

氏名(本籍)	武部英日(石川県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1,006号
学位授与年月日	平成6年7月31日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	放線菌による新規含リン除草剤ピアラホスの生産に関する研究
主査	筑波大学教授 工学博士 田中秀夫
副査	筑波大学教授 工学博士 片岡 廣
副査	筑波大学教授 農学博士 中原忠篤
副査	筑波大学教授 農学博士 前川孝昭

論 文 の 要 旨

Streptomyces hygroscopicus の生産するピアラホスは、非選択性茎葉処理型除草剤で広い殺草スペクトルを有する点と、土壤中で容易に分解するため安全性が高い点で、理想的な除草剤の1つである。本論文は、除草剤ピアラホスを安価で多量に供給するための工業生産を確立することを目的として、ピアラホスを工業的に生産するための優良菌株の育種、ピアラホス生合成の促進メカニズムの解析および小型発酵槽から大型発酵槽へのスケール・アップなどの培養工学的検討を行った研究成果をまとめたものである。

工業生産に適合した優良菌株の育種：まず、工業生産に適合した高生産株の取得に当って、野性株の親株が抱えている問題点を整理し、効果的で且つ大量に処理可能な育種選別法の検討を行った。その結果、寒天培養系ではコロニー形成の小さい株、Carbon Catabolite Regulation を受けない株、および生産物分解活性の抑制された株を、液内培養系では低酸素供給条件で高い生産性を示す株を、それぞれ選別するシステムを開発した。次にこの選択システムによって変異株の選別を行った結果、得られた変異株は、野性株との比較において、約六百倍高い生産性を示し、副生成物をつくらず、安価な炭素源の使用が可能となったこと、さらに酸素供給量が少なく済み、また濾過性が良いなどの優れた性質を有していることを確認した。

ピアラホス生合成の促進メカニズムの解析：得られた優良変異株（高生産株）の性質を低生産株との比較で調べた。その結果、高生産株は低生産株に比べ、糖の消費が緩慢で菌体量が少なく、またTCAサイクルの酵素活性が低く、逆にグリオキシル酸サイクルの酵素活性が高いことが明らかとなり、このことからピアラホス生合成の基質となるアセチル CoA やピルビン酸が効率良く二次代謝に向け

られることが、ピアラホス生産の主要な促進メカニズムであると推定した。さらに、耐圧で送気可能な振盪式培養装置を作製し、代謝に及ぼす酸素供給の影響を検討した結果、高生産株では酸素分圧を下げることによって TCA サイクルの運行が抑制され、ピアラホス生成が促進することを明らかにした。

スケール・アップに関する検討：小型発酵槽で得られたピアラホスの生産量を300klの工業規模大型発酵槽（日本の最大規模）で再現させるためのスケール・アップを従来より行われている指標（単位液量当たりの攪拌消費動力）に基づいて行ったところ、著しく低い生産量（約50%）しか得られなかった。このような小型発酵槽と大型発酵槽での発酵経過の不一致の原因の1つとして、小型槽内では見られず、大型槽内のみで見られる槽内の液深に付随する不均一性にあると推定した。次に、大型槽の水圧勾配に関連する環境を小型槽で再現するための圧力可変培養装置を作製し、液深10mの大型槽内を微生物が循環する環境を設定（本装置を周期的に1,013-1,996Hpaで変動）させたところ、ピアラホスの生産量は大型槽と同じく著しく低い結果となった。このことから、液深に付随する環境因子がピアラホスの生産を阻害していることが明らかとなり、環境因子とピアラホス生産性の関係を検討したところ、特に液深によって高められた槽底部付近の溶存酸素濃度が原因であることが明らかとなった。そこで、大型槽での水圧勾配により形成される溶存酸素濃度の不均一な分布の幅を考慮に入れた新しいスケール・アップの概念を導入し、適用したところ、小型槽で得られる最大生産量の96%を300kl大型槽で再現することが可能となった。

以上、育種、生合成、培養工学的検討など総合的見地から検討を行った結果、大量培養によるピアラホスの工業生産を確立することに成功した。

審 査 の 要 旨

本研究で開発した寒天培養系および液内培養系の選別システムは、変異処理後、完全培地に出現したコロニーの中から変異株の無差別的選別を行う従来の方法と違い、工業生産に強く影響を及ぼす要因を予め考慮して選別を行う方法であり、短時間に効率的に高生産能株を分離できる点に特徴がある。これらの選別システムは、ピアラホス以外の微生物代謝産物高生産能株の育種改良にも広く応用が可能である点でも評価されよう。また、ピアラホス発酵では酸素分圧が一次代謝、二次代謝のいずれにも影響を及ぼすこと、すなわち、酸素分圧が低下すると TCA サイクルの運行が抑制され、逆にグリオキシル酸サイクルの酵素活性が高まり、ピアラホス生合成の基質となるアセチル CoA やピルビン酸が効率よく二次代謝（ピアラホス生産）に向けられることを明らかにした。これは、ピアラホスの工業的培養法を設定する上で充分価値のある知見である。さらに、溶存酸素濃度が細胞に種々影響を与えるような発酵については、従来の槽内環境が均一であるとするスケール・アップ法は適用できないことを明らかにし、大型槽の水圧により高められる酸素分圧およびその酸素分圧の不均一勾配を考慮したスケール・アップ法を提案した。このスケール・アップの概念は、これまでスケール・アップが困難で問題を残していた微生物代謝産物の工業生産への再考察のチャンスと、溶存酸素制御培養法の

精度アップや再構築に貢献できるものである。なお、著者らが使用した耐圧で送気可能な振盪式培養装置および圧力可変培養装置は、大型発酵槽の環境を再現し得る機能を有するものであり、大型槽で微生物が受けるであろう種々の環境因子の影響について事前に知ることができ、大型槽の運転条件を決める有効な手段となるものと期待される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。