

Title	イソブテンの微生物生産に関する研究
Author(s)	藤井, 隆夫
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/438
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	藤 井 隆 夫
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	第 8 7 7 4 号
学位授与の日付	平成元年 6 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	イソブテンの微生物生産に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 弘輔
	(副査) 教授 大嶋 泰治 教授 山田 靖宙 教授 菅 健一
	教授 高野 光男 教授 吉田 敏臣

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では *Rhodotorula minuta* IFO1102株が C_4 -ガス状炭化水素を生産し、その主成分がイソブテンであることを確認し、イソブテン生産の機構を解明したものである。

まず、 C_4 -ガス状炭化水素生産菌をスクリーニングし、 C_4 -ガス状炭化水素生産菌は広く分布すること、ガスはイソブテンが生産速度、生産量ともに高いことを明らかにしている。なかでも *R. minuta* IFO1102株が最大の生産速度を有することを認め以下の研究に使用している。

本菌のイソブテン生成には L-ロイシンと L-フェニールアラニンの添加が必要であり、L-フェニールアラニンはイソブテン生成酵素の誘導物質であり、L-ロイシンはイソブテンの前駆物質で、イソ吉草酸を経てイソブテンに変換されると推定している。

以上の結果に基づいて *R. minuta* IFO1102株を改良しイソブテン著量生産株の育種に成功している。すなわち、4-アザ-DL-ロイシンと p-フロロフェニールアラニンに対する耐性を付与した変異株 MNAP-34 を誘導したところ、この株は L-ロイシンと L-フェニールアラニン添加なしで著量のイソブテンを生産する。

ついで *R. minuta* IFO1102株のイソブテン生産の機構を明らかにするために、無細胞抽出液によるイソブテン生成系を構築している。すなわち、この菌のミクロゾーム画分に存在するチトクローム P-450 がイソブテンの生成反応に密接に関与していると推定している。この推定を確認するために、以下の実験を行っている。まずミクロゾーム画分から P-450 レダクターゼを可溶化し、各種カラムクロマトグラフィーによる処理を経て、単一なタンパク質にまで精製し、その性質を解明している。ついでチトクローム P-450 をミクロゾーム画分から可溶化し、各種カラムクロマトグラフィーによって精製し

その性質を明らかにしている。以上によって精製したチトクロームP-450とP-450レダクターゼとリン脂質を用いて小胞体を作成し、小胞体がイソ吉草酸からイソブテンを生成することを確認している。

最後にイソ吉草酸からイソブテン生成反応の機構を他のチトクロームP-450の反応と比較して推論している。

論文の審査結果の要旨

本論文は微生物とくに *Rhodotorula minuta* IFO1102株によるイソブテン生産を取扱ったもので、生産株の分離と育種、関与する酵素の精製とそれを用いた無細胞イソブテン生成系の再構築を行っており、次のような重要な結論を得ている。

- (1) 従来認められていなかったC₄-ガス状炭化水素とくにイソブテンが微生物によって生産されることを発見し、その能力が広く微生物にわたって分布していることを認めたこと。
- (2) 検索したイソブテン生産最良株 *R. minuta* IFO1102株においてイソブテン生産のため誘導物質としてL-フェニールアラニンが、また前区物質としてL-ロイシンが機能していること、およびL-ロイシンはイソ吉草酸を経てイソブテンに変換されることを明らかにしていること。
- (3) 本菌をL-ロイシンおよびL-フェニールアラニン蓄積菌に改良することによりイソブテン著量生産菌を育種していること。
- (4) *R. minuta* IFO1102株ミクロソーム画分よりチトクロームP-450およびP-450レダクターゼを均一にまで精製し、精製した二酵素とリン脂質から再構成した小胞体はイソ吉草酸からイソブテン生成能があることを証明していること。

以上のように本論文はガス状炭化水素イソブテンの生産について多くの基礎的知見を与えており、発酵生理学ならびに酵素学に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。