OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	METABOLIC ENGINEERING FOR 2-KETO-L-GULONIC ACID PRODUCTION IN GLUCONOBACTER
Author(s)	新城, 雅子
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39672
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏名	新城雅子
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 12213 号
学位授与年月日	平成8年1月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	METABOLIC ENGINEERING FOR 2－KETO－L－GULONIC ACID PRODUCTION IN *GLUCONOBACTER* （2－ケトーL－グロン酸生産グルコノバクター属菌株の代謝工学）
論文審査委員	（主査） 教授 今中 忠行 教授 大嶋 泰治　教授 室岡 義勝　教授 新名 惇彦

論文内容の要旨

本論文は，ビタミンCの製造中間体である2－ケト－L－グロン酸（2KGA）の醗酵生産菌の代謝工学に関する研究をまとめたもので緒論と本論7章で構成されている。

緒論では，本研究の目的と意義，およびその背景について述べ，さらに本研究の概略についても示している。

第一章では，ビタミンCの工業プロセスおよびその製造中間体の2KGAの醗酵法による生産に関わる研究の報告を紹介している。特に本研究の育種対象2KGA生産グルコノバクターの性質を述べ，更なる2KGA生産収量向上において，2KGA生成酵素系“膜結合型のL－ソルボース脱水素酵素（SDH）－細胞質性L－ソルボソン脱水素酵素（SNDH）”の細胞内での局在性が，“細胞膜－細胞質”であることが問題点であることを述べている。

第二章では，2KGA生産において基質浪費の代謝経路及びその関与レベルを明らかにしている。即ち，2KGAとして回収されない基質L－ソルボースの大部分は，CO_2として失われ，その発生には，主としてペントースリン酸経路が関与していることを明らかにしている。

第三章では，この細胞質における基質浪費の抑制を可能にする膜結合型のL－ソルボソン脱水素酵素（SNDH）をアセトバクター属の酢酸菌から見い出している。その菌株アセトバクターリクエファシエンスIFO 12258は，休止菌体反応でL－ソルボソンを化学量論的に2KGAに変換し，その酵素は，膜画分に局在していることを明らかにしている。

第四章では，2KGA生産グルコノバクターの宿主－ベクター系を開発している。遺伝子導入法としては，接合伝達法が有効であることを示し，ベクターとしては，2KGA生産菌株の内在性プラスミドの複製起点を用いてシャトルベクターとして作成したpGE1が，安定で宿主の生育や2KGA生産を阻害しない有用なベクターであることを明らかにしている。

第五章では，上記膜結合型L－ソルボソン脱水素酵素遺伝子をクローニングし，その塩基配列を決定している。推定されるアミノ酸配列から，そのアミノ末端領域で細胞膜に結合し，データバンクの蛋白質と有意な相同性を有しない新規な酵素であることを見い出している。

第六章では，クローン化したL－ソルボソン脱水素酵素遺伝子を2KGA生産菌株に導入して組換え体を作成したと

ころ，ソルボソン脱水素酵素はその膜画分に局在し，その膜画分のみで，Ｌ－ソルボースおよびＬ－ソルボソンから2KGAをほぼ化学量論的に生成することを見い出している。組換え体は，Ｌ－ソルボースおよびＬ－ソルボソンを基質とする休止菌体反応において宿主より高収率で2KGAを生成することを明らかにしている。

第七章では，本研究で得られた結果を総括し，2KGA生産を含む各種酸化醗酵を担う酢酸菌の代謝工学的手法を用いた更なる育種の可能性を論じている。

論文審査の結果の要旨

本論文は，現在の化学合成中心のビタミンＣ製造プロセスの改良のために，その製造中間体である2KGAを効率良く醗酵生産する微生物を代謝工学的手法を用い育種することを目的としたもので，主な成果を要約すると次の通りである。

1) 育種対象菌株グルコノバクターの基質浪費の代謝経路およびその関与レベルを放射性標識基質を用いて明らかにしている。

2) 酵素の局在性において目的の膜結合型のソルボソン脱水素酵素を，育種対象の宿主と同一の酢酸菌，アセトバクターから見い出している。

3) グルコノバクターの宿主－ベクター系を確立し，高い安定性と宿主の生育や2KGA生産活性に悪影響を与えない性質を有する工業プロセスに適したベクターを開発することに成功している。

4) アセトバクターから膜結合型Ｌ－ソルボソン脱水素酵素の遺伝子をクローン化し，その塩基配列を決定することにより，本ソルボソン脱水素酵素は，新規な膜結合型アルデヒド脱水素酵素であることを見い出している。

5) 本遺伝子をグルコノバクターに導入することにより，宿主膜結合型ソルボース脱水素酵素に加えて，膜結合型Ｌ－ソルボソン脱水素酵素を生理的に連結することに成功している。

6) 創製した組換え体が，Ｌ－ソルボースおよびＬ－ソルボソンを基質とする休止菌体反応において，宿主より高収率で2KGAを生成することを明らかにしている。

以上のように本論文は，従来の代謝工学手法にない新規な概念，即ち遺伝子操作技術を用いて膜結合型酵素系を工業微生物に導入し，その育種に成功している。これらの成果は応用微生物学および生物工学分野に対して貢献するところ大である。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。