

学位論文題名

メタノール資化性菌 *Methylophilus methylotrophus* を
用いた L-lysine 生産菌としての育種および
フェドバッチ培養法の確立

学位論文内容の要旨

【背景、及び目的】

リジンは飼料用添加物として重要なアミノ酸であり、主にコリネ型細菌を用いた発酵法により全世界で年間に 85 万トン以上生産されている。現在の発酵産業では主に糖系原料が使用されているが、こうした糖系原料は、近年になり価格が急上昇している。アミノ酸の価格は原料価格に大きく依存しているため、原料価格の急騰、また今後の人口増加に伴う食糧との競合、すなわち炭素源争奪により、単一原料への依存は大きなビジネスリスクともなり得る。メタノールは、糖系原料と比べ比較的安価で、かつ非可食性炭素源であるため、将来の世界レベルでの構造的な炭素源の枯渇に対応する未来型の発酵原料であると考えられる。更に、農作物に由来する糖系原料は水資源がある温暖な地域でしか基本的には入手できず、また天候などに生産量が変動し、入手困難になることもあるのに対し、メタノールは糖系原料が入手困難な地域でも比較的安定的に入手しやすく、消費立地を基本戦略とする場合、従来とは異なる地域への工場進出を可能にし、これにより新たな市場を獲得できる可能性もある。

以上のような背景から、当社において偏性メタノール資化性細菌である *Methylophilus methylotrophus* を親株として用いたアミノ酸生産菌の育種開発が開始された。*M. methylotrophus* は、1970 年代に ICI 社が Single Cell Protein としての商品化に成功しており、菌体の安全性、特許的拘束等の観点からアミノ酸生産菌の親株として適していると考えられる。ただし、本菌を用いた研究報告例は必ずしも多くなく、アミノ酸生産を行った報告に関しては皆無である。そこで、私は本菌株を用いて、以下の研究を行った。

- ・ 自然突然変異株からの高リジン生産能を保有するアミノ酸要求株の分離、及びその機構解析
 - ・ リジン生産時のボトルネック解析、及び代謝工学的手法を用いた高リジン生産菌株の育種
 - ・ フェドバッチ培養における最適リジン生産条件の検討、及びイオン強度が本菌株の代謝に与える影響の解析
- 以下にそれぞれの研究内容について概説する。

【研究内容】

1. 自然突然変異株からの高リジン生産能を保有するアミノ酸要求株の分離、及びその機構解析

本研究では、高リジン生産菌株の取得を目指して、*M. methylotrophus* AS1 株を用いて、自然突然変異によるアミノ酸要求株の取得を試みた。取得された株の中でも、メチオニン要求株である *M. methylotrophus* 102/pSEA10 株

は、対照の *M. methylotrophus* AS1/pSEA10 と比較して 1.5 倍程度のリジンを生産する事が明らかとなった。このリジン生産能向上原因を解明するために、ゲノム配列からメチオニン生合成経路を推測し、この経路を構成する酵素をコードする遺伝子の変異点解析を行ったところ、*metF* (5,10-methylene-tetra-hydrofolate) 遺伝子の ORF 中の 329 番目のコドンに点変異が見つかり、*metF* 遺伝子が機能していない可能性が考えられた。そのため、実際に遺伝子組み換え手法を用いて *metF* 遺伝子破壊株を構築し、pSEA10 を導入後、リジン生産量を調べたところ、*M. methylotrophus* 102/pSEA10 株と同等のリジン生産量を示すことが明らかとなり、*metF* 遺伝子破壊がリジン生産向上に寄与する可能性が示された。

2. リジン生産時のボトルネック解析、及び代謝工学的手法を用いた高リジン生産菌株の育種

代謝工学的手法を用いてアミノ酸生産菌の育種開発を行う場合、代謝上のボトルネックを除去する事が非常に有効である事が知られている。バッチ培養での検討の結果、前述の *M. methylotrophus* 102/pSEA10 株では、ピルビン酸の供給がリジン生合成のボトルネックである可能性が推測された。*M. methylotrophus* は Ribulose monophosphate pathway (RuMP) 経由でメタノールを同化し、fructose-6-phosphate から Entner-Doudoroff 経路 (ED 経路) を経由してピルビン酸が供給されるため、この ED 経路が主要なピルビン酸供給経路であると考えられている。ED 経路は、6-phosphogluconate aldolase と 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase により構成されており、本経路を強化することにより、細胞内ピルビン酸供給量を増加させ、リジン生産量が向上する可能性が推測された。そこで、*E. coli* 由来の 6-phosphogluconate aldolase と 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase をコードする *edd-eda* オペロンの発現強化株を構築したところ、酵素活性が 20 倍に上昇し、リジン生産量は親株と比較して 1.2 倍に上昇した。更に、細胞内代謝物質の解析を行った所、*edd-eda* 発現強化株は、親株と比較して、細胞内ピルビン酸濃度が上昇している事が明らかとなり、前述の仮説を支持する結果が得られた。

3. フェドバッチ培養における最適リジン生産条件の検討、及びイオン強度が本菌株の代謝に与える影響の解析

前項までに、これまでの親株と比較して、顕著にリジン生産能力が向上した菌株が育種された。そこで、ジャーファーマンターを用いフェドバッチ培養条件検討を実施した。これより、フィード培地として、窒素源(硫酸)と栄養源成分(メチオニン、 K_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 $CuSO_4 \cdot 5aq$ 、 $MnSO_4 \cdot 5aq$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7aq$ 、 $FeCl_3$ 、 $MgSO_4 \cdot 7aq$ 、 $CaCl_2 \cdot 2aq$)を添加することにより、培養中に菌体増殖が継続し、リジン生産量が 7.86g に到達した。更に、窒素源成分中のアンモニアに対するカウンターイオン(塩化物イオン、硫酸イオン、グルタミン酸、コハク酸、クエン酸)の影響を調べたところ、塩化物イオンやグルタミン酸を用いた場合、その他の条件と比較して、菌体増殖が向上し、リジン生産量が増加する傾向が見られ、最終的にリジン生産量が 9.0g に到達した。本実験の解析を行った所、菌体増殖速度と培地中のイオン強度に高い相関性が見られた。そこで、本原因を調べるために、アンモニアに対するカウンターイオンとして塩化物イオン、もしくは硫酸イオンを用いた条件で培養した菌体を用いて、メタノールからピルビン酸に至るまでの反応に関与する様々な酵素の活性測定を行った。この比較より、イオン強度が高い条件ではメタノール酸化活性が顕著に低下する傾向が見られた。メタノール酸化活性は、methanol dehydrogenase、cytochrome cL、cytochrome cH、cytochrome c oxidase から構成されており、メタノールをフォルムアルデヒドに変換する反応を担っているため、メタノール資化時に重要な役割を果たす。これらのメタノール酸化活性を構成する因子は、静電結合により安定化している事が報告されているため、イオン強度の高い条件では、この結合が不安定になり、活性低下の原因となったものと推測された。今回の検討より、本菌株を用いた培養条件では、イオン強度を出来るだけ低く維持する事が重要であることを明らかとした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 教 授 田 口 精 一 (工学研究科)

副 査 准教授 曾 根 輝 雄

副 査 助 教 田 中 みち子

学 位 論 文 題 名

メタノール資化性菌 *Methylophilus methylotrophus* を 用いた L-lysine 生産菌としての育種および フェドバッチ培養法の確立

本論文は、本文 84 頁、図 12、表 12、3 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

【背景、及び目的】

リジンは飼料用添加物として重要なアミノ酸であり、主にコリネ型細菌を用いた発酵法により全世界で年間に 85 万トン以上生産されている。現在の発酵産業では主に糖系原料が使用されているが、こうした糖系原料は、近年になり価格が急上昇している。アミノ酸の価格は原料価格に大きく依存しているため、原料価格の急騰、また今後の人口増加に伴う食糧との競合、すなわち炭素源争奪により、単一原料への依存は大きなビジネスリスクともなり得る。メタノールは、糖系原料と比べ比較的安価で、かつ非可食性炭素源であるため、将来の世界レベルでの構造的な炭素源の枯渇に対応する未来型の発酵原料であると考えられる。更に、メタノールは糖系原料が入手困難な地域でも比較的安定的に入手しやすく、消費立地を基本戦略とする場合、従来とは異なる地域への工場進出を可能にし、これにより新たな市場を獲得できる可能性もある。

以上のような背景から、我々は偏性メタノール資化性細菌である *Methylophilus methylotrophus* を親株として用いたアミノ酸生産菌の育種開発を開始した。以下に、研究内容について概説する。

【研究内容】

1. 自然突然変異株からの高リジン生産能を保有するアミノ酸要求株の分離、及びその機構解析

高リジン生産菌株の取得を目指して、*M. methylotrophus* AS1 株を用いて、自然突然変異によるアミノ酸要求株の取得を試みた。取得された株の中でも、メチオニン要求株である *M. methylotrophus* 102/pSEA10 株は、対照の *M. methylotrophus* AS1/pSEA10 と比較して 1.5 倍程度のリジンを生産する事が明らかとなった。この株の、変異点解析を行ったところ、*metF* (5,10-methylene-tetra-hydrofolate) 遺伝子が機能していない可能性が考えられた。そこで、遺伝子組み換え手法を用いて *metF* 遺伝子破壊株を

構築したところ、*M. methylotrophus* 102/pSEA10 株と同等のリジン生産量を示すことが明らかとなり、*metF* 遺伝子破壊がリジン生産向上に寄与する可能性が示された。

2. リジン生産時のボトルネック解析、及び代謝工学的手法を用いた高リジン生産菌株の育種

代謝工学的手法を用いてアミノ酸生産菌の育種開発を行う場合、代謝上のボトルネックを除去する事が非常に有効である事が知られている。前述の *M. methylotrophus* 102/pSEA10 株では、ピルビン酸の供給がリジン合成のボトルネックである可能性が推測された。*M. methylotrophus* では、Entner-Doudoroff 経路 (ED 経路) が主要なピルビン酸供給経路であると考えられている。そこで、ED 経路を構成する *E. coli* 由来の *edd-eda* オペロンの発現強化株を構築したところ、酵素活性が 20 倍に上昇し、リジン生産量は親株と比較して 1.2 倍に上昇した。更に、細胞内代謝物質の解析を行った所、*edd-eda* 発現強化株は、親株と比較して、細胞内ピルビン酸濃度が上昇している事が明らかとなり、前述の仮説を支持する結果が得られた。

3. フェドバッチ培養における最適リジン生産条件の検討、及びイオン強度が本菌株の代謝に与える影響の解析

前項までに構築した株を用い、フェドバッチ培養条件検討を実施した。結果、フィード培地として窒素源 (硫酸) と栄養源成分 (アミノ酸、無機塩類) を添加することにより、培養中に菌体増殖が継続し、リジン生産量向上した。更に、窒素源成分中のアンモニアに対するカウンターイオンとして、一価のアニオンである塩化物イオンやグルタミン酸を用いた場合、菌体増殖、及びリジン生産量が顕著に向上した。本実験では、菌体増殖速度と培地中のイオン強度に高い相関性が見られた。そこで、アンモニアに対するカウンターイオンとして塩化物イオン、もしくは硫酸イオンを用いた条件で培養した菌体を用いて、メタノールからピルビン酸に至るまでの反応に関与する様々な酵素活性測定を行ったところ、イオン強度が高い条件ではメタノール酸化活性が顕著に低下する傾向が見られた。メタノール酸化活性を構成する因子 (methanol dehydrogenase, cytochrome cL, cytochrome cH, cytochrome c oxidase) は、静電結合により安定化しているため、イオン強度の高い条件では、この結合が不安定になり活性低下原因となったと推測された。今回の検討より、本菌株を用いた培養条件では、イオン強度を出来るだけ低く維持する事が重要であることを明らかとした。

よって、審査員一同は、石川浩平が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。