

論文内容の要旨

論文題目 好気性培養における³¹P NMRを用いた細胞内代謝物の非破壊測定に関する研究

氏名 野口 泰志

微生物反応による物質生産プロセスの最適化工程において、菌体量、pH、温度、基質濃度及び、溶存酸素濃度といった培養環境の設定は極めて重要な問題である。なかでも、酸素は、好気的な微生物代謝の方向性を質的にも量的にも支配している。例えば、アミノ酸発酵に代表される好気性反応において酸素供給不足の与える影響は、酢酸や、乳酸といった有機酸などの副生物をあたえるであろう。また、ある種の微生物反応においては、溶存酸素の過剰供給によっても、生産物の減少が報告されている。

In vivo NMR法は、細胞内の代謝情報を得るのに極めて有効な手段であり、大腸菌、酵母、生体組織等の種々の分野で測定されている。その長所として、非破壊で、連続的に細胞内のダイナミックな代謝活動の変化をとらえられることが挙げられる。とりわけ、³¹P NMR測定法は、*in vitro*では測定の難しい、ATPに代表される高エネルギーリン酸化合物や、菌体内pHといった好気的な代謝反応において極めて重要な細胞内エネルギー状態に関する情報を取得することが可能であり、溶存酸素濃度や、酸化還元電位といった培養環境の与える影響を明らかにする際に、大きな可能性を秘めている。しかしながら、従来、その測定は、NMR装置自体の物理的な制約もあり、主として試験管内に懸濁された静止菌体を対象として実験が行われており、実際の物質生産プロセスにおける菌体自体や、培養条件の課題を解決することは困難であった。従って、本手法を用いた培養条件の最適化を行うためには、実用培養系を対象とした *in vivo* NMR測定を実現すること、即ち、測定対象となる菌体を前提となる条件下で培養することにより、その代謝活動を維持できるようなバイオリアクターの構築が必須であった。

1. ^{31}P NMR を用いた細胞内代謝物の非破壊測定を目的とした、外部還流型バイオリアクターの構築

本研究では、上記前提に基づき、まず、NMR 管と独立した培養制御機構を NMR 装置外部に有し、且つ、測定対象となる NMR 管内の溶存酸素濃度を適切に制御できような新規バイオリアクターを構築した(図1)。本培養装置の特徴として、NMR 試料管と並列に溶存酸素濃度センサーを装備した溶存酸素モニター管を循環路におくことで、実際の NMR 測定の対象となる、NMR 試料管内の培養環境を適切にモニター可能であることが挙げられる。本培養装置を用いて、大腸菌野生株の ^{31}P NMR スペクトルを取得したところ、NMR 試料管内にセンサーを装備し、直接空気を供給していた従来型の培養装置に比して、S/N 及び分解能の顕著な改善がみられることがわかった(図 2)。

2. *Escherichia coli* の細胞内 ATP 濃度の溶存酸素濃度に対する依存性の検証

E. coli 野生株を用いて、溶存酸素濃度の与える細胞内エネルギー状態への影響を検証したところ、本装置を用いることで、増殖期から定常期に至る細胞内 ATP、ADP 及び、細胞内 pH の変動を観察することが可能であることがわかり、構築したバイオリアクターは長時間または、複雑な制御をともなう反応プロセスの解析に対しても、十分に適用可能であることがわかった。

3. *Corynebacterium ammoniagnes* 由来の xanthisine-5'-monophosphate 生産株の細胞内エネルギー代謝の解析

実際の微生物による物質生産の例として、*C. ammoniagnes* ATCC6872 由来の XMP 生産株における細胞内エネルギー状態の与えるヌクレオチド生産に対する影響を ^{31}P NMR 測定法を用いて検証した。その結果、顕著な菌体内 ATP 濃度及び、ATP/ADP 比の低下が XMP 生産期特有の現象として生じること、さらに、この ATP/ADP 比の低下がグルタミン酸を培地中に添加することで改善することが明らかとなった。同時に、このグルタミン酸を添加によって、XMP 生産量の増加及び、hypoxanthine 副生量の低減を誘導することもわかった。

4. Saturation transfer 法を用いた *Escherichia coli* の ATP 生成効率の測定

In vivo ^{31}P NMR 測定法による細胞内代謝の速度論的な検証すべく、好気条件下の大腸菌野生株の酸化的リン酸化による ATP 生成収率(P/O 比)を saturation transfer 法(以下 ST 法)によって推定を行った。その結果、グルコース消費速度を制限しない標準条件及び制限条件と、異なる糖消費速度条件下において、それぞれ、P/O 比は 1.4 ± 0.3 及び 1.5 ± 0.1 と推定され、好気条件にも関わらず、何れのケースにおいても、理論最大値(P/O 比=2.3)を大きく下回るものとなった。また、ST 実験下における呼吸鎖酵素群の酵素活性を測定した結果、プロトン輸送効率の高い NADH:ubiquinone oxidoreductase である NDH-1 は、総 NADH 酸化活性の約 60%程度を占めるに留まり、さらに *bo* 型ユビキノール酸化酵素に至っては、総

ユビキノール酸化活性の40%以下であることが分かり、P/O比の推定を支持するものとなった。本結果は、好気条件下においても菌体増殖が定常期への移行に伴い、効率の低い一連の呼吸鎖酵素群の活性が増加することに起因しているものと推定された。従って、*bo* 型ユビキノール酸化酵素活性の高発現または、*bd* 型酸化酵素の欠損株の利用は、大腸菌を利用した物質生産工程における生成収率の向上に大きな手段となり得るものと思われた。

以上の結果より、本研究で報告した外部還流型の培養装置を駆使することで、細胞内代謝物を測定できるのみだけでなく、速度論的な解析も可能となり、微生物の好気呼吸システム全般を解析するに有力な手段となり得ることがわかった。また、本手法により、微生物による物質生産工程の最適化や、代謝律速点の解析等の機構研究にも利用できるがわかった。

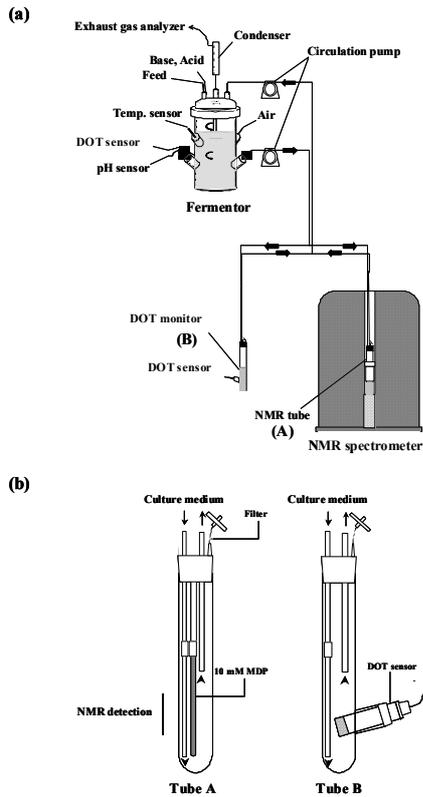


図1 新規設計した外部循環型バイオリアクターの構成
 (a) ベッセル本体及び、外部試料管の外部還流路における配置
 (b) Tube A (DOT モニター管)と tube B (NMR 測定管)の構成

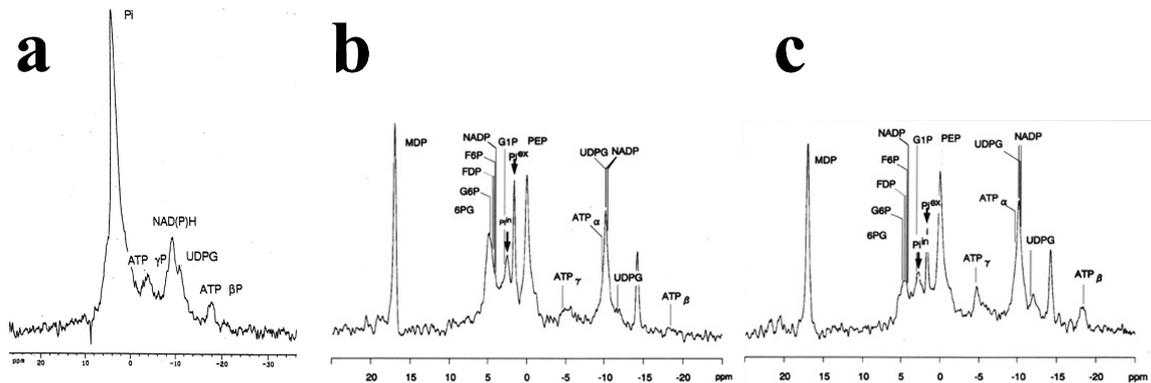


図2 菌体懸濁液と、外部還流型バイオリアクターを用いた増殖時の大腸菌の ^{31}P NMR スペクトルの比較。

菌体懸濁液(Takesada ら 2000 *J. Biotechnol.*)の ^{31}P NMR スペクトル(a), 外部還流型バイオリアクターによる代表的な ^{31}P NMR スペクトル(b,c) (b) 嫌気条件, (c) 好気条件. 図中の略語は, methylene-diphosphonic acid (MDP), 6PG (6-phosphoglycerate), G6P (glucose-6-phosphate), FDP (fructose-diphosphate), F6P (fructose-6-phosphate), intracellular inorganic phosphate (P_i^{in}), extracellular inorganic phosphate (P_i^{ex}), phosphodiester (PDE), uridine diphosphate hexose (UDP-glucose)及び, ATP α -, β -及び γ -phosphate.