

氏名	Juntila Darryl Joy Caceres		
学位の種類	博士 ( 学術 )		
学位記番号	博 甲 第 9 0 5 8 号		
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 5 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	Identification of a Signal Peptide and its Application in Genetic Engineering of the Thraustochytrid <i>Aurantiochytrium</i> sp. (スラウストキトリッド <i>Aurantiochytrium</i> sp. の分泌シグナルの同定とそれを利用した遺伝子工学)		
主査	筑波大学教授	博士 ( 農学 )	鈴木石根
副査	筑波大学教授	博士 ( 農学 )	中村顕
副査	筑波大学教授	博士 ( 理学 )	石田健一郎
副査	筑波大学助教	博士 ( 理学 )	吉田昌樹

## 論 文 の 要 旨

近年、石油に替わる液体燃料や工業原料の供給のため、バイオマスに由来する油脂の生産が注目を集めている。従属栄養性の海洋性真核微生物のラビリンチュラ類は、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA)、アラキドン酸 (ARA) などの多価不飽和脂肪酸を細胞内に高度に蓄積する特徴を持ち、 $\omega$ 3 脂肪酸の生産や油脂の高生産を目指した研究が行われている。また、ラビリンチュラ類のスラウストキトリッドに分類される *Aurantiochytrium* の中には、多価不飽和脂肪酸の他にトリテルペノイドのスクワレンを高度に蓄積する株も同定され、脂肪酸以外の油脂、特に炭化水素の高生産が可能な株として注目を集めているものも存在する。しかしながら、これらの微生物は従属栄養性であり、生育に必要な炭素源をいかに低コストで供給することができるかが、重要な開発要素となっている。廃液や廃棄物中の有機物を利用できることが望ましいが、本研究で着目しているスクワレン生産株は、グルコースやグルセリンなど一部の低分子有機物しか炭素源として利用できないことがわかっている。本論文の著者は、この *Aurantiochytrium* 株にセルロース資化能を賦与することを目指し、その初発段階としてセルロースの分解物である 2 分子のグルコースが  $\beta$ -1,6 結合で繋がった、セロビオースを唯一の炭素源として生育できる *Aurantiochytrium* 株の作出に取り組んだ。

まず第 1 章で著者は、*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株の培養過程で培地中に分泌されるタンパク質の同定を試みた。一般に先行研究でしばしば用いられている 2 種の培養条件、20°C の GTY (Glucose-Tryptone-Yeast extract) 培地と 30°C の M4 (Glucose-Peptone-Yeast extract-phosphate) 培地で培養し、培養上清を限外濾過膜で濃縮し、50~250 kDa のタンパク質を濃縮した。SDS-PAGE の結果、両培養条件でタンパク質のバンドパターンに明瞭な変化はなかった。そこで著者は、見かけのサイズが 250 kDa (Secreted protein 1; SP1) と 100 kDa (SP2) のタンパク質について、トリプシン消化後質量分析を行い、本微生物のドラフトゲノム配列と照合し推定タンパク質 LPD8921 と LPD1644 を同定した。それぞれタンパク質は 2353 残基と 1020 残基からなり、予測分子マスは 251 kDa と 110 kDa であった。分泌シグナルの解析ソフト SignalP を用いて、それぞれのタンパク質の N 末端にシグナルペプチド様配列が存在することを見出した。SP1 には、特徴的なアミノ酸配列のモチーフは見られなかったが、そのホモログは、*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株のドラフトゲノムに 1 つ (LPD8920)、および JGI の *A. limacinum* ATCC MYA-1381 株のゲノム配列中に 2 つ (Aurli1.3202 と Aurli1.3204) 見つかった。SP2 のホモログは MYA-1381 株には見られなかったが、18W-13a 株のドラフトゲノムには 1 つ (LPD1644) 見つかり、どちらも細胞接着に関わる因子に保存される vWF type A ドメインおよび PAN/APPLE-like ドメイン

をもつタンパク質であることが分かった。SP1 と SP2 の mRNA 蓄積量は、GTY 培地で高かったが、培養の全てのステージで検出され、構成的に発現する遺伝子であると推定できた。

第 2 章で著者は、第 1 章で見出した SP1 タンパク質の分泌のためのシグナルペプチドと糸状菌 *Aspergillus aculeatus* F-50 株の  $\beta$ -グルコシダーゼを融合した遺伝子を 18W-13a 株に導入し、細胞外に分泌させ  $\beta$  グルコシダーゼを機能させる系を開発した。野生型の 18W-13a 株の培養上清には  $\beta$ -グルコシダーゼ活性が認められないが、形質転換体 (AaBgl+株) では高い活性を示した。グルコースを炭素源とするときには、それぞれの株で生育に差は見られなかったが、セロビオースを唯一の炭素源とした場合、野生株は生育できなかったが、AaBgl+株は生育できた。A. *aculeatus* F-50 株の  $\beta$ -グルコシダーゼは至適温度が 50°C であるが、活性が至適条件の約 20% しかないとされる 30°C でも AaBgl+株は生育できた。またその至適 pH は 4~4.5 で、pH7 では 20% 程度の残存活性しかなく、pH8 では活性が認められないことから、pH をできるだけ低く (5.6 以下に) 保つことが AaBgl+株の良好な生育には重要であることを明らかにした。培地上清タンパク質の Native-PAGE、活性染色の結果、AaBgl+株では 150 kDa 付近に  $\beta$ -グルコシダーゼが見られることがわかった。本酵素は酵母細胞では 180 kDa、その他のカビでは 130 kDa に泳動されることから宿主細胞によって糖鎖等の修飾が異なる可能性が示唆された。野生株と AaBgl+株の脂質含量を比較したところ、大きな差は認められなかったことから、野生株が利用できない炭素源を用いての脂質生産の可能性は高いと思われた。

## 審 査 の 要 旨

著者は、油脂の産生能は高いが限られた炭素源しか資化できない、スラウストキトリッド *Aurantiochytrium* の主要な分泌タンパク質を同定し、自ら得たシグナルペプチド配列を用いてカビ由来の  $\beta$ -グルコシダーゼを培地中に分泌させることに成功し、野生型が利用できないセロビオースを炭素源として生育できる株を作製できることを初めて示した点は、セルロース資化性の *Aurantiochytrium* 株の作出のための第一段階として多いに評価できる。セルロースの分解には、セルロース鎖をランダムに切断するエンドグルカナーゼと、末端からセロビオース単位で切断するセロビオヒドラーゼの働きが必要であり、今後それらの酵素を分泌させる遺伝子を AaBgl+株に導入するか、それらの酵素を分泌する株と共培養を行うことで、セルロースを炭素源として生育し、有用な油脂を生産できる系を作出できる可能性を示唆するもので、当該分野の発展に大きな貢献をもたらしたと評価できる。

平成 31 年 1 月 24 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 (学術) 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。