

127

Dihydrodipicolinate synthase欠損 *Brevibacterium* 変異株による
スレオニンの生産
(味の素(株)・中研) ○杉本慎一、横田 篤、川村和枝、椎尾 勇

【目的】*Brevibacterium flavum* におけるスレオニン(Thr)の生合成は、リジン(Lys)生合成との分岐点直後の酵素であるHomoserine dehydrogenase(HD)のThrによるフィードバック阻害によって調節されている。一方、Lysは共通経路最初のAspartokinase(AK)のLysとThrによる相乗阻害によって調節される。これまでにコリネフォルム細菌で育種されたThr生産株は全てフィードバック阻害に耐性なHD(HD^R)を持つ菌株であり、これらはThrアナログでHDを特異的に阻害する α -Amino- β -hydroxyvaleric acid(AHV)に耐性な株として分離されてきた。しかしThr生合成の調節及び種々のアミノ酸の過剰生成の機構から予想されるように、Lys固有生合成経路最初のDihydrodipicolinate synthase(DPS)の欠損変異株もThrの過剰生成を引き起こす可能性がある。それは、Lys制限下ではAKのフィードバック阻害は働かず、共通中間体であるAspartate- β -semialdehyde(ASA)の濃度上昇が起きて、HDのThr阻害が拮抗的に弱められると考えられるからである。しかしDPS欠失株は*E. coli*等では報告はあるが、コリネフォルム細菌では未だ分離されていない。今回我々は*B. flavum* AHV耐性株よりDPSを欠損したThr生産株を分離することに成功し、更にDPS欠損と従来から知られていたHD^Rの両性質を併せ持つ株を誘導し、生産性を向上させたので、報告する。

【実験方法及び結果】フィードバック阻害に感受性なAK(AK^S)を持つ株からの誘導：アスパラギン酸生産株でAK^SタイプのNo. 70株よりAHV耐性株を誘導し、Thr蓄積が最高の株としてDK131株を分離した¹⁾。この株はHD^Rタイプではなく、DPSを欠失していた。これはDPS欠失によるASAの濃度上昇でAHVによるHDの阻害が弱められ、耐性となったと考えられる。本株の生育はDiaminopimelic acid(DAP)の存在で著しく促進された。しかし非存在下でも遅いが生育し、DAPに対して絶対要求性を示さなかった。この機構は不明であるが、これがコリネフォルム細菌よりDAP要求性でDPS欠失株を分離できなかった理由と考えられる。DAPは本株のThr生産も促進し、5 g/l DAP, 10 %グルコースを含む培地で13.7 g/lのThrを生産した。この生産はHD^Rタイプの生産株と異なり、培地への2 g/l Lys・HCl添加で92 %阻害された。次に、DK131株の性質を応用して、より効率的にDPS欠損株を誘導分離する方法を開発した²⁾。同じ親株No. 70よりDAPを選択培地に添加してAHV耐性株を分離し、Thrを2 g/l以上蓄積する株18株得た。その内13株はDPS欠損タイプであり、HD^Rタイプは2株のみであった。更にこれらのタイプは、Lys添加培養によるThr生産の阻害が47 %以上は全てDPS欠損タイプであり、3 %以下がHD^Rタイプであることで容易に区別された。残りの3株はHD^RとDPS欠損の両性質を持つタイプだった。このように、いずれの株も両タイプに帰属された。Thr生産はDPS欠損タイプではDK330株の12.4 g/l, HD^RタイプではBK29株の9.9 g/lが最高であった。フィードバック耐性なAK(AK^R)を持つ株からの誘導¹⁾：AK^R Lys生産株AC664から誘導分離されたAHV耐性Thr生産株の多くはLysをThrより多く蓄積したが、Thrを5 g/l以上蓄積するがLys蓄積はそれ以下に減少した株を5株得た。その内3株のDPSは完全欠失または低下していた。代表株DA105はDAP非存在下でも良く生育し、DAPによって親株以上には促進されなかった。本株は至適条件でThr 10.3 g/lと共にLys 3.5 g/l蓄積し、Thr生産はLys, DAPの添加で影響されなかった。HD^R株からの誘導：Thr生産性を更に向上させるため、DPS欠損とHD^Rの両性質を有するThr生産株の育種を試みた。HD^RタイプのBK29株とDPS欠損タイプのDK330株では前者がよりAHVに感受性であったので、これより耐性株を誘導し、Thr生産が12 g/l以上の株6株得た。その上位5株はいずれもDPSが欠失または低下していた。またAK, HD, Homoserine kinase(HK)には変化はみられなかった。Thr生産の最高はDB185株による16.7 g/lであり、DPS欠損タイプまたはHD^R単独の株より大幅に向上していた。またThr生産はLys添加で親株同様殆ど阻害されなかった。

¹⁾ I. Shio et al. ABC 53, 41(1989). ²⁾ I. Shio et al. ABC 53, 2169(1989).