



Title	アミノ酸発酵工業化プロセスの解析に応用可能な代謝フラックス解析法の開発
Author(s)	岩谷, 真太郎
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47324
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 ^{いわ}岩 ^{たに}谷 ^{しん}真 ^{たろう}太郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 4 5 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 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 **アミノ酸発酵工業化プロセスの解析に応用可能な代謝フラックス解析法の開発**

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 柳 田 敏 雄

(副査)
教 授 藤 田 一 郎 教 授 大 澤 五 住

論 文 内 容 の 要 旨

微生物の発酵作用を利用した物質生産は盛んに行われており、燃料としてのエタノール発酵やうま味調味料・飼料添加物としてのアミノ酸発酵はその代表例である。その発酵生産を効率良く行うためには、発酵過程で菌体内での代謝がどのように行われているかを知ることが大変重要である。微生物のゲノムが解読される以前から代謝工学という研究分野が提唱され、その一環として菌体内の物質の流れ（代謝フラックス）を計算する技術開発が精力的に行われてきた。代謝フラックスは、細胞の中でさまざまな制御がなされた結果として得られるものであるため、もっとも分かりやすいアウトプットであるといえる。

代謝フラックス解析の基本技術はすでに確立されているが、主に連続培養系において菌体内タンパク質の加水分解物アミノ酸の同位体分布比率から代謝フラックスを決定する手法で実際の工業化プロセスに応用することが難しかった。そこで工業的に最も活用されている流加培養系において代謝フラックス解析を可能にするため、菌体内遊離アミノ酸を LC-MS/MS で分析し、さらに菌体タンパク質の分解を計算に考慮することで、培養時期の変化に伴う代謝フラックス変化を捉えることに成功した。

さらに、本手法の欠点である高価な同位体基質を多量に使用するという点を克服するため、少量の同位体基質を解析したい時期にのみ培地に添加し、分オーダーで菌体内遊離アミノ酸同位体分布比率のダイナミクスを分析して代謝フラックス解析を実現する新手法も開発した。

これらの手法を応用して、より詳細に発酵過程を解析することにより、目的物を迅速かつ大量に生産できる方法を効率的に見つけられることが期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、アミノ酸発酵における微生物の代謝動態を解析する手法開発に関するもので、工業化プロセスで一般的に使用されている流加培養系においてあらゆる培養時期の代謝解析を可能とするものである。

菌体内遊離アミノ酸の同位体分布を高感度で検出する手法を確立し、計算アルゴリズムにたんぱく質のターナーを導入することで、非定常状態の微生物代謝変化が追跡可能な代謝フラックス解析法の開発に成功した。

本手法を用いて流加培養系のリジン発酵を解析した結果、増殖期から定常期になるときに補充経路のフラックスが逆流し、TCA 回路のバイパスであるグリオキシル酸経路フラックスが3倍以上に増大することが明らかとなった。実際にグリオキシル酸経路を触媒する酵素の活性は上昇しており、過去に連続培養で増殖速度を減少させたときに観測された解析結果とも一致していることから、本手法による解析結果は非常に信頼度が高いことが示された。

更に、解析に使用する高価な同位体基質の使用量を大幅に削減するために同位体基質をパルス添加し、そのダイナミクスから代謝フラックス解析を可能とする技術開発にも成功している。パルス添加法を用いて、リジン発酵のプロセス解析をした結果、増殖期から定常期になるときにやはりグリオキシル酸経路が大幅に増大することが観測され、更にその後マリックエンザイムが活性化すると計算された。マリックエンザイムは理論代謝フラックス解析からもリジン生産には不要と計算されており、菌体増殖停止後に特に増大していることから当該菌株から欠損することが望ましいと推定された。マリックエンザイム欠損変異株の検証実験から、大幅に発酵成績が向上することがわかり特許出願するに至った。

以上のように、本論文は、アミノ酸発酵工業化プロセスの解析精度を大幅に向上させることに貢献し、本手法により得られた知見から新たな育種方針が示され、特許出願にまで至っている。今後も本手法を応用することで新たな微生物の挙動が明らかにされ、発酵プロセス開発が加速されることが期待される。従って、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。