

学 位 論 文 題 名

Enterobacter aerogenes トリプトファナーゼによる
L-トリプトファン生産

学位論文内容の要旨

トリプトファナーゼを用いたインドール、ピルビン酸、アンモニアからのL-トリプトファン生産は、基質に対する高い収率ゆえ工業的に最も有望な方法とされてきた。しかしながら原料であるピルビン酸の安価な供給方法が確立されていないこと、あるいは実用に供するに足る優れた酵素がなかったことなどから、現在にいたるまで実際に工業的に実用化された例は無い。このような中、我々の研究室ではL-トリプトファン生産性に極めて優れたトリプトファナーゼを産する*Enterobacter aerogenes* SM-18を見いだしており、一方大腸菌を用いたピルビン酸生産法も既に確立している。つまり我々はトリプトファナーゼによるL-トリプトファン生産において問題となる2点について、これらを打開するのに有用な知見を持っていた。しかし実用に供するにはさらに解決されるべき課題が残されていた。すなわちカタボライト抑制がトリプトファナーゼ発現を制限し、且つトリプトファナーゼ酵素量がL-トリプトファン生産量の制限要因であったことである。よってトリプトファナーゼ大量発現系の確立がL-トリプトファン生産量増大に最も効果があると判断された。さらにトリプトファナーゼ生産とピルビン酸発酵とを同時に行うことができればL-トリプトファン生産プロセスの大幅な簡略化になり、より実用的になることが期待できた。また*E. aerogenes* SM-18のトリプトファナーゼ遺伝子についての知見も有用なものであると思われたので、これらの主旨のもとに研究を進めた。

1. *E. aerogenes* トリプトファナーゼ遺伝子の塩基配列の決定。

トリプトファナーゼ活性発現能を有する、*E. aerogenes* SM-18染色体由来の5.8kbpのPstI断片のうち2230 bpについて塩基配列を決定した。その結果トリプトファナーゼ構造遺伝子*tnaA*と、それに付随する*tnaC*, *tnaB'* 及びプロモーター配列と思われる部分を特定した。よってこの遺伝子は大腸菌と同様のトリプトファナーゼオペロンとして存在していることを明らかにした。塩基配列から予想されるトリプトファナーゼのアミノ酸配列は、他の細菌由来のトリプトファナーゼやチロシンフェノールリアーゼのアミノ酸配列と高い相同性を有しており、大腸菌トリプトファナーゼとの相同性は59%であった。

2. トリプトファナーゼ高発現プラスミドの構築とL-トリプトファン生産への応用。

発現ベクターpTrc99Aの*tac*プロモーターの下流にトリプトファナーゼ構造遺伝子

*tnaA*をサブクローン化し、pKT901EAを得た。*tac*プロモータはカタボライト非感受性で強力な転写開始活性をもつプロモータである。実際、これで形質転換した大腸菌 JM109 (JM109/pKT901EA)は、*E. aerogenes* SM-18 の約3.6倍のトリプトファナーゼを発現し、グルコースによるカタボライト抑制を受けなかった。JM109/pKT901EAをグルコース存在下で、IPTGによる誘導を行いながら培養したところ、単位培養液体積あたりのトリプトファナーゼ活性は、L-トリプトファンで誘導した*E. aerogenes* SM-18の約8.0倍となった。次にこのような*E. aerogenes*トリプトファナーゼを大量発現した大腸菌菌体を用いてL-トリプトファン合成を行った。大量発現による比活性の増加により、*E. aerogenes* SM-18と比べL-トリプトファンの収量は顕著に増加した（6時間の反応では約3.3倍、対インドール収率は74%、対ピルビン酸収率は43%）。さらに*E. aerogenes*のトリプトファナーゼは*E. coli*のそれと比して迅速かつ高収率でインドール、ピルビン酸、アンモニアからL-トリプトファンを合成し、L-トリプトファン合成の目的に適した優れた酵素であることが明らかになった（例えば6時間の反応での収量は約2.8倍）。

3. *E. aerogenes* SM-18のトリプトファナーゼの精製および諸性質の検討。

E. aerogenes トリプトファナーゼの優れたL-トリプトファン生産性の原因を明らかにするため、この酵素を精製し、諸性質の検討を行った。その結果、この酵素は大腸菌のトリプトファナーゼと比較して、熱失活温度が約5℃高く、また37℃での長時間の保温でも失活しにくいことを見いだした。この安定性が*E. aerogenes*トリプトファナーゼがL-トリプトファン生産において優秀な成績であった理由の一つであると思われる。また、この酵素は同一サブユニットからなる4量体であり、分解反応の至適pHは8であることも明らかにした。

4. ピルビン酸生産能及び*E. aerogenes* のトリプトファナーゼ生産能を同時にもつ組換え大腸菌によるL-トリプトファン生産。

ピルビン酸生産菌*E. coli* W1485*lip2*をpKT901EAで形質転換した株W1485*lip2*/pKT901EAを用いて、一つの菌株でピルビン酸生産とトリプトファナーゼを同時に生産させ、引き続きL-トリプトファン合成を行う事を試みた。ピルビン酸発酵の培養途中にIPTGと同時に種々の栄養素を補充添加することにより、培養開始から40時間後には、70g/literのグルコースから28.6g/literのピルビン酸が培養液中に蓄積し、さらに菌体内タンパクの約30%をしめるトリプトファナーゼが誘導された。この発酵液に、インドール、アンモニアを加え、L-トリプトファン合成反応を行ったところ反応開始から36時間後には23.7g/literのL-トリプトファンが合成された。つまりこれまでトリプトファナーゼ誘導とピルビン酸発酵を別々に行っていたものが一度の培養で済むようになったことで時間が短縮され、発酵液をそのまま酵素反応液とすることで生産プロセスが大幅に簡略化されることになった。さらに、乳加工品製造の副生物で安価なバイオマスのひとつであるラクトースが、グルコースに代わる炭素源として、またIPTGに代わるインデューサーとして利用できる事を実証した。

以上のように本研究では、まず*E. aerogenes* SM-18のトリプトファナーゼ遺伝子の塩基配列を明らかにし、その知見をもとに、*E. aerogenes* SM-18のトリプトファナーゼの大量発現系を確立した。これにより従来*E. aerogenes*野生株を用いる場合と比較してL-トリプトファン収量を大幅に増加させることができた。また*E. aerogenes* SM-18トリプトファナーゼはL-トリプトファン合成能に優れていることを実証し、それは酵素の安定性によるものである可能性を示唆した。さらにトリプトファナーゼの誘導とピルビン酸を同時に生産する方法を確立し、もってトリプトファナーゼによるL-トリプトファン生産の簡略化に成功した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 助教授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

Enterobacter aerogenes トリプトファナーゼによる L-トリプトファン生産

本論文は日本語本文40頁、図25、表8、引用文献56、緒言、総括、英文総括を含む8章からなり、ほかに参考論文3編が付されている。

トリプトファナーゼを用いたインドール、ピルビン酸、アンモニアからのL-トリプトファン生産は、基質に対する高い収率ゆえ工業的に最も有望な方法とされてきた。しかし原料であるピルビン酸の安価な供給方法が確立されていないこと、あるいは実用に供するに足る優れた酵素がなかったことなどから、現在にいたるまで実際に工業的に実用化された例は無い。本研究ではトリプトファナーゼによるL-トリプトファン生産を実用化可能なものとするために、遺伝子操作によるトリプトファナーゼ大量発現とそれによるL-トリプトファン収量の増大、及びピルビン酸生産とトリプトファナーゼ誘導を同時に行うことによる生産プロセスの簡略化について述べられている。

第2章では、*E. aerogenes* トリプトファナーゼ遺伝子の塩基配列を決定し、構造遺伝子 *tnaA* と、それに付随する *tnaC*, *tnaB'* 及びプロモーター配列と思われる部分を特定した。よってこの遺伝子は大腸菌と同様のトリプトファナーゼオペロンとして存在していることを明らかにした。またこのトリプトファナーゼのアミノ酸配列は他の細菌由来のトリプトファナーゼやチロシンフェノールリアーゼのアミノ酸配列と高い相同性を有していることを明らかにした。

第3章では、*E. aerogenes* トリプトファナーゼ構造遺伝子 *tnaA* を発現ベクターにクローン化し、大腸菌内で発現させた。これにより、*E. aerogenes* SM-18 の約3.6倍のトリプトファナーゼを、カタボライト抑制を受けることなしに得ることに成功した。さらにこのような *E. aerogenes* トリプトファナーゼを大量発現した大腸菌菌体を用いることで、*E. aerogenes* SM-18 と比べ、L-トリプトファンの収量を顕著に増加させることに成功した。また *E. aerogenes* のトリプトファナーゼは *E. coli* のそれと比して迅速かつ高収

率でインドール、ピルビン酸、アンモニアからL-トリプトファンを合成し、L-トリプトファン合成の目的に適した優れた酵素であることを明らかにした。

第4章では*E. aerogenes* トリプトファナーゼを精製し、諸性質の検討を行っている。その結果この酵素は大腸菌のトリプトファナーゼと比較して、熱失活温度が約5℃高く、また37℃での長時間の保温でも失活しにくいことを見いだした。*E. aerogenes* トリプトファナーゼがL-トリプトファン生産において優秀な成績であった理由が、この安定性によるものである可能性を指摘した。また、この酵素は同一サブユニットからなる4量体であり、分解反応の至適pHは8.0であることも明らかにした。

第5章ではピルビン酸生産菌*E. coli* W1485lip2を第3章で構築したトリプトファナーゼ高発現プラスミドで形質転換し、この菌でピルビン酸生産とトリプトファナーゼを同時に生産させ、引き続きL-トリプトファン合成を行う事を試みている。ピルビン酸発酵の培養途中にIPTGと同時に種々の栄養素を補充添加することにより、培養開始から40時間後には70g/literのグルコースから28.6g/literのピルビン酸を得、さらに菌体内タンパクの約30%を占めるトリプトファナーゼを誘導させた。この発酵液にインドール、アンモニアを加えることで、L-トリプトファン合成反応を行い、反応開始から36時間後には23.7g/literのL-トリプトファンを得た。これにより従来トリプトファナーゼ誘導とピルビン酸発酵を別々に行っていたものを一度の培養で行うことが可能となり、もって生産プロセスの時間短縮と簡略化に成功している。さらに、乳加工品製造の副生物で安価なバイオマスのひとつであるラクトースが、グルコースに代わる炭素源として、またIPTGに代わるインデューサーとして利用できる事を実証した。

以上のように本研究では、*Enterobacter aerogenes*由来のトリプトファナーゼとその遺伝子についての基礎的知見を明らかにし、さらにこの酵素を用いたL-トリプトファン生産の効率化、実用化に必要な技術的課題のいくつかを解決した。

よって、審査員一同は別に行った最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者川崎公誠は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。