

Title	Engineering of Lactobacillus plantarum for L-Lysine Production
Author(s)	Muhammad, Nur Cahyanto
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46881
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	ムハマド ヌル チャハヤント Muhammad Nur Cahyanto
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 20290 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Engineering of <i>Lactobacillus plantarum</i> for L-Lysine Production (<i>Lactobacillus plantarum</i> のリジン合成における遺伝子工学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 関 達治 (副査) 教授 塩谷 捨明 教授 仁平 卓也

論文内容の要旨

通常は L-リジン含量の少ない食品や家畜飼料を、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を用いて醗酵させ、高リジン含量化した生産産物を得るため、*L. plantarum* L-リジン高生産株のための遺伝子工学的研究を行い、新規菌株を育種した。

第 1 章では、乳酸菌、サイレージ醗酵、及びリジン醗酵に関するこれまでの知見を概説し、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を用いたリジン醗酵の重要性を述べている。

第 2 章では、解読された、*L. plantarum* WCFS1 株のゲノム配列情報から、L-リジン生合成に関わる酵素遺伝子群を推定し、*L. plantarum* WCFS1 株と IAM12477 株から L-リジン生合成に関わる酵素遺伝子群を単離し、その遺伝子の機能を同定した。

まず、*L. plantarum* から、解読された情報を元に 4 つのステップの L-リジン生合成酵素遺伝子とホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子と思われる候補遺伝子を単離し、大腸菌にて個々の遺伝子の酵素活性を確認した。その結果、アスパルトキナーゼ *thrA2*、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ *asd2*、ジヒドロピコリン酸合成酵素 *dapA1*、ジヒドロピコリン酸レダクターゼ *dapB*、ホモセリンデヒドロゲナーゼ *hom1・hom2* の各遺伝子を世界で始めて同定した。また、*L. plantarum* IAM12477 株では、*asd2*、*dapA1*、*dapB* の 3 つの各遺伝子を同定した。

第 3 章では、*L. plantarum* IAM12477 株におけるアスパルトキナーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ジヒドロピコリン酸合成酵素、ジヒドロピコリン酸レダクターゼのリジン生合成における制御、抑制について検討した。アスパルトキナーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼは、アスパラギン酸ファミリーのアミノ酸で制御された。

第 4 章では、*L. plantarum* から、リジンアナログ耐性変異体を取得し、遺伝子工学的手法で L-リジン高生産株を育種した。

第 5 章では、本研究の総括を行った。

論文審査の結果の要旨

通常はL-リジン含量の少ない食品や家畜飼料を、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を用いて醗酵させ、高リジン含量化した生産産物を得るため、*L. plantarum* L-リジン高生産株のための遺伝子工学的研究を行い、新規菌株を育種した。

第1章では、まず、乳酸菌、サイレージ醗酵、及びリジン醗酵に関するこれまでの知見を概説した。特に、乳酸菌のリジン生合成系についてはほとんど情報がないために、この基礎的知見の集積が必要である。インドネシアにおける農業問題に触れ、サイレージの重要性について言及した。これらを踏まえて、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を用いたリジン醗酵の重要性を述べている。

第2章では、解読された *L. plantarum* NCIMB8826 (WCFS1) 株のゲノム配列情報から、L-リジン生合成に関わる酵素遺伝子群を推定し、*L. plantarum* WCFS1 株と IAM12477 株から L-リジン生合成に関わる酵素遺伝子群を単離し、その遺伝子の機能を同定した。

まず、*L. plantarum* IAM12477 株から染色体から、大腸菌アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ *asd2*、ジヒドロピコリン酸合成酵素 *dapA1*、ジヒドロピコリン酸レダクターゼ *dapB* の各遺伝子の変異体を相補させる手法で、*L. plantarum* の *asd2*、*dapA1*、*dapB* の各遺伝子を単離した。得られた形質転換体について遺伝子構造を解析して各酵素のアミノ酸配列を推定した。各遺伝子にコードされている酵素の活性を確認し、それぞれを *asd2*、*dapA1*、*dapB* であると同定した。

続いて、*L. plantarum* NCIMB8826 株について、解読された情報を元に4つのステップのL-リジン生合成酵素遺伝子とホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子と思われる候補遺伝子を単離し、大腸菌にて個々の遺伝子の酵素活性を確認した。その結果、アスパルトキナーゼ *thrA2*、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ *asd2*、ジヒドロピコリン酸合成酵素 *dapA1*、ジヒドロピコリン酸レダクターゼ *dapB*、ホモセリンデヒドロゲナーゼ *hom1* 及び *hom2* の各遺伝子を世界で始めて同定した。また、ホモセリンデヒドロゲナーゼ *Hom1* は、微弱ながらアスパルトキナーゼ活性も保持していること示している。

第3章では、*L. plantarum* IAM12477 株及び NCIMB8826 株におけるアスパルトキナーゼ (*ThrA2*、*Hom1*)、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (*Hom1*、*Hom2*)、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ジヒドロピコリン酸合成酵素、ジヒドロピコリン酸レダクターゼのリジン生合成における生合成中間体や合成最終産物 (リジン) による制御、抑制について検討した。アスパルトキナーゼ (*ThrA2*) は、その酵素活性がリジンによる最終生産物阻害を受け、その遺伝子 (*thrA2*) はアスパラギン酸ファミリーのアミノ酸 (L-トレオニン) で制御されることを示している。また、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (*Hom2*) は、その酵素活性がL-トレオニンで阻害を受けることを明らかにしている。その他合成系酵素アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ジヒドロピコリン酸合成酵素、ジヒドロピコリン酸レダクターゼについては、リジン生合成における制御、抑制を受けないことを示唆している。

第4章では、*L. plantarum* のリジンアナログ耐性変異体を取得し、変異遺伝子を同定した。*L. plantarum* IAM12477株のアスパルトキナーゼ *thrA2* 遺伝子は、最終生産物であるリジンにより、遺伝子発現が抑制されている。そこで、リジンアナログ耐性変異体を取得し、リジン醗酵時における遺伝子発現制御を解除することを目的とした。リジンアナログとして S-2-aminoethyl-L-cystein を用い、耐性変異体の出現率は 4.2×10^{-6} だった。アスパルトキナーゼ *thrA2* 変異遺伝子は、1263 番目の塩基が A から C に変わり、対応するアミノ酸残基がグルタミンからヒスチジンへと置換されていることが解明されている。本変異体を用い、遺伝子工学的手法により L-リジン高生産株を育種した。育種株は、リジンによる最終生産物阻害が回避され、*L. plantarum* IAM12477 株より増強されたリジン生産量 176 mg/l (培地中濃度) を示している。

第5章では、本研究の総括を行い、今後の課題及び展望について議論した。

以上のように、本論文は *Lactobacillus plantarum* のリジン合成における遺伝子工学的研究を行った。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。