

学位論文審査の結果の要旨

氏名	白米 優一
審査委員	主査 芦内 誠 副査 麻田 恭彦 副査 大西 浩平 副査 渡邊 誠也 副査 若松 泰介

論文名： Molecular Biology and Materials Engineering of Poly- γ -Glutamate
(ポリ- γ -グルタミン酸の分子生物学と材料工学)

審査結果の要旨： 本論文は、納豆ネバの主成分としても知られる有用バイオポリマー「ポリ- γ -グルタミン酸（PGA）」に焦点を当てたものである。PGAの実用材料化を図るにあたっては、かかる増産技術の確立が急務となっている。第一章では、納豆菌のPGA合成オペロンのなかで見逃されてきた超小型遺伝子 *pgsE* に注目している。この遺伝子がコードするタンパク質はわずか55 アミノ酸で構成されていたが、一方で多様な生理現象に関わる Moonlighting mediator としての性質が見えてきた。これまでの知見から、プラスミドベクターによる「PgsE 因子」の産生誘導は顕著なPGA増産をもたらすことが分かっていた。亜鉛イオン存在下でかかる増産挙動が顕在化したため、PgsE は「亜鉛依存性の新規PGA増産因子」であると結論づけられている。想定外の効果であった「プラスミドベクターの超安定化」にも注目している。普通プラスミドベクターは薬剤耐性遺伝子等の増設による抗生物質への耐性化、いわゆる「選択圧負荷」によってベクターの安定化を図る。一方、本 *pgsE* 遺伝子が発現するように設計されたプラスミドDNAは事実上、選択圧不要の超安定型ベクターへと変貌する。かかる *pgsE* 遺伝子の発現ベクターを用いることで選択圧を負荷することなく（抗生物質不要かつ通常の納豆発酵に近い条件で）納豆菌分子育種株が応用でき、さらにはPGA増産まで望めることが示されている。本章では、超小型タンパク質因子であるにもかかわらず、なぜ「染色体外DNA維持（EDMと略す）」という（おそらくは）複雑機構の上に成立していると思われる事象までも司ることができるのか、という疑問にも切り込もうとしている。ここでは納豆菌のグローバル制御因子との関わりについて調査している。これら制御因子の中でも、DNAコンピテンスに関わる ComA 因子、タンパク質分解に関わる DegSU-DegQ 因子、走化性 (*fla/che* オペロン全体) と *sigD* 誘導に関与する SwrA 因子、鞭毛形成オペロン (*fla*) 後半とケモタキス (*che*) に関与する SigD 因子が、PGA生産にも関わっていることが分かってきた。各遺伝子破壊株をEDM実験に供した結果、SwrA 変異株で顕著な該機能不全が認められ、鞭毛形成オペロン (*fla*) 前半にEDM機能発現の責任遺伝子があることが示唆された。そこで、*fla/che* 全破壊株のEDM相補実験を行ったところ、*fliF* 遺伝子のみの共発現で機能回復することが判明した。以上より、FliF タンパク質を「EDM協奏因子」と位置付けるとともに、PgsE の方はかかる仲介因子として働くことを鑑み、以後 EdmS 因子と呼ぶことにした。

DNA／鞭毛／PGA、明らかに異質と考えられてきた機能性バイオポリマー群に対する統合的な応答制御システムが存在することを示した先鋭的な研究として現在も高い評価を受けている。第二章では、PGAの金属イオン吸着性分析を進めるとともに、得られた新知見から見えてきた「PGA増産のための分子生物学」にかかる新たな切り口についても言及している。PGAは、その構造的特徴から「ポリアクリル酸類似体」とみなされることが多い。一方、機能レベルでは相違点も少なくない。金属イオン吸着能の違いもその一例といえる。PGAとポリアクリル酸は何れも多価重金属類と吸着するが、その能力はPGAの方がはるかに優れていた。実際、各吸着モデルとの適合分析の結果、PGAに顕著な「協同吸着性」が認められた。特に、重金属イオンへの適合性は高かった。その性能指標となる「ヒルの n 」でいえば、例えばインジウムの場合、該 n 値は20を超える（協同性を示さないポリアクリル酸の n 値は ~ 1 ）。ポリアクリル酸では「重金属除去」一辺倒であったが、PGAならば、産業上の有価金属「レアメタル」の吸着回収基材としての応用まで視野に入る。翻って、重金属によるPGA増産の可能性についても調べている。結果、永久磁石元素「ディスプロシウム」を微量添加するだけでPGA生産量が倍加する微生物の同定に成功している。具体的には、納豆菌近縁で土壤常在菌「巨大菌」がそれにあたる。その「一定培養時間における同生菌数の増加速度及び菌体密度の増大」現象に関してはこれまでの常識を覆す可能性があるため、注目されている。重金属（特にレアメタル類）に対する未知の生物応答機構（代謝や増殖への必須性等）の解明を背景に、新たなPGA増産戦略が構築されるものと期待される。

PGAの実用材料化（プラスチック化やナノファイバー化等）で大きな妨げになっているのが、異常な吸湿性や水分散性である。従って、PGAに特徴的な親水性を制御しつつ、耐水材料化を図ることが（かかる材料工学上）最も重要な課題になっていた。第三章では、超好塩アーキアの立体規則性PGAと歯磨き粉に含まれる薬効成分「ヘキサデシルピリジニウム」からなる新素材「PGAIC」の開発に成功している。その優れた成形性を背景に、抗菌プラスチックフィルムやナノファイバーの作製にも言及した。また、PGAICに付与された副次的な重要機能としては、食中毒細菌・カンジダ真菌・糸状菌（カビ類）・インフルエンザ等、多様な微生物やウイルスに対する顕著な増殖抑制効果が挙げられる。当該PGA改質技術は人体に重篤な感染を引き起こすとされる病原菌の伝播阻止材料の開発にも繋がるため、画期的である。さて、水を汚染する要因として有機物や金属、病原微生物等が挙げられる。なかでも、病原微生物を含む水は下痢や発熱を伴う重篤な感染症を引き起こす可能性がある。十分な治療を受けることのできない途上国では生死に関わる問題である。第四章は、水質浄化で汎用される活性炭の多孔表面を「PGAIC」でコーティングすることにより、簡便かつ安価な新規除菌担体を開発した実例をまとめている。水性感染症の原因となる「大腸菌」をモデルに除菌能を確認した。実際、相当程度の汚染水でも簡便迅速に浄化できることを明らかにした。本件は「PGAICの高度公益材料化」の取り組みとして高く評価されている。第五章では、PGAICのさらなる性能強化、産業応用にも堪えるバイオベースナイロン新素材を目指した。エステル化等の一般的な化学修飾法とは異なる画期的な新技術の開発に至り、新たに「ポリマー形質転換技術」と名付けた。100%結晶ナイロンに匹敵する熱エンタルピー（超耐熱性の獲得）／（環境負荷の小さい）自己組織化コーティング機能／広域かつ強力な抗菌活性等、これまでのバイオプラスチックに対する考え方の範疇（化成プラスチック代替等）には収まらない「超機能型バイオベース材料」創製との学術的評価を得ている。

以上より、本論文は生物材料化学の基礎と応用に係る学術的な進歩に資するものであると判断した。

本論文に関する公開審査会は、平成31年2月9日、愛媛大学農学部において開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査会で本論文の内容を慎重に審査した結果、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。