

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 野口 泰志

本論文は好気性条件下における微生物反応を対象とした *in vivo* ^{31}P NMR 測定について、1) *in vivo* ^{31}P NMR 測定に最適化した新規バイオリクターの開発、2) 開発した測定装置を用いた *Escherichia coli* 野生株における細胞内 ATP 濃度の溶存酸素濃度依存性の検証、3) 同測定装置を用いた *Corynebacterium ammoniagenes* 由来の xanthosine-5'-monophosphate 生産株のエネルギー代謝の解析、4) 同測定装置において ^{31}P NMR saturation transfer 法を適用することで *E. coli* 野生株の ATP 生成効率の測定を行ったもので、4章からなる。

第一章では、 ^{31}P NMR に最適化したバイオリクターの構築について述べている。従来、NMR 装置自体の物理的な制約もあり、主として試料管内に懸濁された静止菌体を対象として測定が行われており、長時間且つ複雑な反応制御を伴う実生産プロセスに対する解析は行われていなかった。本研究では、従来の問題点を解決すべく、NMR 試料管とは独立に NMR 装置外部に培養制御機構を設置した外部環流型のバイオリクターを開発した。環流型バイオリクターの課題として、循環路における各区画間の溶存酸素濃度の維持が挙げられる。これに対して溶存酸素濃度センサーを装備した試料管を外部循環路に NMR 試料管と並列配置することで、実際の測定対象となる NMR 試料管内の培養環境を間接的にモニターし且つ、制御できるように工夫した。本培養装置を用いて、大腸菌 *E. coli* の ^{31}P NMR スペクトルを取得したところ、従来型の培養装置に比して、顕著な S/N 及び分解能の改善がみられることがわかった。

第二章では、*E. coli* における細胞内 ATP 濃度の溶存酸素濃度依存性について検証している。増殖期の *E. coli* 野生株に対して好気条件から嫌気条件に至るまで、様々な溶存酸素濃度条件下で連続的に ^{31}P NMR 測定を行った。その結果、好気条件から嫌気条件にシフトすると、顕著な菌体内 ATP 濃度の低下及び、解糖系の糖リン酸化化合物の増加を確認した。このとき、細胞内 pH は若干低下(7.45→7.32)することがわかった。これらの結果は、酸化的リン酸化反応の急激な低下、さらには嫌氣的発酵への菌体内の代謝状態の移行を表しているものと推察された。以上の結果より、構築した *in vivo* ^{31}P NMR 測定装置により、溶存酸素濃度の与える菌体内代謝物の動的な変化を連続的に解析できることを確認した。

第三章では、実生産プロセスの解析例として、*C. ammoniagenes* ATCC6872 由来の xanthosine-5'-monophosphate (以下 XMP) 生産株における ^{31}P NMR 測定結果について述べている。XMP に代表されるヌクレオチド合成は、その過程で多量の ATP の消費を伴う。実際、 ^{31}P NMR 測定によって、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を確認した。加えて、この ATP/ADP 比の低下がグルタミン酸を培地中に添加す

ることで改善し、このとき XMP 生産収率の増加及び、本反応の主要な副生産物である hypoxanthine 量が低下することを明らかにした。この XMP 生産量の増加については、XMP 生合成酵素である IMP dehydrogenase が菌体内 ATP 量に依存して活性化されることが報告されており、グルタミン酸添加効果の実体は、菌体内 ATP 量の確保のために必要な TCA 回路の基質源として機能していることが推察された。

第四章では ^{31}P NMR saturation transfer 法を用いた *E.coli* 野生株の ATP 生成効率の推定について述べている。*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) によって測定を行った。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 比の推定結果を支持するものとなった。本現象は、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、*E.coli* 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。

以上本論文は、好気性条件下における微生物反応を対象とした *in vivo* ^{31}P NMR 測定について、最適化した新規バイオリアクターの開発とそれを実際の微生物に応用した結果を述べたものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。