

	とんぶーと くんらていだー
氏 名	THONGBHUBATE KULLATHIDA
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1027 号
学 位 授 与 の 日 付	令和 4 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専 攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on <i>Escherichia coli</i> K-12 polyamines (大腸菌 K-12 のポリアミンに関する研究)
審 査 委 員	(主査)教授 鈴木秀之 教授 亀井加恵子 准教授 吉田英樹

論文内容の要旨

ポリアミンは、2つ以上のアミノ基を持つ脂肪族アミンであり、主要なポリアミンとして、カダベリン、プロレッシン、スペルミジン、およびスペルミンが知られている。ポリアミンは、微生物、植物、動物が合成し、細胞内に保持していることが知られており、翻訳調節、細胞増殖および生育に重要である。ポリアミンを産生する微生物、特に大腸菌 (*Escherichia coli*) のポリアミン代謝は広く研究されている。大腸菌は、モデル生物として広く研究に用いられており、実験手法が確立していることから、大腸菌 K-12 株を対象として研究を行った。

第1章：バイオフィルムを形成した菌は、生体防御機構や抗生物質に抵抗性となる。そのため、病原菌がバイオフィルムを形成すると難治性の感染症となる。これまでにも、ポリアミンが、バクテリアのバイオフィルム形成に影響を及ぼすことが報告してきた。しかし、いくつかあるポリアミンのうち、どのポリアミンがバイオフィルム形成に直接関与しているかは未解明であった。本研究は、この問題を解明するため、ポリアミン代謝に関与する様々な遺伝子の欠損を組み合わせた大腸菌株を作成し、スペルミジンが大腸菌のバイオフィルム形成に必須であることを明らかにした。一方、スペルミジンの細胞内濃度が高い場合でも、*potD* 遺伝子の欠失により、大腸菌はバイオフィルム形成能を失うことを見出した。*PotD* はスペルミジントランスポーター PotABCD のペリプラズム結合タンパク質であり、ヒトはこのタンパク質を持たないことから、バイオフィルム形成阻害剤開発の有望なターゲットである。

第2章：プロレッシンは、自動車産業で広く消費されているナイロン 4,6 の合成中間体である。現在、プロレッシンは主に化学法によって供給されている。しかし、その製造プロセスには過酷な反応が含まれるばかりでなく、有害な化合物の副生を伴う。そこで、本研究では、バイオプロセスによるプロレッシン生産法の開発を行った。大腸菌は、2つのプロレッシン合成経路を持つ。そのうち、アルギニンデカルボキシラーゼ経路を介したプロレッシン生産をめざし、アルギニン合成経路、プロレッシン合成経路、プロレッシン異化経路、プロレッシン輸送経路を改変した大腸菌 K-12 株を作成した。得られた菌株を用いて、バッチ培養条件を検討し、最高収量 1.75 g/L のプロレッシンの合成法開発に成功した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、申請者を筆頭著者とする査読制度の確立した学術雑誌掲載の2報の論文を基に作成されている。

ポリアミンの研究分野は、近年報告数が急増している分野である。申請者は、必要な遺伝子型の株を作成可能な大腸菌株を用い、様々な遺伝子欠損あるいは増強を組み合わせた多様な大腸菌株を作成し研究に用いることで、2つの大きな成果をあげた。

第一の成果は、バイオフィルム形成に及ぼすポリアミンの影響に関する成果であり、以下の3つがあげられる。(1)スペルミジンがバイオフィルム形成に必須であることを多くの菌株を用いた巧みな方法によって初めて決定づけた。(2)その研究過程で、これまでプロトレスシン特異的とされてきた PotFGHI トランスポーターが、少なくともバイオフィルム形成条件下では、菌体外からスペルミジンを取り込むことを示した。(3)菌体内にスペルミジンが十分ある条件下であっても、PotD タンパク質を欠失するとバイオフィルムを形成しないことを明らかにした。

第二の成果は、現在、主として化学法によって工業生産されているプロトレスシンを、改変した大腸菌株を用いて発酵生産する方法を開発したことである。大腸菌は2つのプロトレスシン生合成経路を持つ。申請者はアルギニンデカルボキシラーゼ経路を利用して、既報のオルニチンデカルボキシラーゼ経路を利用した発酵法に比べて、高い収量でプロトレスシンを菌体外に発酵生産する方法の開発に成功した。申請者はプロトレスシン生産大腸菌株を育種するために以下にあげる様々な工夫を凝らし、成功を収めた。(1)アルギニン合成経路とアルギニンデカルボキシラーゼ経路を強化する工夫。(2)生成したプロトレスシンが大腸菌によって分解・利用されないようにする工夫。

(3)菌体外に排出されたプロトレスシンが再び菌体内に取り込まれないようにする工夫。(4)機能未知ながら、新規プロトレスントランスポーターを探索する中で見出したプロトレスシン生産を増強する *yifE* 遺伝子の変異の導入。(5)培地を初めとする培養条件の最適化。

研究成果の当該研究分野および社会に及ぼす影響

病原菌がバイオフィルムを形成すると難治性化しやすくなるため、その形成メカニズムに関する研究報告が多い。申請者は、スペルミジンがバイオフィルム形成に必須であることを初めて明確に示すと共に、バイオフィルム形成には、スペルミジンが存在するだけでは不十分で、PotD タンパク質の存在が必要であることを示した。真核生物の eIF5A の活性化にスペルミジンが必須であること、また真核生物と原核生物のオルニチンデカルボキシラーゼは似ていることから、スペルミジン生合成阻害剤はバイオフィルム形成阻害剤となりにくい。一方、PotD はヒトには存在しないことから、PotD をバイオフィルム形成阻害剤のターゲットとして見出したことは、バイオフィルム形成阻害剤の開発に大きく寄与する発見であると評価できる。

ナイロン 4,6 は電気自動車などに多用されるため、今後の消費拡大が予想されている。現在、その合成中間体であるプロトレスシンは、限りある化石資源である石油から化学法により生産されている。このプロトレスシンを発酵法によりバイオオリエンティッドに生産する方法を開発したことは意義深く、循環型社会の構築と二酸化炭素排出量の削減に繋がり、SDGs 達成に貢献できる研究成果であると評価できる。

公表済みの学術雑誌掲載論文

1. Kullathida Thongbhubate, Yuko Nakafuji, Rina Matsuoka, Sonomi Kakegawa, and Hideyuki Suzuki. Effect of spermidine on biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 203(10), e00652-20 (2021). <https://jb.asm.org/content/203/10/e00652-20>
2. Kullathida Thongbhubate, Kanako Irie, Yumi Sakai, Akane Itoh, and Hideyuki Suzuki. Improvement of putrescine production through the arginine decarboxylase pathway in *Escherichia coli* K-12. *AMB Express*, 11, 168 (2021).
<https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-021-01330-5>