

氏 名	加 藤 錠 治 か とう じょう じ
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 104 号
学位授与の日付	昭 和 47 年 9 月 25 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	Kurthia Catenaforma による L- プロリンの製法に関する 研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 山 科 郁 男 教 授 高 木 博 司 教 授 冨 田 謙 吉

論 文 内 容 の 要 旨

アミノ酸発酵は、最近、急速に進歩した分野であり、天然物からの抽出法に代る有利な製法として合成法と共に現在工業的に行なわれている。近年、医薬品、食品分野において価値が認められ始め、その製造、供給が望まれている L- プロリンに着目し、発酵法で安価に得られる L- アスパラギン酸を原料とする微生物による製造法の研究を行なった。

先ず、当研究所保存の細菌約300株、放射菌約20株、酵母約70株、カビ約100株についてプロリン蓄積能を検索した結果、アスパラギン酸添加培地を用いた場合、著量のプロリンを蓄積する *Kurthia catenaforma* を見出した。さらに、この菌株を紫外線照射、ニトロソグアニジン処理により、改良した結果、原株の約1.5倍のプロリン生成量を示す変異株 No. 45 を取得した。

そこで、この変異株を用いプロリン生成量を増加させるため種々培養条件の検討を行なった。すなわち、培地組成として、アスパラギン酸、糖類、アンモニウム塩、有機栄養源、カリウム塩などのプロリン蓄積に及ぼす影響を調べた。

また、物理的条件として酸素供給度、温度、pH の影響を調べた。

その結果得られた至適条件下は、40時間培養することにより約 30mg/ml の L- プロリンを蓄積させることができた。本発酵では他のアミノ酸をほとんど副生しないので培養液より L- プロリンを容易に精製することができ、培養液 1 l より 21 g (収率74%) の純 L- プロリンの結晶が得られた。

上記の結果より、本発酵ではアスパラギン酸が重要な役割をなしていると考えられたので、この役割を明らかにするために、まず、アスパラギン酸に代る物質の検索を行なった。その結果、アスパラギン酸の効果は特異的であり、アスパラギン酸と同じ酸性アミノ酸であり、プロリンの前駆体であるグルタミン酸によってさえもおきかえることができなかった。

次に、アスパラギン酸培地とグルタミン酸培地の培養経過を比較した結果、アスパラギン酸は菌の生育促進に役立っており、これは本菌株のアスパラギン酸とグルタミン酸の消費の差に由来していることがわ

かった。

さらに、この両アミノ酸の消費の差の原因を追究した結果、菌膜の透過性によることが、他の菌株との比較より推定された。

次に、消費される多量のアスパラギン酸が本発酵においてどの様に役立っているかを明らかにするため、アスパラギン酸 $U-^{14}C$ を用いて培養を行ない、放射能を追跡した。その結果、培地に添加した全放射能の約45%がプロリンに見出され、その他では α -ケトグルタル酸とグルタミン酸に放射能が認められた。また、 α -ケトグルタル酸、グルタミン酸、プロリンの比放射能が変わらないこと及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの活性が高いことより、アスパラギン酸はオキザロ酢酸に変わり、TCA サイクルを廻って α -ケトグルタル酸からグルタミン酸を経て、プロリンに変換されることが考えられた。

従って、アスパラギン酸は菌の生育を促進するばかりでなく、プロリンの炭素源、窒素源としても、直接重要な役割をなしていることが明らかとなった。

上記のごとく、本発酵では主としてアスパラギン酸からグルタミン酸を経てプロリンが生合成されるので、グルタミン酸が菌体に取り込まれて利用される様になれば、グルタミン酸培地においてもアスパラギン酸培地と同様にプロリンを蓄積させることができると考えられる。そこで、まず、グルタミン酸の消費を促進する界面活性剤の検索を行なった。その結果、三種の合成界面活性剤にその効果を認めた。

次に、これら界面活性剤のグルタミン酸透過性に対する影響を検討した結果、界面活性剤によるグルタミン酸消費の促進は、グルタミン酸の透過性の改善によることがわかった。

この結果より、グルタミン酸培地に界面活性剤を添加して、培養経過を追跡したところ、グルタミン酸培地でもアスパラギン酸培地と同様に、多量の L-プロリンを蓄積させることができ、グルタミン酸からのプロリン発酵を確立することができた。

以上のごとく、アスパラギン酸あるいはグルタミン酸を利用する L-プロリンの発酵法を確立し、そのプロリン蓄積機構を明らかにした。

この方法は既に工業化され、大量の L-プロリンが生産、供給されるに至っている。

論文審査の結果の要旨

L-プロリンは医薬品および食品添加物としての利用価値が高く、その有利な製造方法の開発が期待されていたアミノ酸である。

本論文は L-アスパラギン酸または L-グルタミン酸を主成分の一つとする培地を用いて微生物による L-プロリンの製法を確立し、さらにこれらアミノ酸からの L-プロリン生成の機作を明らかにしたものである。

まず、L-プロリン生成能の高い微生物を検索し、500に及ぶ菌株からすぐれた一菌株を見出したが、さらにその変異株を誘導してよりすぐれたプロリン生成能を有する菌株を確立している。次いで、培地成分としてアスパラギン酸のほか炭素源、窒素源、無機イオン等に関する最適条件を求め、また、温度、PH、酵素供給量等の培養条件を確立して、最適条件下では 1 ml 中 30 mg に及ぶ L-プロリンの蓄積を行はしめることに成功している。

生体内では、L-プロリンは L-グルタミン酸から生成することが知られているが、本論文の方法においては、L-アスパラギン酸は菌の生育に役立つと同時に L-グルタミン酸を効率よく生成することによって L-プロリンの生成に寄与していることが明らかにされている。すなわち、L-アスパラギン酸は α -ケトグルタル酸をアミノ化して L-グルタミン酸を生ずると同時に、自らも TCA 回路を経て α -ケトグルタル酸に変換して L-グルタミン酸の生成にさらに寄与していることが、 ^{14}C -L-アスパラギン酸を用いた実験によって明らかにされている。

L-グルタミン酸は通常の条件では菌膜の透過性による制限のため充分には利用されないが、界面活性剤を培地に添加することによって L-アスパラギン酸同様 L-プロリンの生成に有効であることも明らかにされている。

以上、本論文は、微生物を用いて、生化学的に裏付けられた方法による L-プロリンの製法を確立しており、よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。