

氏名	おおにしじゅんこ 大西淳子
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2577号
学位授与の日付	平成17年7月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Genome breeding of an L-lysine-producing <i>Corynebacterium glutamicum</i> mutant (ゲノム情報を利用したアミノ酸生産菌の育種法に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌 教授 喜多恵子 教授 河内孝之

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ゲノム情報を活用して発酵生産菌を育種する新しい方法論(「ゲノム育種」と命名)を考案し、コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* を用いたリジン発酵を題材に、その有効性を検証したものである。

- (1)コリネ型細菌によるリジン発酵では100 g/L を超える高力価が報告されているものの、生育・糖消費速度が遅く、発酵に50~100時間を要している。まず、このような従来型リジン生産菌 B-6 株の再構築を試みた。第一段階として、リジン合成に関わる末端経路、排出、及び補充経路に焦点をあて、野生株と B-6 株の比較ゲノム解析により変異点を同定し、その中から生産に関わる有効変異を抽出した。その結果、ホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子 *hom*、アスパルトキナーゼ遺伝子 *lysC* およびピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 *pyc* に見出されたアミノ酸置換を伴う変異が生産に有用であることがわかった。*hom* 変異 (V59A) と *lysC* 変異 (T311I) を遺伝子置換法により野生株に導入した1点変異株、各 HD-1、AK-1 がそれぞれ約10 g/L、約50 g/L のリジンを生産したのに対し、両変異を組み合わせた2点変異株 AHD-2 では力価は相乗的に向上して70 g/L に達した。さらに *pyc* 変異 (P458S) を導入した3点変異株 AHP-3 では75 g/L を超えるリジンが蓄積した。この AHP-3 株は野生株と遜色ない旺盛な生育・糖消費速度を示し、従来に比べ培養時間半減という「高速リジン発酵」を可能にした。
- (2)工業プロセスでは一般に発酵熱により発酵タンクの温度が上昇する。しかし、コリネ型細菌では従来、リジン発酵が成立する上限温度が35°C程度であり、温度上昇を抑えるのに冷却コストがかかることから、高温で発酵できるプロセスが望まれている。ゲノム育種株の持つ野生株並みの高いストレス抵抗性を踏まえると、35°C を超える条件でのリジン生産が期待できる。前述の AHP-3 株を用いてより高温条件での発酵を試みた。発酵培地を用い、野生株を対照に AHP-3 株の高温域での生育能を調べた結果、本株は野生株同様、40°C 付近の高温条件でも良好な生育を示し、高い温度抵抗性を保持していることがわかった。これを受け、30~42°C 間でリジン発酵を試みた結果、41°C まで高効率なりジン発酵が成立した。
- (3)末端経路が整備された3点変異株 AHP-3 を土台に、上流の中央糖代謝上の変異の評価を行ったところ、ペントースリン酸回路の鍵酵素6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼに約1割のリジン増産をもたらす有効変異 (S361F) を見出した。酵素解析から、この変異は同酵素の有する NADPH、G3P、FBP、ATP 等によるアロステリック阻害を同時に緩和する脱感作変異と判明した。¹³C-Glucose を用いて代謝フラックスを調べたところ、この変異によりペントースリン酸回路の流量が約8%増加していた。
- (4)コリネ型細菌のゲノム情報から、これまでこの種の細菌では知られていなかった炭酸脱水酵素 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ の反応を触媒) の存在を見出した。同酵素をコードする *bca* 遺伝子を破壊すると生育が著しく悪化し、高濃度 CO_2 下で生育が回復することから、コリネ型細菌においても同酵素が炭酸の供給に重要な役割をもつことが示唆された。リジン発酵への *bca* 増幅効果を調べた結果、生育・生産への影響は認められず、ゲノム上の1コピーの活性で充分であると考えられた。ノーザン解析の結果、*bca* はリジンの過剰合成に伴って誘導発現することがわかり、炭酸がリジン合成

に利用され、そのプールが下がると何らかの機構で *bca* の誘導発現が起こるものと推察された。

論文審査の結果の要旨

昨今、産業利用されている微生物の全ゲノム配列が続々と決定されると共に、DNA アレイやプロテオミクス等、いわゆるポストゲノムテクノロジーの開発が進められている。これらの成果を受け、ゲノムから産業への応用をいかに図るかが現実の課題となっている。本研究は、代表的なアミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* の全ゲノム解読を踏まえ、ゲノム科学の成果をアミノ酸発酵に結びつけるための方法論をいち早く示した事例である。加えて、この方法論は、既に円熟期にあるアミノ酸発酵産業にブレークスルーをもたらす新しい視点を含んでいる。すなわち、ランダム変異を繰り返して育種されてきた現在のアミノ酸生産菌が抱えるさまざまな問題（ストレスに弱く生育も遅い、虚弱体質であるという点、生産の仕組みがブラックボックスにならざるを得ず、合理的な改良が阻まれている点）に着眼し、これらを解消することを狙いとしている。「ゲノム育種」により、生産菌の遺伝情報を明らかにしてから、発酵に有用な遺伝形質のみを野生株ゲノム上に集めていくというコンセプトで育種を行うと、生産菌の性質を抜本的に改善し、発酵プロセスを大きく変えられることが例証された。主な成果は以下のとおりである。

- (1) *C. glutamicum* 野生株にリジン合成末端経路の3つの有用変異を導入することにより、発酵時間を大幅に短縮する高速リジン発酵が実現した。リジンは年間30万トン近い生産量を誇り、発酵時間の半減は大幅なコスト削減につながる。
- (2) ゲノム育種株にはもうひとつメリットがある。それは野生株が本来もつタフな性能が受け継がれる点である。発酵プロセスとして見ると、アミノ酸発酵温度は40°C付近が有利であるにも関わらず、既存のプロセスではそこに数°C及んでいない。この課題に対し、以前から高温域で生育する微生物から生産菌を育種しようとする研究が進められてきた。今回、ゲノム育種株を用いることで、発酵温度の数°Cアップが可能になった。興味深いのは、高温条件でも糖消費が悪化せず、むしろ生産が高くなることであり、従来、例を見ない「高温高速発酵」が実現した。
- (3) 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼに見出された有効変異の解析から、リジン合成に必要なNADPHの供給を促す上で、同酵素の脱感作が有用であることが判明した。これまで同酵素に変異を導入して代謝物の収量を改良した報告はない。この酵素の脱感作変異も知られていない。「ゲノム育種」はそのような新規な遺伝形質を取り出し活かすことも可能にしている。また、ペントースリン酸回路が複数の生合成に必要な還元力と炭素骨格の供給を担っていることを踏まえると、本変異の他発酵への波及効果が期待できる。
- (4) 多くのアミノ酸発酵で炭酸固定反応が収率に重要な役割を担っているにも拘わらず、基質である炭酸の供給の仕組みには目が向けられていなかった。著者はこの点に着目し、コリネ型細菌のゲノム情報を利用して炭酸供給に関わる炭酸脱水酵素の機能を見出した。同酵素は従来から真核生物や光合成生物での検討は有るが、発酵生産の観点からの報告はない。注目すべきは、リジンの過剰合成に伴って同酵素が高発現するという特性で、コリネ型細菌が広くリジンの工業生産に用いられてきた理由の一端を窺わせる結果が得られている。

以上の成果は、育種技術と発酵プロセスの開発研究に新たな潮流をもたらすきっかけとなるもので、応用微生物学と発酵産業の両面にもたらすインパクトは大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年6月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。