

[ 別 紙 2 ]

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 \_\_\_\_\_ 今泉 明 \_\_\_\_\_

アミノ酸は調味料、飼料添加物、医薬品原料、化成品原料など幅広い用途に用いられ、その需要は年々高まっている。現在多くのアミノ酸は *Corynebacterium glutamicum* や *Escherichia coli* などの微生物を用いた発酵法により生産されている。従来、アミノ酸生産菌の開発は最終生産物による代謝阻害・抑制の解除や、目的生産物への生合成経路の強化、不要な副生物の生成経路の遮断を行うことなどにより行われてきた。一方で、このような手法により取得された生産菌においては、目的物質の生産速度は増殖定常期初期において最大に達した後、経時的に低下する傾向が認められる。工業生産上、生産速度は最大値のまま一定に保たれることが望ましく、増殖定常期での目的物質の生産速度の維持は、工業生産に耐え得るアミノ酸生産菌における重要な形質となっている。本論文は、*E.coli* のアミノ酸過剰生成株を用い、アミノ酸発酵過程で発生しているストレス、具体的には増殖定常期、要求アミノ酸飢餓への応答に関与する因子の発酵生産能へ及ぼす影響を解析し、工業生産菌株の新たな育種方法について検討を行ったもので、緒論とそれに続く3章からなる。

緒論において研究の背景を述べた後、第1章においては様々な培養条件で *E. coli* 野生株を培養した際に、増殖定常期に特異的に発現が上昇する遺伝子群について DNA マクロアレイを用いて抽出することを試みた。その中でいずれの条件でも非常に強く増殖定常期での発現が上昇する遺伝子の一つとして *rmf* 遺伝子を見出した。本遺伝子の産物である RMF (Ribosome Modulation Factor) タンパク質は、リボソームを2量体化することで翻訳活性を停止させることが知られており、アミノ酸生産能を低下させる因子となっていることが考えられた。そこで、*E. coli* のリジン過剰生成株 WC196 より *rmf* 遺伝子の破壊株を取得し、そのリジン生産能の評価

を行った。その結果、*rmf* 遺伝子の破壊株では増殖定常期でのリジンの生産能が大きく向上することが認められた。

第2章においては *rmf* 遺伝子破壊株の培養特性を解析し、リン欠乏時における増殖の *rmf* 欠損による変化を見出した。更に遺伝子発現解析を行った結果、遺伝子破壊株においては、リボソームタンパク質をコードする遺伝子群の発現が低下していること。また、リンが枯渇したときに発現することが知られている Pho レギュロン遺伝子群が恒常的に高発現していることが見いだされた。この結果と、RMF タンパクの機能、菌体内のリボソーム量制御機構などを考慮し、リボソーム生合成機構とリン代謝機構の間に、これまで知られていない新規の制御機構が存在することを示唆した。更に、工業的に有用な酵素である *Morganella morganii* 由来の酸性フォスファターゼの *E. coli* を用いた発現系について、宿主 *E. coli* の *rmf* 遺伝子を破壊することで、その生産量が 1.5~2 倍向上することを示している。

第3章においては、*rmf* 遺伝子の発現を正に制御することが知られている ppGpp (グアノシン-5'二リン酸3'二リン酸) に着目した解析を行っている。ppGpp は、バクテリアがアミノ酸飢餓などのストレス条件下で菌体内に蓄積し、緊縮応答を誘導する。アミノ酸生産菌はその育種の結果アミノ酸要求性を示す株が多いため、発酵過程中に要求アミノ酸の飢餓により ppGpp が蓄積していると推測される。しかしながら、ppGpp の蓄積がアミノ酸発酵に対する影響は未だ不明である。そこで、ppGpp 合成酵素をコードする *relA* 遺伝子の破壊株・増幅株を構築し、その特性を解析した。その結果、グルタミン酸過剰生成株の *relA* 遺伝子破壊株においては、生育が阻害されるとともに、グルタミン酸生産量が大きく低下していた。一方、*relA* 遺伝子過剰発現株においては、グルタミン酸生産能が顕著に上昇した。*relA* 遺伝子過剰発現によるアミノ酸生産能向上は、リジンなどの過剰生成株においても認められ、ppGpp はアミノ酸発酵が成立するための必須の因子であることが示唆された。更に、要求アミノ酸の枯渇に伴う菌体内 ppGpp 蓄積の上昇が、グルタミン酸過剰生産を誘導することを示す結果を得ている。

以上、本論文は、*E. coli* のアミノ酸過剰生産株を用いたアミノ酸発酵生産過程において、*rmf* 遺伝子が増殖定常期の発酵生産能の低下に関与していること。さらに、要求アミノ酸の枯渇に伴い *relA* 遺伝子産物により合成される ppGpp が菌体内に蓄積し、アミノ酸の過剰生成が誘導されることを明らかとしたもので、バクテリアによるアミノ酸過剰生産が、従来考えられていたような代謝経路の変異等のみならず、より普遍的な生理的調節機能にも大きく左右されることを示唆している。これらの知見は学術上、また応用上極めて価値の高いものであり、よって審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。