

154 アセトアミド桂皮酸から L-フェニルアラニンの製造
 ——*Acetamidocinnamate amidohydrolase* 高活性株の育種——
 (田辺製薬・生化研) 中道勝彦, ○那部浩一, 土佐哲也

1) 目的 アセトアミド桂皮酸から *acetamidocinnamate amidohydrolase* (*acylase* と略) と *aminotransferase* の2種類の酵素により L-フェニルアラニンが生成される。¹⁾ 本酵素反応の実用化を目差して *acylase* 活性の強い微生物の取得を試みた。

2) 方法 集積培養で得られたアセトアミド桂皮酸資化微生物にアセトアミド桂皮酸と L-アスパラギン酸, *aminotransferase* を加えて L-フェニルアラニン生成蓄積能を調べた。高活性変異株の取得は NTG 処理後, アセトアミド桂皮酸を唯一の窒素源とする培地を用いて連続培養し, 生育の早い株を濃縮することにより行った。*Acylase* 活性の測定はアセトアミド桂皮酸を基質とし, 30℃, 20分反応後, 生成蓄積したフェニルピルビン酸を 2,4-DNP 法で定量することにより行った。

3) 結果 アセトアミド桂皮酸からフェニルピルビン酸を生成する微生物を土壌から分離し, *Corynebacterium* sp. S-5 と同定命名した。S-5 株の *acylase* は誘導酵素であり, カタボライト抑制を受けた。カタボライト抑制を解除すれば, より実用的であるので, 生存率約 20% の NTG 処理後 0.32% のアセトアミド桂皮酸と無機塩から成る培地に 1% グルコースを添加し, 親株が流出する希釈率 $D = 0.1 h^{-1}$ で連続培養した。釣菌した 208 株の内, 187 株に菌体 1 mg 当り 0.5 U 以上の活性 (S-5 株は 0.058 U) が見られ, 最大活性 0.67 U を示した C-23 株を選んだ。実用的な培地でも培養液 1 ml 当りの活性は S-5 株の 1.1 U に比べて C-23 株は 5.0 U と高かった。

¹⁾ Nakamichi et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 100-105 (1984)

Production of L-Phenylalanine from Acetamidocinnamic Acid
 —— Derivation of Acetamidocinnamate amidohydrolase-Hyperproducing Mutant ——
 Katsuhiko Nakamichi, *Koichi Nabe, and Tetsuya Tosa
 (Research Laboratory of Applied Biochemistry, Tanabe Seiyaku Co. Ltd.,
 Kashima, Yodogawa-ku, Osaka, 532)

155 チロシン生産菌の分子育種
 (協和醗酵・東床研, *現防府工場技術研, **現富士工場医薬研)
 ○尾崎明夫・**岡徹夫・勝亦順一

1) 目的: 我々は, これまでにグルタミン酸生産菌での分子育種系について検討し, 系を確立した。その中で, グラム陰性の *E. coli* 由来遺伝子が, グラム陽性の, コリネ型グルタミン酸生産菌中で発現する事を見出した。今回は, この知見を利用し, *E. coli* のチロシン生合成に関与する *aroH* オペロンを利用した, *Corynebacterium glutamicum* のチロシン生産菌育種について報告する。

2) 実験及び結果: *E. coli* JA194 株の染色体 DNA より, 約 4.2 kb の *aroH* オペロン及び *pheA* 遺伝子を含む *EcoRI*-*HindIII* 断片を pBR322 にクローニングした。更に, *aroH* オペロンのみと有する約 3.8 kb の *HincII* 断片を *E. coli*-*C. glutamicum* のシャトルベクター pCE51 にサブクローニングした。得られたプラスミッド pKm1*aroH* より, チロシン耐性及び 3-アミノチロシン耐性を指標として, チロシンによる制御の解除された脱制御型の *aroH* オペロンを有する pKm1*aroH*-15 を分離した。pKm1*aroH* 及び pKm1*aroH*-15 をプロトプラスト形質転換により, *C. glutamicum* 中に導入したところ, *E. coli* *aroH* オペロンは, *C. glutamicum* 中で良好に発現し, 約 6~30 倍の遺伝子増殖効果が観察された。

pKm1*aroH*, pKm1*aroH*-15 と, チロシン生産菌 *C. glutamicum* K-43 株に導入した結果, pKm1*aroH* では, チロシン生産性に差は認められなかったが, 脱制御型の pKm1*aroH*-15 導入株では, 約 9 mg/ml のチロシンが生成し, チロシン生産性が約 90% 向上した。この結果, *E. coli* *aroH* オペロンが, *C. glutamicum* のチロシン生産性の向上に顕著に有効である事が判明した。

Molecular Breeding of Tyrosine Producing *Corynebacterium glutamicum*

*Akio Ozaki; *Tetsuo Oka and Ryoichi Katsumata (Tokyo Research Labs. Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. Tokyo, Hachida, Present Address; *Technical Research Labs. Hofu, Yamaguchi, **Medical Research Labs. Shizuoka)