能力を持っていることなどから、WB や BR の宿主菌として有用であると予想した。所属研究室の先行研究において、*R. erythropolis* PR4 株が高いアルカン耐性を有しており、また添加するアルカンの炭素数によってアルカン相における生育する位置をアルカン相内部で生育する「転移型生育」と、アルカン相表面で生育する「吸着型生育」とに変化させる性質を有していることが明らかにされていたことから、*R. erythropolis* PR4 株を中心に *Rhodococcus* 属細菌とアルカンとの総合的な理解を目指して研究に取り組み、以下の成果を得た。

まず第一章では、転移型生育を示すプリスタン (C19) 添加条件と吸着型生育を示すドデカン (C12) 添加条件では PR4 株の細胞内の代謝が大きく異なると予想し、全体的な細胞応答を把握できるショットガンプロテオーム解析によりタンパク質の発現プロファイルを比較、検討した。その結果、全体的にストレス応答タンパク質やリボソーム関連のタンパク質が多く検出されたが、条件特異的な全体的傾向は見いだされなかった。そこで、特に転移型生育を示す C19 添加条件で再現性良く高発現していた GroEL2 に注目し、PR4 株の *groEL2* 遺伝子をクローニングし、各種遺伝子操作株を作製した後、アルカン相内での生育や細胞の局在性に与える影響を検討した。その結果、GroEL2 の過剰発現が、細胞表面の親油性を上昇させ、親株が吸着型生育を示す C12 添加条件で転移型生育を示すことが確認された。この条件での生育を確認したところ、GroEL2 の過剰発現株は親株と比較して約 100 倍高かったことから、C12 存在下での生育が促進されていることが示された。また、これまでに親株が生存出来なかったオクタン (C8) 存在下において、その生存が促進されたことを確認した。以上のことから、第一章では、GroEL2 の過剰発現が同菌のアルカン耐性に深く関与していることを明らかにした。

第二章では、GroEL2 の過剰発現によるアルカン耐性促進効果が PR4 株以外の *Rhodococcus* 属細菌においても適応されるか否かの検討を行った。これに先行して *Rhodococcus* 属細菌 46 株の各種アルカン添加時の細胞の局在性を検討した結果、菌株固有の耐性レベルに違いはあるものの、供試した *Rhodococcus* 属細菌の大半がアルカン相内で生育できることを示した。また、各種 *Rhodococcus* 属細菌より *groEL2* 遺伝子をクローニングし、自株あるいは他の株で過剰発現させたところ、いくつかの株で *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性の向上が確認された。以上のことから、*groEL2* 遺伝子の過剰発現が *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性を向上させる有用な手法であることを示した。

第三章以降では、アルカン存在下での細胞の局在性を制御できる培養条件の検討を行った。外部因子によって細胞の局在性や耐性を制御することが可能であれば、WBの可能性をさらに広げることができると考え、本論文では分子遺伝学的な手法以外による *Rhodococcus* 属細菌の耐性向上技術や基質への親和性を制御する技術の開発を念頭に置き、具体的には、培地成分、特に無機塩類に着目した検討を行った。その結果、無機塩培地に C12 を添加した条件において、MgSO<sub>4</sub> の初期添加量、培養期間内での添加時期を調節することにより、*R. erythropolis* PR4 株の細胞の局在性を転移型から吸着型、吸着型から転移型へと制御できることを見出した。また同培養系で、一度吸着型を示した細胞に対し、アルカン相に C8、水相にグルコースを添加することで、C12 相表面に存在する細胞を一部水相側に遊離させることに成功した。以上の結果は、培地/有機溶媒の二相培養系において、培地成分の調節により細胞の局在性を自由に制御できる可能性を示しており、これらの培養制御技術は WB を効率化する上で重要であると考えられた。

以上のように、本論文では、グラム陽性細菌である *R. erythropolis* PR4 株を中心とした *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性機構の一端を明らかにし、*R. erythropolis* PR4 株の性質を利用したアルカンとの相互作用を調節する手法を開発した。これらの知見は、疎水性環境下で、生きた細胞を使った WB による物質生産技術の発展や、BR の効率化に大きく貢献できるものと考えられた。

本論文は、生きた微生物を利用した WB、BR にとって重要な課題の一つである有機溶媒への応答、耐性機構について検討を加えたものである。著者が冒頭で述べてある通り、*Rhodococcus* 属細菌は有機溶媒耐性と資化能力を有することから産業利用が期待される重要な菌群であるが、その有機溶媒耐性機構については、分解による無毒化と細胞外多糖による保護以外の機構について詳しく検討された例は少ない。このような状況下で、本研究は、*Rhodococcus* 属細菌のアルカン存在下における細胞応答の機構の一部を明らかにし、有機溶媒耐性を付与できる具体的な手法を提示した点は、学術分野、産業利用分野において評価に値するものとする。特に、*Rhodococcus* 属細菌の多くがアルカン相内部で生育できることを明らかにしたことから、本研究で得られた知見は、疎水性環境下における全般的な生命活動を理解する上で、今後の重要な手がかりになることが期待される。よって本論文は、博士 (生物資源科学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 27 年 1 月 26 日