

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 12495 号
------	---------------

氏 名 清水 志保

論文題目

Research for control of related compounds for industrial
production of fermentation pharmaceuticals
(発酵医薬品の工業生産のための類縁化合物制御に関する研究)

論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	教授	堀 克敏
委員	名古屋大学	教授	中野 秀雄
委員	名古屋大学	准教授	西島 謙一

論文審査の結果の要旨

清水志保さん提出の論文「Research for control of related compounds for industrial production of fermentation pharmaceuticals (発酵医薬品の工業生産のための類縁化合物制御に関する研究)」は、放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* が生産する医薬品FK506の工業化において、構造類縁化合物FR900525を低減するため、当該類縁体生成に関与する代謝パラメータを探索、その結果から、リジンアナログ耐性付与によってFR900525低減株が育種できることを示した。なお、FR900525は、FK506のピペコリン酸部位に、プロリンが取り込まれた構造である。各章の概要は以下の通りである。

本論文では、研究背景を記述した第1章に引き続き、第2章で、アナログ耐性株育種によって、類縁化合物を低減した結果について述べた。対象とした類縁化合物FR900525は、FK506のピペコリン酸部位に、プロリンが取り込まれた構造である。目的化合物であるFK506と分離できる工業レベルの精製手段がなく、発酵でのわずかな増加が、医薬品への類縁体混入につながるため、育種によってFR900525を低減することを目指した。紫外線を変異源に、ランダムに変異を誘発した変異株の中から、目的の性質を示す変異株を選択する手法をとった。育種に先立って、まず、FR900525レベルが異なる培養液を培養液量や培養日数を変えて作成し、アミノ酸、有機酸などの代謝パラメータを分析、FR900525と相関するパラメータを探索した。その結果、培養液中のピペコリン酸濃度が、FR900525生成量と強く負の相関を示すことが明らかになった。その他、アスパラギン酸ファミリーであるリジン、アスパラギン酸、トレオニン、イソロイシン、およびグルタミン酸ファミリーであるグルタミン酸、アルギニンはFR900525と負の相関を示した。強い負の相関を示したピペコリン酸は、リジン経路で合成される。*Corynebacterium glutamicum* を代表に多くのリジン生産菌ではリジンアナログであるアミノエチルシステイン耐性付与によって、リジン生産量を高めた成功事例を参考に、*S. tsukubaensis* にも同じ育種手法を適用した。結果、取得したアミノエチルシステイン耐性株4株中3株で、顕著にピペコリン酸濃度が増加するとともにFR900525が低減しており、アミノエチルシステイン耐性が本放線菌のFR900525低減に有効であることを示した。また、より多くのピペコリン酸濃度と、FR900525レベルの測定データから、ピペコリン酸濃度が0.3mMより低下すると、急激にFR900525が増加すること、即ち、工業生産でFR900525濃度を低く維持するためには、ピペコリン酸をモニタリングし、常に0.3mM以上を維持させることも有効であることがわかった。

第3章では、アミノエチル耐性株の変異点を特定した。第2章で取得した耐性株のうち、工業用生産株として用いた1株と、親株の遺伝子を次世代シーケンサーで網羅的に分析した。変異株と親株と遺伝子の比較から、クエン酸シンターゼ、DNAヘリカーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼに変異が確認され、また、それぞれ1つのアミノ酸に変異が誘発されていることを明らかにした。リジン生合成上のキーエンザイムであり、リジンで強く抑制されることが知られているアスパルトキナーゼだけでなく、リジン生合成のどの酵素にも変異が、認められなかったことは想定外であった。TCAサイクルの酵素であるクエン酸シンターゼについても、リジン生産量に関与する報告事例がある。そこで、同酵素の阻害剤であるクエン酸を添加したときの、影響を調査したところ、酵素阻害条件下では、ピペコリン酸が増加し、FR900525が減少することが確認でき、クエン酸シンターゼ上に誘発された変異がピペコリン酸生合成に関与していることを示した。つまり、クエン酸シンターゼ上の変異によって、TCAサイクルとリジン生合成経路へのカーボンフローがリジン生合成へ傾き、ピペコリン酸生合成を増加させたと考察した。クエン酸シンターゼ以外の2つの変異の関与は、本研究では明確にできていない。

第4章では、FK506の類縁体FR900525レベルはピペコリン酸濃度と強く負の相関を示し、ピペコリン酸濃度が0.3mM以下になると急激に高くなること、工業生産で安定的にピペコリン酸レベルを高く維持するには、リジンアナログ耐性株の取得が効果的であること、また、クエン酸シンターゼ上の変異が関与していることを本研究の成果として総括している。

ピペコリン酸は、FK506以外にも、様々な抗生物質の前駆体となる環状アミノ酸であり、本研究を通じて得られた知見は、FK506の工業生産だけでなく、ピペコリン酸を構造にもつ化合物の生産性向上や品質向上にも応用が期待でき、工学の発展に寄与するところが大きいと判断できる。よって、本論文の提出者である清水志保さんは博士(工学)の学位を受けるに十分な資格があると判断した。