

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 郡司 義哉

本論文は、アミノ酸発酵における資化原料として、従来の糖系原料に代わって安価で高純度なメタノールに着目し、メタノールを原料としたアミノ酸、特に L-リジン(L-lysine)の発酵生産を試みた一連の研究をまとめたものである。すなわち、メタノール資化性細菌 *Methylophilus methylotrophus* の L-リジン代謝経路およびその代謝制御を解析し、その知見に基づき、変異処理や遺伝子操作による計画的育種で L-リジンの発酵生産量を上げ、とくに効率的な発酵生産に必須な細胞外への L-リジンの排出過程の改良を試み、さらには、その過程で得られた変異型排出遺伝子の性質を解析したものであり、総合性の高い微生物育種研究であることが大きな特長である。本論文は序章と四章および終章から構成されている。

研究の背景と意義および目的を述べた序章に続き、第一章では、種々のメタノール資化性細菌の中から、出発材料の親株としてグラム陰性偏性メタノール資化性菌、*M. methylotrophus* を選択し、本菌の L-リジン代謝解析を行った結果をまとめている。L-リジンのアナログである S-(2-aminoethyl)-L-cysteine (AEC) 耐性株から L-リジンを培地中に微量蓄積する株 G49 を分離し、このアスパラギン酸キナーゼ(AK)とジヒドロジピコリン酸合成酵素(DDPS)のフィードバック阻害が脱感作されていることを見出した。また *M. methylotrophus* のジヒドロジピコリン酸還元酵素(DDPR)が L-リジンによるフィードバック阻害を受けるといふ、特徴的な代謝制御システムを発見している。

第二章では、代謝制御解析の結果、本菌においては AK、DDPS に加えて DDPR の各制御を解除することで L-リジン生産量が増大すると予想し、いずれも L-リジンによる阻害を受けない、大腸菌由来の変異型 AK、変異型 DDPS、および野生型 DDPR をそれぞれコードする *lysC\**、*dapA\**、および *dapB* 遺伝子を広宿主域ベクターに搭載して、AEC 耐性株 G49 に導入したところ、L-リジン生産が顕著に増大したことを述べている。

第三章では、*M. methylotrophus* にて変異型 DDPS 酵素量を増大させると、培地中に L-リジンが分泌されるが、同時に細胞内の L-リジン濃度も顕著に上昇していたことから、L-リジンの細胞外への排出が制限になっている可能性が示唆された。そこで細胞外への L-リジン分泌を促進するために *Corynebacterium glutamicum* 由来の L-リジン/L-アルギニン排出担体(LysE)の *M. methylotrophus* への遺伝子導入を試みたところ、多くの細胞は生育できず、その中から自然変異が導入された特別な *lysE*(*lysE24*と命名)が分離された。*LysE24*は *M. methylotrophus* に安定に導入でき、さらに L-リジン過剰生産を誘導することを見出している。また、変異型 DDPS をコードする *dapA\**および *lysE24*を同時に持つ *M. methylotrophus* では、相乗的に L-リジン生産量が増加し、それぞれを単独で持つ株と比較して約 10 倍となり、本株のジャーファーメンターでの L-リジン生産量は 11.3 g/L に達した。

第四章では、*M. methylotrophus* で L-リジン排出活性を示す *LysE24* は、*lysE*-ORF の

ほぼ中央にフレームシフト変異があり、本来より短い ORF で終了するが、L-リジン分泌誘導活性の発揮にはその ORF の下流領域も必須であることを明らかにしている。そして、種々の変異遺伝子を作成して調べた結果、LysE24 では、短い ORF の翻訳停止の後、ORF の翻訳が再開し、結局、LysE24 から 2 種のペプチドが合成されることを明らかにしている。また、LysE24 は、その本来の宿主である *C. glutamicum* や大腸菌中では L-リジン分泌誘導活性を示さず、別のメタノール資化性菌である *Methylobacillus glycogens* ではその活性を示したことから、LysE24 は 2 個に分割された LysE 蛋白質が複合体を形成したような構造をもつ変異型であり、この特徴的な構造がメタノール資化性菌で、L-リジン排出活性を発揮するために必須である可能性を示唆した。

終章においては本論文から得られた知見を要約し、今後の展望を述べている。

以上、本論文は *M. methylotrophus* の L-リジン代謝解析を行って代謝制御上の興味深い特徴を見出し、L-リジンを過剰生産する株を取得することに成功した。さらに細胞外への L-リジンの排出障害を見出して異種排出系を導入し、偏性メタノール資化性菌を用いたメタノールからの直接発酵生産としては最も高い発酵生産性を得ることに成功している。異種排出系を導入してアミノ酸発酵生産性を向上させた例は本研究が初めてであり、当該分野に新知見を与えたものとして学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が、博士(農学)の学術論文としての価値あるものと認めた。