

## 世代時間よりみたアミノ酸生産菌株の安定化

(田辺製薬・生化研) 木住雅彦、杉浦正毅、中西憲之、干畑一郎

## 1. 目的

アミノ酸生産菌株の育成には、目的とするアミノ酸の生合成に参与している代謝調節機構を解除させることが必要である。このために、アナログ耐性、酵素の基質特異性を利用して解除株を選択する方法を開発した。さらに、それらの性質の組合せに形質導入法を活用した。しかし、一般に代謝調節のよく解除された変異株ほど代謝の流れのアンバランスが強く起こり、生育に必要な特定の物質の不足によって、生育の遅くなる場合が多い。そのため、逆変異などによって出現する生育の速い非生産菌株が優先的に増殖し、生産菌株は淘汰されやすい。このような生産菌株を発酵生産に用いる際には、生産菌株のもつ有用な形質を安定に維持して増殖させることが重要な問題である。今回は *Serratia marcescens* のヒスタジン生産菌株をとりあげ、世代時間の比較から生育律速因子を検索し、その結果にもとづいて、ヒスタジン生産菌株の安定化を行なった例について述べる。

## 2. 方法

*Serratia marcescens* Sr41 から育成したヒスタジン生産菌株を用いた。それら菌株の育成の過程とその性質、およびヒスタジン蓄積量を示した (Fig. 1)。

生育実験には Davis -

Mingioli の最少培地<sup>1)</sup>

(但しグルコースを 0.5% にし、クエン酸ソーダは除く。) を基本培地として用い、日立自動記録培養装置にて 1 時間毎に 660 nm の O.D. を測定し、対数増殖期における世代時間を求めた。

栄養培地としては グル

コース 0.5%, 酵母エキス 1%, ペプトン 1%, 肉エキス 0.3%, 食塩 0.5% からなる培地を用いた。発酵培地としてはグルコース 3%, シューフロース 12%, 尿素 2%,  $K_2HPO_4$  0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%, コーンステイアリカー 0.7%,  $CaCO_3$  3% からなる培地を用いた。ヒスタジン生合成酵素活性は、既報<sup>2)</sup>に準じて測定した。

## 3. 結果

ヒスタジン生産菌株 H-2892 は、ヒスタジン生合成酵素の repression, および先頭酵素の feedback inhibition が解除し、著量のヒスタジン (20 mg/ml) を蓄積する。しかしながら、継代培養に伴ってその生成量は著しく低下した。この発酵液を最少培地平板上にまくと、

Fig. 1 Strains of *Serratia marcescens* Sr41

Strain	Phenotype	Properties of His enzymes		L-His produced (mg/ml)
		Rep.	Inh.	
8000	Wild	(+)	(+)	0
Hd-16	Hd <sup>-</sup>	(+)	(+)	0
MHr131	Hd <sup>-</sup> , MH-r	(+)	(-)	1.0
Tr142	Hd <sup>-</sup> , TRA-r	(-)	(+)	1.5
H-2892	Hd <sup>-</sup> , MH-r, TRA-r	(-)	(-)	20.0
H-2892-R	Hd <sup>-</sup> , MH-r, TRA-s	(±)	(-)	2.5

Hd<sup>-</sup>, Histidase-deficient; MH-r, 2-Methylhistidine-resistant; TRA-r, 1,2,4-Triazolealanine-resistant; TRA-s, TRA-sensitive; Rep., Repression by His; Inh., Feedback inhibition by His.

生産菌株である小コロニーに混在して、多数の大コロニーの出現がみられた。この大コロニーの性質を調べたところ、ヒスチジン生合成酵素の *derepression* が復帰し、TRA に対する耐性が弱くなっていた。この代表株 H-2892-R の最少増地での世代時間は 1.5 時間であり、生産菌株 (2.6 時間) に比べると、生育が著しく速くなっていた。またそのヒスチジン生成量は  $2.5 \text{ mg/ml}$  と低かった。このことから、ヒスチジン生産能の低下は、この復帰変異株の含有率が高くなったことに起因するものと考えられた。栄養増地での生育速度は、培養初期には生産菌株と復帰変異株の間に差のないことから、ヒスチジン生産菌株では、その代謝調節が解除したため、生育に必要な物質の何かが不足しているものと思われた。そこで最少増地を用いて、両菌株の世代時間を同じにする因子の検索を行なった (Table 1)。その結果、5 種のアミノ酸 (アスパラギン酸、リジン、メチオニン、プロリン、セリン)、あるいはアデニンの添加によって

両菌株の世代時間をほぼ同じにすることができた。

アデニンの生育促進効果は生産菌株に特異的であり、アデニンの代謝拮抗物質である 6-メチルプリンに対する感受性も、生産菌株では他の菌株に比べ高くなっていた。これらの現象は、多

量の ATP を必要とするヒスチジン生産菌株では、アデニン不足が起っていることを示唆している。そこでヒスチジン生産菌株から 6-メチルプリン耐性株を取得することによって、アデニン不足を解消させ、生産菌株を安定化させることができた。本耐性株ではヒスチジン蓄積量も約  $23 \text{ mg/ml}$  に増大した。

Table 1. Effects of amino acids, adenine and 6-methylpurine on the growth of His accumulator and the related mutants

Addition to the minimal medium	Generation time (hr)				
	H-2892	H-2892-R	Tr142	MHr131	8000
None	2.6	1.5	1.3	1.2	1.0
Five amino acids* ( $10^{-3}\text{M}$ , each)	1.3	1.1	1.0	1.0	0.9
Ade $10^{-3}\text{M}$	1.6	1.4	1.3	1.2	1.0
Five amino acids + Ade $10^{-3}\text{M}$	1.2	1.1	1.0	1.0	0.9
MP** $3 \times 10^{-5}\text{M}$	>10	-	3.2	3.0	2.5
MP $10^{-4}\text{M}$	>10	>10	>10	>10	>10
" + Ade $10^{-4}\text{M}$	2.6	1.4	1.3	1.2	1.0
" + Ade $10^{-3}\text{M}$	1.9	-	-	-	-

\* Asp, Lys, Met, Pro and Ser.

\*\* 6-Methylpurine

#### (文献)

- 1) B. D. Davis and E. S. Mingioli: J. Bacteriol., **60**, 17 (1950).
- 2) M. Kisumi et al.: Appl. Environ. Microbiol., **34**, 465 (1977).