

氏名	村田幸作 むら た こう さく
学位の種類	農学博士
学位記番号	論農博第967号
学位授与の日付	昭和57年1月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Production of Glutathione with Microbiological Energy (微生物エネルギーを用いるグルタチオンの生産)

論文調査委員 (主査) 教授 木村 光 教授 柄倉辰六郎 教授 上久保 正

### 論文内容の要旨

この論文は、微生物のエネルギー (ATP) 生成システムの解析と、そのシステムを利用する有用物質、特にグルタチオンの生産法に関する研究結果をとりまとめたものである。

グルタチオンは、生体内で ATP 依存の2種の酵素 (GSH-I, GSH-II と略称) の触媒作用によって3種のアミノ酸 (グルタミン酸, システイン, グリシン) より生合成されるトリペプチドである。

著者はまず、グルタチオンの生合成に必要な ATP 供給源として固定化大腸菌のアセテートキナーゼ反応、及び固定化酵母の解糖系に着目し、グルタチオン生産用のバイオリクター構築に必要な諸性質を比較検討した。その結果、固定化酵母の解糖系が ATP 生成活性 ( $7\mu\text{mole}/\text{ml-gel}$ ), ATP 連続生成条件下での安定性 (半減期22日,  $30^{\circ}\text{C}$ ) 及び反応プロセスの経済性の諸点において優れていることを明らかにした。

次に固定化酵母の ATP 生成系と共役してグルタチオンの生合成を行う大腸菌株の改良について検討した。改良は (1) グルタチオン分解活性の除去, (2) グルタチオンの膜透過性の増大, (3) グルタチオン生合成系に稼動している制御機構 (グルタチオンによる GSH-I へのフィードバック阻害) の解除, 及び (4) グルタチオン生合成系の酵素 GSH-I の活性強化の4点について行った。

上記(1)と(2)については、それぞれ、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性が低下した変異株、及びメチルグリオキサール耐性変異株を取得することによって解決した。(3)については、まず GSH-I 欠損株 (C912) を誘導した後、その復帰変異株を取得することによりフィードバック阻害の解除された株 (RC912) を得た。更に(4)の GSH-I の活性強化は、遺伝子組み換え技術を利用して、脱感作されている GSH-I の遺伝子を RC912 株でセルフクローニングすることにより行った。その結果、GSH-I 活性の4倍増大した形質転換体を得ることができた。

以上、(1)~(4)の改良によって、最終的に GSH-I 活性は野生株のその12倍増大し、生合成されたグルタチオンが分解されることなく菌体外へ分泌される菌株を育種することができた。

## 論文審査の結果の要旨

従来の遺伝子組み換え研究は、インシュリン、インターフェロンに代表されるように最終生産物がペプチド、あるいはタンパク質に限られていた。これに対し本論文は遺伝子組み換え技術を微生物代謝と組み合わせて新しい方法論を開発したものであり、今後はこのような手法で糖やビタミン等代謝経路上の物質なら何でも生産が可能になった。本論文はその実例として肝臓治療薬グルタチオンの高生産株を造成し、酵素的生産法への道を開いた点が評価される。

グルタチオン (GSH) は酵素 GSH-I, GSH-II によって生合成されるが、細胞内では酵素 I が最終生産物 GSH によってフィードバック阻害をうけるため、ある濃度以上にはならないように制御されている。従って GSH の大量蓄積を計るためには、この制御機構を外さなければならない。本論文では、まず酵素 I の欠損変異株を分離し、続いてその復帰変異株を取得することによって、酵素 I の活性は持つが、阻害は起こらない酵素 I' を持つ菌株を単離した。この I' 遺伝子を各種制限酵素で切り出し、それをプラスミド pBR322 に繋ぎ、これを復帰変異株 *E. coli* B に取り込ませた。この造成株は、野性株に比較して酵素 I の活性で12倍、GSH 蓄積量で8倍の増加を示した。この菌株はメチルグリオキサール耐性にもなっていて、生合成された GSH が菌体外に分泌されてくるので、バイオリアクターとして工業的に使用可能と考えられる。本論文は更に酵素反応へのエネルギー供給系として、酵母の解糖系、大腸菌のアセテートキナーゼ系などを詳細に検討している。

以上のように、本論文は遺伝子組み換え研究の基礎から応用まで多くの新知見を与えており、応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。