

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 林 幹 朗

本論文は、*Corynebacterium glutamicum* のアミノ酸発酵に関わるトランスクリプトーム解析系を開発し、実用株のリジン高生産性の原因を解析した研究をまとめたものである。アミノ酸生産菌 *C. glutamicum* は各種アミノ酸発酵に用いられる産業上重要な細菌である。*C. glutamicum* のゲノム情報を利用した「ゲノム育種」では、生産菌のゲノム解析に基づいてアミノ酸生産に有効な変異を特定し、それらを野生株に積み上げて最少の有効変異のみから成る変異株を目指して育種してきた。しかし、未知の制御機構による有効変異が存在するとその抽出は容易ではない。本論文では、アミノ酸生産に関わる未知の制御を探る1つの手段として、*C. glutamicum* のDNA マイクロアレイを開発し、代謝制御のトランスクリプトーム解析とゲノム育種への応用に関する研究を行なった。本論文は5章から構成されている。

本研究の背景と目的を述べた第1章に続き、第2章では、*C. glutamicum* のトランスクリプトーム解析系の開発を行なった。まず、ゲノム情報をもとに、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路などの中央糖代謝とアミノ酸合成経路の約 120 遺伝子に関してDNA マイクロアレイを作製した。次いで、野生株を用い、酢酸代謝のトランスクリプトーム解析を行なった。酢酸を単一炭素源とした場合、生育に必要なアミノ酸、核酸などを合成するために糖新生が促進されているはずである。TCA 回路から糖新生に向かうルートとして、オキサロ酢酸からホスホエノールピルビン酸に向かうルートで働く *pck* の転写レベルが酢酸培養で10倍以上に上昇しており、このルートが糖新生で機能することが示唆された。*C. glutamicum* に2つ存在するグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のうち、酢酸培養時に *gapA* は0.4倍に下がっているのに対し、*gapB* は4倍に上昇していた。2つの *gap* の発現が逆方向に制御されていることがわかり、解糖と糖新生の新たな制御ステップの存在が示唆された。

第3章では、変異育種された従来型リジン生産菌 B-6 株のトランスクリプトーム解析を行なった。ノーザン解析により、L-リジン合成の鍵酵素アスパルトキナーゼをコードする *lysC* の転写レベルが、B-6 株では野生株と比較して数倍に上昇していることを見出した。これは従来知られていない知見である。さらにトランスクリプトーム解析の結果、B-6 株では *lysC* のみならず、アミノ酸生合成遺伝子が全般的に発現上昇していることを見出した。

第4章では、トランスクリプトーム解析の結果をもとに、リジン生産のための有効変異の探索を行なった。アミノ酸生合成系の全般的な発現上昇は、大腸菌で知られる (p)ppGpp を介した緊縮応答を想像させる結果である。そこで、B-6 株のアミノ酸合成系遺

伝子に変異が入り、あるアミノ酸の飢餓状態になることで緊縮応答様の制御が誘起されている可能性を考えた。B-6 株は L-ロイシンの部分要求性を示すことから L-ロイシン合成経路上の変異を探索したところ、イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ大サブユニットをコードする *leuC* の変異、G456D が L-ロイシン部分要求性に関わっていることを見出した。

5L ジャー培養でこの *leuC* 変異の導入効果を検証したところ、L-リジン力価は約 14% 向上した。トランスクリプトーム解析の結果、*leuC* 変異株ではアスパルトキナーゼ遺伝子 *lysC* を含む、多くのアミノ酸合成系遺伝子の転写レベルが上昇していることが明らかになった。そこで *leuC* 変異による L-ロイシン制限効果と緊縮応答との関連を調べる目的で、(p)ppGpp の合成・分解に関わる *rel* 遺伝子の破壊効果を検証した。その結果、*rel* 欠失株でも *rel* + ベースでの効果と変わらず、*leuC* 変異は L-リジン生産性向上と転写変動をもたらすことが明らかになった。以上、L-リジン生産菌の *leuC* 変異は *rel* 依存の緊縮応答とは異なる、従来知られていない機構で *lysC* を含むアミノ酸合成系遺伝子の発現上昇を引き起こしていることを明らかにした。

最後の第 5 章において全体の総括と今後の展望を記している。

以上、本論文では、*C. glutamicum* の代謝酵素群に関する DNA マイクロアレイを開発し、これまでフィードバック阻害の解除が重要だとされてきた *C. glutamicum* のリジン発酵において、転写レベルの制御の重要性を示した。さらに本菌のアミノ酸発酵にグローバルな制御が関与することを示し、これが *rel* 遺伝子に依存しないことを示唆したことは、当該分野の新知見として学術上、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。