

氏 名	みや た れい こ 宮 田 令 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2342 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 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	METABOLIC ENGINEERING FOR THE FERMENTATIVE PRODUCTION OF PYRUVIC ACID (代謝工学的手法によるピルビン酸の発酵生産に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、生体代謝の重要な中間体であり、また、パーキンソン病薬 L-ドーパや抗インフルエンザ薬リレンザなどの医薬製造のための中間体、化粧品原料、培地成分、香料原料など多様な用途に有用なピルビン酸 (Pyr) を発酵生産するための研究開発と工業化に関するものである。微生物による Pyr の生産に関しては、すでに細菌、酵母、担子菌、カビによる数多くの研究報告がなされていたが、生産量が不十分であったり、精製上問題となる Pyr 以外のケト酸などの副生物が多いなどの問題もあり、工業的な利用には至っていなかった。本研究は、Pyr の代謝経路を考慮したスクリーニングにより得られた高性能生産菌を用い、変異株の造成や代謝工学的手法による菌株育種および発酵生産条件について検討した結果をまとめたものである。まず、従来の研究から、Pyr の生産性の向上にはチアミンを補酵素とする pyruvate dehydrogenase 複合体および pyruvate decarboxylase (PDC) による Pyr の代謝分解を制御することが必須であること、また、糖の消費速度が大きいこと、培養のスケールアップが容易なこと、菌株改良のための情報が多いことなどを考慮し、スクリーニング対象を酵母に絞り込み、グルコース (100g/ℓ) からの Pyr 生産性を調べた。その結果、*Saccharomyces* および *Torulopsis* に属する酵母に高い生産性を認めた。最も高い Pyr 生産性を示した菌株 *Torulopsis glabrata* IFO 0005 は、Pyr 代謝に深く関係するチアミン、ピオチン、ピリドキシン、ニコチン酸の 4 種類のビタミンを絶対的に要求する特異な酵母であった。

次に *T. glabrata* IFO 0005 による Pyr の高蓄積、高収率化を検討し、培地中の要求ビタミン濃度の最適化、通気量の調節が高生産の達成に重要であることを認めた。設定した最適条件下での Pyr の蓄積量は培養 63 時間で 67.8 g/ℓ に達した。(平均生成速度 1.08 g/ℓ/h; 対糖収率 49.4%) また、培養上清中には主な副生物として約 8 g/ℓ のエタノール、約 5 g/ℓ のグリセロール、約 4 g/ℓ のパラピルビン酸が検出された。

さらに Pyr の収率、収量の向上、副生物の低減を目的に *T. glabrata* IFO 0005 を親株として変異株を誘導し、以下の代謝工学的な菌株改良を行った。

(1) 酢酸依存株: TCA サイクルへの主な炭素供給源が酢酸であると考え酢酸依存性変異株を造成し、高い Pyr 生産性を示した酢酸依存株では PDC 活性が半減していることを認めた。本変異株の対糖収率は 15% 向上した (平均生成速度 1.28 g/ℓ/h)。

(2) グリセロール分泌能低下株 (NaC 工耐性株): 一般に、細胞 (特に酵母) は、高濃度の塩類にさらされることによってストレスを受け、細胞の浸透圧保持のために細胞内にポリオール類 (例えば、グリセロール) を蓄積する。本菌株もピルビン酸ナトリウムが高濃度蓄積するに従いグリセロールを蓄積し、培地中にも漏出する。そこで、NaCl 耐性を付与することで、グリセロールを漏出しない細胞膜強化変異株を造成し、グリセロールの菌体外漏出を約 1/2 に抑制し、培養 69 時間で 72 g/ℓ の Pyr を蓄積させた。

(3) 栄養要求株: Pyr 生産能力向上に寄与するその他の性質を調べる目的で、栄養要求変異株を多数取得したところ、アルギニン要求株、バリンおよびイソロイシンの二重要求株が優れた Pyr 生産性を示した。

以上の結果から、実用生産レベルでの安定した Pyr 生産が可能となり、これにもとづき、安価なグルコースから 80 g/ℓ

以上の Pyr を対糖収率50%以上で発酵生産する製造技術が確立された。

論文審査の結果の要旨

ピルビン酸 (Pyr) は、生体代謝の重要な中間体であり、また、医薬品製造のための中間体、化粧品原料、培地成分、香料原料などとして広く用いられている有用な有機酸である。微生物学的手法による Pyr 生産の検討は、従来、種々の微生物についてなされてきたが、工業的に利用することはできなかった。これは Pyr が生体代謝の中心に位置する化合物であり、多くの生合成反応に使用され、代謝速度が速いため蓄積しにくく、副生物が多いことが理由としてあげられる。本論文は、スクリーニングによる Pyr 高生産菌の取得、代謝工学的的手法による菌株改良とそれらの成果にもとづいた Pyr の工業的発酵生産法の開発に関する研究成果をまとめたものであり、評価すべき主要な点は以下のとおりである。

- (1) 種々のビタミンの要求性をスクリーニングの重要形質として菌株選定を行い、これまで Pyr 生産菌としては全く知られていなかったチアミン、ニコチン酸、ピリドキシン、ビオチンの四重要求株である *Torulopsis glabrata* が高い Pyr 生産能力を持つことを見いだした。
- (2) *T. glabrata* IFO 0005 による発酵生産条件の検討を行い、培養63時間で Pyr の蓄積が $67.8 \text{ g} / \ell$ (平均生成速度 $1.08 \text{ g} / \ell / \text{h}$, 49.4%) に達することを示した。
- (3) *T. glabrata* IFO 0005 を親株に代謝工学的見地から以下の菌株改良を行い、Pyr の生産性を向上させることに成功した。
 - (a) TCA サイクルへの主な炭素供給源が酢酸と考え、pyruvate decarboxylase (PDC) 活性の弱화를目的に生育が酢酸に依存する酢酸依存性変異株を取得し、高い Pyr 生産性を示した酢酸依存性変異株では PDC 活性が親株に比し約 1/2 に低下していることを明らかにした。また、本変異株による Pyr 生産では、Pyr 生産量および対糖収率の著しい向上を認めた。
 - (b) NaCl 耐性を付与しグリセロールを漏出しない膜強化株を得、グリセロール副生率を低下させることに成功した。
 - (c) Arg 要求性および Ile, Val 二重要求性を付与することで対糖収率が向上することを示した。

以上のように本論文は、代謝工学的の戦略にもとづき、新しい Pyr の発酵生産法を確立するための基盤を築いたものであり、その成果は、発酵生理学、応用微生物学、制御発酵学に寄与するところが大きい。

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12年10月12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。