

Title	コリネ型細菌のグルタミン酸生産における代謝解析に関する研究
Author(s)	白井, 智量
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48430
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	しら い とも かず 白 井 智 量
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 2 1 1 2 9 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 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	コリネ型細菌のグルタミン酸生産における代謝解析に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 清水 浩 (副査) 教授 塩谷 捨明 教授 大竹 久夫 教授 福井 希一 教授 関 達治 教授 小林 昭雄 教授 卜部 格 教授 原島 俊 教授 金谷 茂則 教授 仁平 卓也 教授 四方 哲也

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、グルタミン酸生産菌であるコリネ型細菌の代謝解析に関する論文である。微生物を用いたものづくりは産業上非常に重要であり社会的貢献も大きい。その際、物質の生産性向上を目指した育種は必要不可欠で、細胞内代謝状態の定量法である代謝フラックス解析の確立は育種に向けて大きく寄与するものである。本論文は、グルタミン酸生産菌であるコリネ型細菌をモデルとし、精密な代謝解析法の確立を行い、グルタミン酸生産に関与する反応経路を定量的に明らかにしたものである。

まず、細胞外代謝産物測定にもとづいた正味のフラックス解析から、グルタミン酸生産に関する反応を明らかにした。次に、細胞内の複雑な分岐および可逆反応も考慮に入れた精密な代謝フラックス解析法を確立し、*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産に関する反応経路を定量的に明らかにした。本論文は、要約結論を含め、5つの章からなっている。

序章では、緒言として代謝工学研究の背景と意義、および既存の研究成果について述べ、本研究の目的および構成について詳述した。

1章では、2-オキソグルタル酸における代謝流束（フラックス）の変動が、どのような制御によって成されているかを明らかにすることを目的として、正味のフラックスを解析できる方法を開発した。*C. glutamicum* とその近縁種である *Corynebacterium efficiens* を用いて、細胞外物質の測定に基づいてグルタミン酸生産期における代謝フラックス解析を行い、二種のグルタミン酸生産量の差異の要因を定量的に調べた。

2章では、正味のフラックスのみならず、前向きおよび後ろ向きの反応（可逆反応）を考慮した精密な代謝フラックス解析を目指した。1章で用いた二種のコリネ型細菌の増殖期におけるフラックス解析を行った。¹³C で同位体標識させた基質を用い、細胞内アミノ酸中の ¹³C の割合パターンをガスクロマトグラフィー質量（GC-MS）分析し、その情報をもとにコンピュータ計算により精密な代謝フラックス解析を行った。また、核磁気共鳴（NMR）により GC-MS 分析データを用いて行ったフラックス解析結果の検証を行うことで、精密な代謝フラックス解析方法を確立した。

3章では、2章で確立した代謝解析手法を用いて *C. glutamicum* のグルタミン酸生産期におけるフラックス解析を

行い、グルタミン酸生産に重要な経路を探索した。補充経路については、増殖期においてはホスホエノールピルビン酸 (PEP) カルボキシラーゼに触媒される PEP からオキサロ酢酸 (Oxa) へのフラックスが働いているが、グルタミン酸生産期においては、それに加えてピルビン酸 (Pyr) カルボキシラーゼに触媒される Pyr から Oxa へのフラックスが活性化されることがわかった。

終章では、結言として本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望について述べた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、グルタミン酸生産菌であるコリネ型細菌の代謝解析に関する論文である。微生物を用いたものづくりは産業上非常に重要であり社会的貢献も大きい。その際物質の生産性向上を目指した育種は必要不可欠で、細胞内代謝状態の定量法である代謝フラックス解析の確立は育種に向けて大きく寄与するものである。本論文は、グルタミン酸生産菌であるコリネ型細菌をモデルとし、精密な代謝解析法の確立を行い、グルタミン酸生産に関与する反応経路を定量的に明らかにしたものである。

序章では、緒言として代謝工学研究の背景と意義、および既存の研究成果について述べ、本研究の目的および構成について詳述している。

1章では、2-オキソグルタル酸における代謝の流れ（流束、フラックス）の変動が、どのような制御によって成されているかを明らかにすることを目的として、正味のフラックスを解析できる方法を開発している。*C. glutamicum* とその近縁種である *Corynebacterium efficiens* を用いて、細胞外物質の測定に基づいてグルタミン酸生産期における代謝フラックス解析を行い、二種のグルタミン酸生産量の差異の要因を定量的に調べている。

2章では、正味のフラックスのみならず、前向き及び後ろ向きの反応（可逆反応）を考慮した精密な代謝フラックス解析を目指している。¹³C で同位体標識させた基質を用い、細胞内アミノ酸中の ¹³C の割合パターンをガスクロマトグラフィー質量 (GG-MS) 分析し、その情報をもとにコンピュータ計算により精密な代謝フラックス解析を行っている。また、核磁気共鳴 (NMR) により GC-MS 分析データを用いて行ったフラックス解析結果の検証を行うことで、精密な代謝フラックス解析方法を確立している。

3章では、2章で確立した代謝解析手法を用いて *C. glutamicum* のグルタミン酸生産期におけるフラックス解析を行い、グルタミン酸生産に重要な経路を探索している。補充経路については、増殖期においてはホスホエノールピルビン酸 (PEP) カルボキシラーゼに触媒される PEP からオキサロ酢酸 (Oxa) へのフラックスが働いているが、グルタミン酸生産期においては、それに加えてピルビン酸 (Pyr) カルボキシラーゼに触媒される Pyr から Oxa へのフラックスが活性化される。

終章では、結言として本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望について述べている。

以上のように、本論文は微生物を用いた物質生産性向上を目指した合理的な育種に繋がる細胞内状態の定量的な把握を可能にしたものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。