

Title	Bacillus licheniformis ATCC 9945のpoly(g-glutamic acid)生産量の向上及び分子量低下の抑制
Author(s)	光永, 均
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/59605">https://doi.org/10.18910/59605</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 光 永 均 )

論文題名

*Bacillus licheniformis* ATCC 9945のpoly( $\gamma$ -glutamic acid)生産量の向上及び分子量低下の抑制

## 論文内容の要旨

## 第一章 緒論

Poly( $\gamma$ -glutamic acid) (以下PGA)はL-もしくはD-glutamic acidを構成単位とするポリマーである。PGAは保湿性や増粘性など多くの特性を持つため、食品から薬品まで幅広い用途で利用されている。しかしながら、PGAを化学的に合成することは困難とされており、*Bacillus*属を用いて生産されている。これまでの研究で、培養条件や培地組成の違いによってPGAの生産量や分子量が変化することが明らかになっている。しかしながら、*Bacillus*属の細胞内代謝は細胞内の代謝物濃度に依存して制御されるカタボライト制御によって調節されていることが知られているが、PGA生産時における*Bacillus*属の細胞内代謝制御に関する報告はほとんどない。そのため戦略的にPGAの生産量や分子量を制御することは困難となっている。メタボローム解析は代謝物の網羅的解析手法であり、この技術を、異なる発酵性能を示すPGA生産時の*Bacillus*属に対して用いることで、代謝物情報から細胞内代謝状態を推測できると考えられる。そこで本研究は、メタボローム解析によって推測された代謝状態から、戦略的にPGAの生産量を向上させることと、培養中に起きる分子量の低下を抑制することを試みた。

第二章 PGA生産量の向上に資する*Bacillus licheniformis* ATCC 9945のメタボローム解析

過去の報告で、*B. licheniformis* ATCC 9945はglucoseとglycerolをそれぞれ含む培地で培養した場合、PGAの生産量が大きく異なっていた。そこで先行研究と同様に培養した細胞をメタボローム解析へ供し、PGAの生産量の違いに代謝状態を推測することで、PGA生産量向上を試みた。まずglycerolもしくはglucoseを含む培地で培養した場合、glycerol培地においてglucose培地の約2倍のPGAが生産された。そしてメタボローム解析の結果から、本研究で用いた培地では、citrateが2-oxoglutarateへ変換されglutamineとともにglutamate synthaseによってPGA生産に必要なglutamateを生成していることが示唆された。PGA生産量の高かったglycerol培地では培養36時間で培地中のcitrateが枯渇しており、そのときglutamine生合成に必要なammoniumの取り込みが停止していた。そこでcitrateとammoniumの断続的な添加培養実験を行ったところ、*B. licheniformis*のPGA生産量として過去最高の値を達成することができた。

## 第三章 分岐鎖アミノ酸による培養中のPGA分子量低下の抑制

*Bacillus*属によって生産されたPGAは培養時間の経過とともに分子量が低下することが知られている。低分子のPGAを高分子化する技術はこれまでに報告がないため、高分子のPGAを生産するためにはこの分子量の低下を抑制する必要がある。しかしながら、PGAの分子量の制御機構に関しては未解明な点が数多く残されている。そこで本章では、glucose以外のphosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system を介して細胞に処まれる炭素源 (PTS-sugars)であるfructoseとsorbitolも加えて培養を行い、そのメタボローム解析結果とPGAの分子量推移から戦略を構築し、PGAの分子量低下を抑制させることを試みた。培養の結果、PTS-sugars培地ではglycerol培地よりも高分子のPGAが蓄積していた。そしてメタボローム解析の結果、PTS-sugars培地で培養した細胞ではカタボライト制御タンパク質であるCodYが活性化している可能性が示された。そこで、glycerol培地へCodYの活性化因子である分岐鎖アミノ酸を添加することでPGAの分子量低下を抑制できるのではないかと仮説を立て、培養を行った。その結果、非添加の培地に比べ分岐鎖アミノ酸を添加したすべての培地で生産期においてPGAの低下が抑制され、仮説通りの結果が得られた。

## 第四章 総括

本研究はPGA生産時の*Bacillus*属をメタボローム解析に供した初めての研究である。メタボローム解析結果に基づき構築された戦略により、目的としていたPGA生産量の向上、及び分子量の低下を抑制を達成することができた。これは、メタボローム解析によって得られる代謝物情報は、*Bacillus*属の細胞内代謝状態を強く反映しているといえ、細胞内代謝に基づいた戦略構築がさらなるPGAの有用性を高めるためには必要であることを指示しているといえる。本研究によって得られた結果は、メタボローム解析がその戦略構築に非常に強力な情報となりうることを示しており、今後のPGA発酵生産に関する研究を加速させる技術であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 光 永 均 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	永井 健治
	副 査	教授	仁平 卓也
	副 査	教授	渡邊 肇
論文審査の結果の要旨			
<p>本論文は <i>B. licheniformis</i> ATCC 9945 を PGA 発酵特性の異なる培地を用いて培養を行い、メタボローム解析結果から推測された細胞内代謝状態に基づいた戦略を構築することで、PGA 生産性の向上、及び PGA 分子量低下の抑制に成功した。</p> <p>第二章では glucose と glycerol をそれぞれ含む培地で培養した場合、PGA の生産量が異なることに着目し、メタボローム解析を行った。その結果、PGA 生産時における glutamate 生合成経路が推測され、必要な基質が citrate と ammonium であると仮説が立てられた。そこで di-ammonium hydrogen citrate に培地中へ添加して培養を行ったところ、<i>B. licheniformis</i> による PGA 生産量として過去最高の値を達成することができた。</p> <p>第三章では、Phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system によって取り込まれる糖を (PTS-sugars)含む培地において、glycerol を含む培地よりも高分子の PGA 蓄積していることに注目してメタボローム解析を行った。その結果 PTS-sugars 培地では、CodY というカタボライト制御タンパク質が活性化していることが推測された。そこで、疑似的に CodY の活性化による影響を glycerol 培地で再現するために、培地へ CodY の活性化因子である分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acids: BCAAs) を添加して培養を行った。その結果 PGA の分子量低下が抑制され、BCAAs によって培養中の PGA の分子量低下を抑制できることが明らかとなった。</p> <p>以上、本研究によって、これまで細胞内代謝制御についてほとんど議論されてこなかった PGA 生産時の <i>Bacillus</i> 属に対してメタボローム解析を行うことによって、PGA の発酵制御に非常に有用な情報を与えることが示された。将来的に、このメタボローム解析結果にもとづき、PGA 生産時における <i>Bacillus</i> 属の細胞内代謝制御機構が明らかになり、PGA 高生産菌の育種や目的分子量の PGA 生産などが達成されることが期待される成果であるといえる。</p> <p>よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。</p>			