

氏名 菅野 学
学位の種類 博士 (農学)
学位記番号 博 甲 第 7573 号
学位授与年月日 平成 27年 11月 30日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科 生命環境科学研究科

学位論文題目

Isolation and Physiological Characterization of Butanol-Tolerant Bacteria

(環境中のブタノール耐性細菌の探索と耐性機構の解明)

主査	筑波大学教授	農学博士	佐藤 誠吾
副査	筑波大学教授 (連携大学院)	博士 (理学)	花田 智
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	青柳 秀紀
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	中村 顕

論 文 の 要 旨

微生物によるブタノール発酵は、ブタノール自体が有する高熱含量及び低オクタン価といった特性から、次世代バイオ燃料の生産法のひとつとして有望視されている。しかし、その高い生物毒性が制約となり、微生物によるブタノールの発酵生産の開発は進んでいるとは言いがたい。本博士論文は、ブタノール毒性に対する耐性を示す新規微生物株の獲得や耐性機構の解明を通じて、この様な研究開発上の障害を克服することを目的としたものである。

現在、ブタノール生産の研究に用いられている微生物の耐性濃度は 2%程度が上限であり、自然環境中に棲息するブタノール耐性菌の探索も行われてきてはいない。そこで、コンポストや堆肥などの様々な環境試料を対象とした耐性菌の分離を広範囲に行った。その結果、2%以上のブタノールに十分な耐性を示す 16 株 (好気菌株 10 株、嫌気菌株 6 株) を新たに単離することに成功した。系統進化的解析から、これら新規分離株は従来のブタノール耐性菌とは異なる系統に属しており、且つ系統分類学的にいかなる既存菌株とも異なる新種であることが明らかとなった。特に、そのうちの 3 株は分子進化マーカーである 16S rRNA 遺伝子配列の相同率が 94%以下と低く、少なくとも新属とすべきものであることが示された。

高温メタン発酵槽より分離された絶対嫌気性菌株である GK12 株は、系統進化的解析により *Firmicutes* 門の *Erysipelotrichaceae* 科に属することが示されたが、最近縁の既存株との 16S rRNA 遺伝子配列の相同率は 91.8%と極めて低かった。類縁菌種との間に GC 含量や細胞膜脂肪酸構成、ペプチドグリカンのアミノ酸構成などに明確な差違が確認され、且つ糖などの基質資化性や酵素活性プロファイルにも明瞭な相違点が見られたことから、GK12 株を *Erysipelotrichaceae* 科に属する新属新種として *Catenisphaera adipataaccumulans* と命名した。

ブタノール耐性を有する新規分離菌株のうち、好気性の CM4A 株と嫌気性の GK12 株 (耐性濃度はそれぞれ 3.5%と 3.0%) の耐性機構を解明する目的で、ブタノールを暴露させた菌体の微細構造、細胞膜脂肪酸構成の変化を調べた。その結果、CM4A 株では莢膜の厚さの増加や飽和

脂肪酸と環状脂肪酸比率の増加が認められた。前者は細胞表層の親水度を増加させブタノールの菌体内への浸透を防ぐものであり、後者は膜安定性を向上させブタノールの影響を軽減する防御機構と判断した。同様の膜脂肪酸組成の変化による耐性機構はGK12株にも観察されたが、CM4A株とは若干異なっており、長鎖脂肪酸の比率を増加させ、膜の保全性を高めるという防御機構であることが示された。また、GK12株は長期間ブタノールに馴用させることにより、ブタノール耐性が強化されることを発見し、未知の耐性機構が関与している可能性が示唆された。

CM4A株を用いたブタノール耐性にpHが及ぼす影響を調べた結果、アルカリ側で優れた生育を示す本菌株が、同条件ではブタノールに対して著しく感受性が高まることが認められた。細胞膜脂肪酸構成の解析から、アルカリ条件へ適応するために短鎖脂肪酸含量が増加し、膜流動性を高めた結果、ブタノール耐性が低下したことが明らかとなった。加えて、GK12株がブタノール存在下、または高温条件で多量の飽和脂肪酸を細胞内に蓄積する現象を見出し、詳細な検討を行った結果、この現象はブタノールや高温といったストレスに起因する過剰な脂肪酸合成の結果であると結論した。

審 査 の 要 旨

次世代のバイオ燃料として期待されるブタノールではあるが、微生物による生産開発にはその生物毒性が大きな障害として立ちはだかっている。その障害克服のために、自然界からブタノールの毒性に対抗し得る耐性細菌を新たに取得しようとする試みは、これまで実施例がなく、挑戦的である。本論文では、様々な環境試料中から16株ものブタノール耐性菌を新たに発見しており、そのいくつかは3%を超えるブタノールに存在下でも十分に生育することを明らかにしている。また、これら新単離株は系統分類学的にも新規性が高く、その中の1株は新属新種 *Catenisphaera adipataaccumulans* として提案され、受理されている。更に、これら分離株を対象としたブタノール耐性機構の解明を試み、莢膜の厚さを増し、細胞表層の親水度を高めブタノールの浸透を防ぐ機構や、細胞膜の脂肪酸構成比を変え、膜安定性を向上させブタノールの膜への影響を軽減する機構が存在する事を明らかにした。特に前者は今まで報告がない新規な耐性機構であり、評価されるべき発見である。これらに加えて、ブタノール耐性に対するpHの影響についても詳細な検討を行い、アルカリ耐性とブタノール耐性が拮抗し合う関係にあることを示した。このような関係性を明確に実証したのは、本報告が初めてであり、バイオブタノール生産条件の設定に有用な情報となると考えられる。本論文の第6章では、分離菌株が多量の脂肪酸を蓄積することを明らかにしている。この蓄積は過剰な脂肪酸合成に因るものと推論しているが、菌体重量の1/4にも達する多量の脂肪酸蓄積はバイオディーゼル (FAME) 生産への応用が期待できる重要な研究成果である。

本論文で示された結果や考察は極めて価値が高く、次世代バイオ燃料のバイオブタノール生産研究における障害克服に寄与し、その開発を更に加速し得る有用な知見であると評価できる。

平成27年9月17日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。