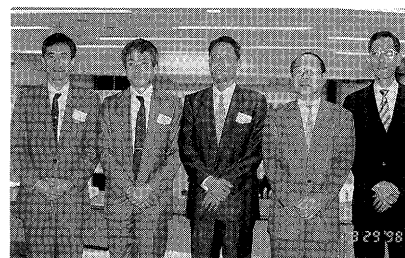


[生物工学会誌 第77巻 第3号 104-112. 1999]

総 合 論 文

異菌体間共役反応法による 5'-グアニル酸 生産プロセスの開発

(平成10年度 日本生物工学会技術賞受賞)

藤尾 達郎^{1*}・丸山 明彦²・青山 良秀³河原 伸⁴・西 達也⁵

Production of 5'-GMP from Glucose by Coupling Reaction between *Corynebacterium ammoniagenes* and Self-Cloned *Escherichia coli* —Monograph—

TATSURO FUJIO,¹ AKIHIKO MARUYAMA,² YOSHIHIDE AOYAMA,³ SHIN KAWAHARA,⁴ and TATSUNARI NISHI⁵ (Research and Development Division¹ and Biochemical Division,² 1-6-1 Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185; Ube Plant, 2548 Fujimagari, Ube, Yamaguchi 755-8501³; Moji Plant, 2-1 Osato-motomachi, Kitakyushu, Fukuoka 800-8585⁴; Tokyo Research Laboratories, 3-6-6 Asahimachi, Machida, Tokyo 194-8533,⁵ Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) Seibutsu-kogaku 77: 104-112, 1999.

An enzymatic process for the production of 5'-guanylic acid (GMP), a flavoring nucleotide, was developed. Since it is difficult to produce GMP by direct fermentation, we examined a method of fermentatively producing 5'-xanthilic acid (XMP), a precursor of GMP, first, and then enzymatically aminating XMP to produce GMP. The amination reaction is catalyzed by GMP synthetase (or XMP aminase) and requires ATP. As ATP is very expensive, we developed a means of producing GMP from XMP without the need to add ATP by regenerating and repeatedly using a catalytic amount of ATP. In the reaction to regenerate ATP, a "resting cell"—that is a bacterial cell in which the permeation barrier against nucleotides is removed by treating the cell with a surfactant—was used as an enzyme source. First, we developed a self-coupling reaction in which the ATP-regenerating and GMP synthetase activities possessed by resting cells of *Corynebacterium ammoniagenes* were utilized. This enabled the XMP fermentation liquor and the culture liquor of the converting strain to be utilized as sources of XMP and GMP synthetase, respectively. Next, we developed a process to make use of the ATP-regenerating activity possessed by the cells after XMP fermentation. In this process, we employed *E. coli* whose GMP synthetase activity was enhanced 370-fold compared with that of the host by self-cloning as a source of GMP synthetase. Establishment of this coupling reaction between different cells, in which ATP (and AMP) is exchanged between resting cells of an XMP-producing strain and a small amount of *Escherichia coli* resting cells, made it possible to increase the ratio of the XMP fermentation liquor and to greatly improve the GMP productivity. Also, since GMP could be produced from glucose using a single fermentor, a process seemingly very close to direct fermentation was established. Application of the process to the production of 5'-inosinic acid (IMP) and CDP-choline is also briefly discussed.

[Key words: 5'-guanylic acid (GMP), ATP, regeneration, 5'-inosinic acid (IMP), 5'-xanthilic acid (XMP), CDP-choline, coupling reaction, resting cell, *guaA*, recombinant DNA, self-cloning]

は じ め に

プリン・ヌクレオチドの1種である5'-グアニル酸(以

下GMP)のナトリウム塩は、シイタケなどのキノコ類に多く含まれている呈味性成分¹⁾である。GMPのナトリウム塩は、昆布だしの旨味の主成分として知られてい

協和発酵工業㈱, ¹研究開発本部, ²バイオケミカル事業本部 (〒100-8185 東京都千代田区大手町1-6-1), ³宇部工場 (〒755-8501 山口県宇部市大字藤曲2548), ⁴門司工場 (〒800-8585 福岡県北九州市門司区大里元町2-1), ⁵東京研究所 (〒194-8533 東京都町田市旭町3-6-6).

*著者紹介(代表) 1967年大阪大学大学院工学研究科修士課程修了 協和発酵工業㈱研究開発本部 部長 工学博士

TEL. 03-3282-0035 FAX. 03-3282-0198 E-mail: tatsuro.fujio@kyowa.co.jp

写真左より 西 達也, 丸山明彦, 藤尾達郎, 河原 伸, 青山良秀

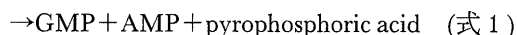
るグルタミン酸ソーダ (MSG) との組み合わせにより相乗的な強い呈味性を示す。この相乗効果は、同じく呈味性ヌクレオチドであり、鰹節の旨味の成分として知られている 5'-イノシン酸 (以下 IMP) のナトリウム塩においても認められるが、その相乗効果の程度は GMP が IMP の 2.3 倍強力であることが知られている。²⁾ このように、GMP と IMP とが MSG との組み合わせで強い呈味性を示すことから調味料として世界的に大きな需要があり、両ヌクレオチドを合わせて年間数千トン生産されている。

I. 各種の GMP 生産プロセス

GMP に調味料としての用途が見いだされて以来、大別して 3 種類の異なる工業的生産プロセスが開発された。酵母の RNA を酵素的に分解して GMP を生産するプロセス (RNA 分解法)³⁾ が最初に実用化され、次いで、発酵法では生産が困難な GMP の代わりにその脱リン酸化物であるグアノシンを発酵生産し、化学的にリン酸化するプロセス (化学的リン酸化法)⁴⁾ が実用化された。さらに、発酵法で例外的に著量蓄積可能な 5'-キサンチル酸 (以下 XMP) を発酵生産し、これを酵素的にアミノ化するプロセス (酵素的アミノ化法)⁵⁾ が実用化された。これらの方法にはそれぞれ得失があるが、現時点では化学的リン酸化法と酵素的アミノ化法とが主流となっている。本報では後者についてまとめた。

II. 酵素的アミノ化プロセスの概要

GMP はプリン生合成経路上 XMP の次に位置する化合物であり、GMP 合成酵素 (別名 XMPaminase) による XMP のアミノ化により生成する (式 1)。「酵素的アミノ化による GMP 生産プロセス」は、この酵素反応を利用する方法であり、XMP 発酵と転換反応 (アミノ化反応) からなる。まずプロセスの概要を述べる。



II-1. XMP 発酵

核酸生産に広く用いられている *Corynebacterium ammoniagenes* (旧 *Brevibacterium ammoniagenes*) を親株とし、以下のような育種により XMP 生産性の変異株を得た。⁶⁾ まず、XMP の代謝経路を遮断するため GMP 合成酵素を欠損させた菌株を育種した (Fig. 1)。そのような変異株の育種には、培地中に guanine を添加することにより salvage 合成系経由で GMP を補給できることを利用した (グアニン要求性株の育種)。また、

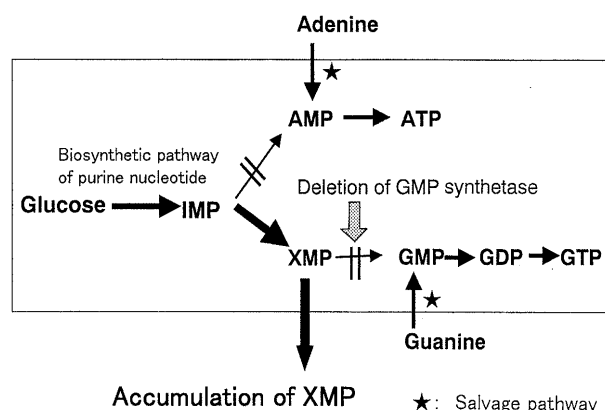


Fig. 1. XMP accumulation by a mutant of *C. ammoniagenes* (ade^L , gua^- , Mn^I , Nt^W).

より上流に位置する IMP からアデニン系ヌクレオチドへと分岐する代謝経路をも同時に遮断した。AMP, ATP などのアデニン系物質の補給も、培地中に adenine を添加することにより salvage 合成系経由で可能であることを利用した (アデニン要求性株の育種)。なお、このようにして育種した代謝経路遮断変異株を、guanine および adenine 制限条件下で培養することにより、プリン生合成系のフィードバック制御を解除することができ、XMP 生合成活性が大幅に強化された菌株が得られる。

さらに、微生物は一般に脱リン酸活性などのヌクレオチド分解活性を保持しているため、発酵法でヌクレオチドを蓄積させることは難しい。この問題を解決するため、*C. ammoniagenes* の分解活性欠失株の育種を試み、実質上問題にならないレベルまで微弱となった変異株を取得した (ヌクレオチダーゼ活性微弱性株の育種)。以上のような諸性質を備えた変異株の中から、XMP 高生産性の菌株が得られた。

なお、GMP の直接発酵生産についても検討されている。しかし、GMP を蓄積させるためには、(1) GMP から GDP を生成する GDP 合成酵素を欠失させた代謝経路遮断変異株 (栄養要求性変異株) が必要であるが、GDP 合成酵素に代わる GDP の補給経路がないため代謝経路が遮断できない、(2) GMP は RNA の構成成分であるなどプリンヌクレオチド生合成上重要な成分であるため、その生合成については厳しい制御メカニズムが存在し、解除が難しい、(3) 分子内にリン酸基を有する親水性物質であるため細胞膜透過障壁が存在する、などの解決困難な問題点があるため、これまで直接発酵法によって著量の GMP を蓄積させたという報告はない。

II-2. 転換反応 XMP から GMP への転換は GMP 合成酵素による一段階の反応であるが、式 1 に示すように本反応では基質として XMP と共に等モルの ATP が

必要である。

ATPは高価な物質であるため、ATPを原料として添加する単純な酵素反応プロセスでは、GMPのコストが大変高くなり実生産技術としては成立しない。この問題はATPを必要とする生合成酵素を物質生産に用いる場合に共通の隘路であり、次項に記すようにこれまでもさまざまな方策が検討されてきた。

Ⅲ. 静止菌体を用いる ATP 供給

ATPを必要とする酵素反応において、基質としてATPを用いる代わりに、微生物のATP生合成活性を利用してADP(もしくはAMP)からATPを再生し、少量のATPを繰り返し利用することを可能とするさまざまな方法が検討されてきた。酵母の解糖系を利用してATPを再生する方法⁷⁻⁹⁾や、*Escherichia coli*の酢酸キナーゼ活性を利用する方法^{10,11)}などである。本報告では、ATP生合成活性が強力な細菌である*C. ammoniagenes*のグルコース代謝活性を利用したATP生合成系との共役反応系による方法につき述べる。

グルコースを代謝してATPを生合成(再生)するためには多数の酵素が必要であるため、単離した酵素を組み合わせて用いる方法は実用的ではなく、必然的にすべての酵素を保持している菌体そのものを酵素源として用いることになる。⁷⁾しかし、基質であるXMPや生産物であるGMPなどのヌクレオチドは親水性であり、疎水性の細胞膜を透過しない。そのため、菌体そのものを酵素源とするためには透過性付与処理が必要となる。界面活性剤、抗生物質、有機溶剤など各種の薬剤による処理につき検討した結果、界面活性剤であるポリオキシエチレン・ステアリルアミン(以下POESA)が有効であることを見いだした。¹²⁾POESA処理後の菌体は、膜透過障壁を失っていることからもはや増殖はできず、いわゆ

る「静止菌体」の状態にある。静止菌体は、低分子物質は透過するが、分子量の大きな酵素は内部に保持したままであり、あたかも多孔性の袋とみなすことができる。

Ⅳ. 自己共役反応法：単一の静止菌体を用いる 転換プロセス

*C. ammoniagenes*の菌体は、ATP生合成(再生)活性と共にGMP合成酵素活性を保持しており、POESA処理を行って得た静止菌体においてもその活性が損なわれることはなかった。したがって、*C. ammoniagenes*を培養し、その菌体とPOESAとを接触させて得た静止菌体は、XMPからGMPへの転換活性とATP再生活性の両方を保持しており、単一の静止菌体でGMP生産が可能である。この場合、静止菌体内においてXMPからGMPへの転換反応と、ATPを再生するグルコース代謝系反応とが共役することによって、少量のATPが繰り返し使用されるため、静止菌体に随伴して持ち込まれるATPが存在するのみで著量のGMPが蓄積することになる。このような単一菌体による共役反応系を以下「自己共役反応系」と称する(Fig. 2)。

自己共役反応系ではATP再生系活性がGMP合成酵素活性を上回っている。したがって、GMP生産の生産効率を高めるためにはGMP合成酵素活性の強化が有効である。そこで、GMP合成酵素の阻害剤であるdecoyinineに対する耐性株を多数分離し、その中から転換活性が約2倍に強化された変異株を得た。^{12,13)}

Ⅴ. 転換反応の動的解析

V-1. 培養液混合プロセスの利点 自己共役反応によるGMP生産プロセスは、XMP発酵、転換菌培養、および転換反応からなる。より具体的には、まずXMP発酵を行い、発酵液からXMPを精製する。一方、転換菌を培養し、その培養液から遠心分離などにより菌体を得る。次いで、XMPと菌体をグルコースその他の反応成分を含んだ液に溶解あるいは懸濁し、最後にPOESAを添加し、pH、温度、通気量、攪拌数を制御しながら反応を行う。

しかし実用的観点から見ると、発酵液からXMPを精製する工程を省略できれば工程数が減少し、省力、省設備、省エネルギーなど多くのメリットが生じるため大いに意味がある。同様に、転換菌体についても、菌体分離工程を省略し菌体培養液を直接用いるプロセスが成立すればそのメリットは大きい。そこで、XMP源として加熱殺菌処理したXMP発酵液を、また酵素源として転換

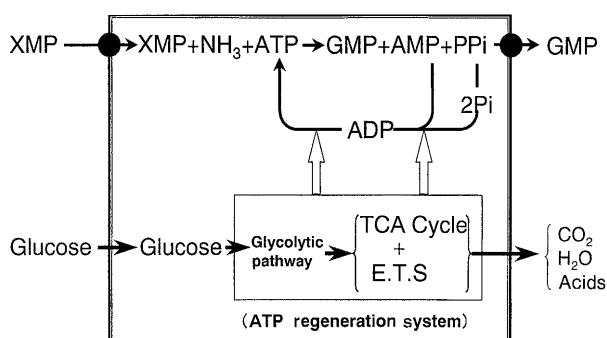


Fig. 2. Outline of GMP production by self-coupling reaction. ●: XMP and GMP can permeate through the cell membrane treated with 4 mg/ml polyoxyethylene stearylamine (POESA).

菌培養液を、それぞれ直接用いるプロセス（発酵液直接使用プロセス）の開発に取り組んだ（Fig. 3）。

V-2. 転換反応の動的解析 発酵液直接使用プロセスには多くのメリットがあるが、発酵液に由来するさまざまな変動要因が（その成分の量的な変動も含めて）すべて転換反応系に持ち込まれる。実用化のためには、それらの影響を解析することによって常に安定した反応結果が得られる条件を設定する必要がある。

(A) GMP 合成酵素反応に影響を及ぼす因子

XMP 発酵液および菌体培養液を直接使用するため、各培養液から転換反応液中に持ち込まれて GMP 合成酵素活性に影響を及ぼす因子を調べた（Fig. 4）¹⁴⁾

(1) Mg イオン GMP 合成酵素は、Mg イオンを必須のコファクターとして要求する。Mg イオンはさまざまな無機陰イオンと化学的に反応し、不溶性もしくは難溶性の塩を形成するなど、転換反応系において複雑な挙動を示す。たとえば、GMP 合成酵素反応（式1）の結果生成する pyrophosphoric acid (PPi) と化学的に反応して、難溶性の magnesium pyrophosphate (MgPPi) や ammonium magnesium phosphate (NH₄MgPO₄) を生成する。これらのことが Mg イオンの濃度を至適値に保つことを困難にする。

(2) リン酸イオン リン酸イオンの影響も同様に複雑であった。まず、本酵素の活性はリン酸イオンにより阻害される。¹⁴⁾ 一方 PPi は、pyrophosphatase により分解されて、ATP 再生系のリン酸イオン源として再利用されるほか、過剰の ATP が存在するとき ATP から末端のリン酸基を受け取ってトリポリリン酸、テトラポリリン酸などのポリリン酸を形成（式2）する基質となる。

(B) ATP 生合成活性に影響を及ぼす因子 自己共役反応における *C. ammoniagenes* の静止菌体の ATP 生合成活性は、リン酸イオンと Mg イオンの濃度バランスにより影響を受ける。可溶性の Mg イオン濃度がリン酸イオンの等モル濃度を上回った場合、ATP 生成は停止す

る。一方、リン酸イオン濃度が Mg イオン濃度を上回った場合、ATP 生成は促進される。

(C) リン酸イオンと Mg イオンの相互作用 リン酸イオンがポリリン酸に取り込まれることによって、リン酸濃度は低下する。また、ポリリン酸の蓄積は副反応の結果に過ぎないが、実際にはこのようにして形成されたポリリン酸が2価金属イオンのキレート剤として働く。すなわち難溶性の塩の生成阻害、菌体に付着して持ち込まれた Mg イオンの可溶化などを通じて反応液上清中の Mg イオンの濃度維持の役割を果たす。したがってポリリン酸が存在することが GMP 合成酵素の活性発現にきわめて重要であることが明らかとなった（Fig. 4）。

GMP 合成酵素反応の結果生成する PPi が、リン酸イオンに戻って再利用されるか、Mg イオンと難溶性の塩を形成するか、あるいはポリリン酸となって可溶性 Mg イオンの濃度維持に働くかが、反応成績を左右する要点であるが、それは主として GMP 合成酵素活性と ATP 再生系活性との微妙なバランスにより決まる。このことは、本転換反応の成績が、XMP 発酵や菌体培養の変動、より具体的にはそれらの培養液から持ち込まれる可溶性の Mg イオンやリン酸イオンの量の変動によって大きく影響されることを示している。

(D) 副反応系 GMP 合成酵素活性は、高濃度のリン酸イオンにより阻害されるため、リン酸イオン濃度が高い状態では GMP 合成酵素反応により消費される ATP 量を大きく上回る量の ATP が供給されることになる。このような状況下では、ATP の浪費反応系ともいべきポリリン酸生成系（式2）や G3P 生成系（式3）が活発に働く。したがって、Mg イオンとリン酸イオンとのバランスを適切に保つことが、安定した GMP 生産を行ううえで必須の要件となる。

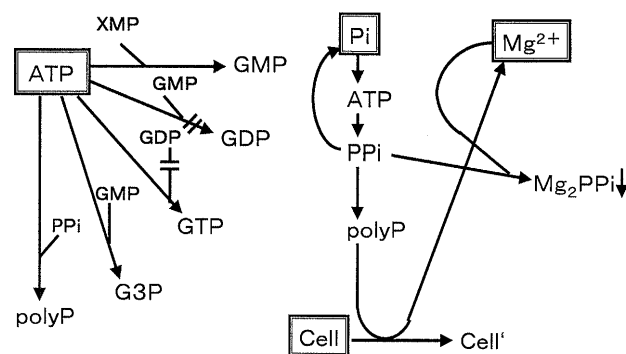
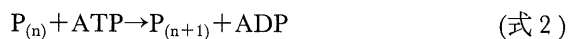


Fig. 4. Interaction between phosphate and magnesium ions during conversion of XMP to GMP.

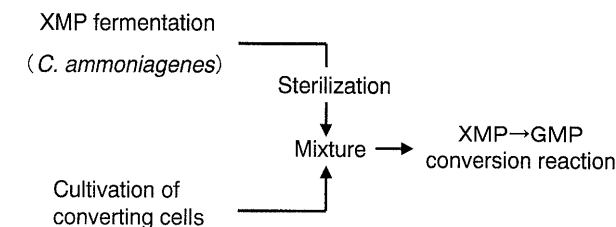
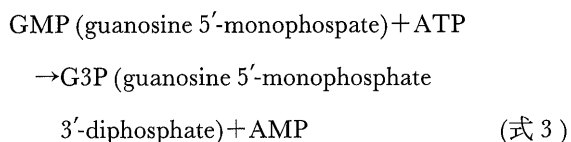


Fig. 3. Outline of GMP production from glucose by a combination of XMP fermentation and self-coupling enzymatic reaction. XMP-producing strain: *C. ammoniagenes* KY13215 (*ade^L*, *gua⁻*, *Mn^I*, *Ni^W*). Converting strain: *C. ammoniagenes* KY13510 (*dec^c*, *T^S*, *Ni^W*).



一方、XMP 発酵液と菌体培養液を直接使用する場合、培養ごとに可溶性の Mg イオン量およびリン酸イオン量がある程度変動することは避けられず、場合によっては大きく変動することがある。したがって、反応液中の両イオンの濃度が変動してもその変動を吸収できる何らかの方策を考案することが、実用化のために必須の要件であった。

(E) フィチン酸：培養液混合プロセスの安定化因子
前述のように、副生するポリリン酸が可溶性の Mg イオン濃度を保つ働きをすることが明らかとなった。しかし、リン酸イオン濃度や Mg イオン濃度によりポリリン酸自体の生成が左右されるため、結果として転換反応液中の可溶性リン酸イオンおよびマグネシウムイオンの濃度を常に一定に保つことが難しく、成績変動の主要原因となっていた。そこで、ポリリン酸に代わりその役割をつとめる化合物を検索し、同じリン酸系のキレート剤であるフィチン酸が有効であることを見いだした。反応系にフィチン酸を添加することにより、Mg イオンとリン酸イオンとの複雑な相互作用を断ち切ることができ、それぞれの濃度を独立に扱えるようになった。その結果、両イオンの濃度をそれぞれ至適に保つことが容易となったことから、共役反応活性を高いレベルで安定化させることができ、転換反応成績の安定化が可能となった。¹⁴⁾

以上の検討の結果、XMP 発酵液および転換菌体培養液を直接使用する自己共役反応プロセスが実用的生産技術として成立するに至った。

Ⅵ. 異菌体間共役反応

自己共役反応プロセスにおいては、XMP 発酵液と転換菌体培養液とを等容積ずつ混合し、さらに少容積の反応成分溶液を添加して転換反応を行う。したがって、反応開始時の XMP 濃度は XMP 発酵終了時の濃度の半分以下になる。本プロセスの生産性をさらに改善するためには、できる限り転換菌体が占める容積を減らし、XMP 発酵液の容積を増す必要がある。そのためには、転換菌の GMP 合成酵素活性と ATP 再生酵素系の活性を同時に強化する必要がある。

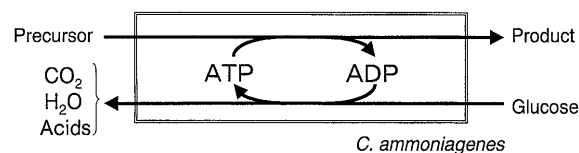
組換え DNA 技術の進展により、特定の酵素活性を強化することに関してはある程度見通しが立つようになった。GMP 合成酵素の高発現については、後述するよう

に固有の困難な問題点が存在したが、最終的には大幅な活性強化株が得られた。しかし ATP 再生酵素系については、組換え DNA 技術を適用しても大幅な活性増強は困難と考えられた。多数の酵素が関与するこのような反応系の場合、特定の酵素活性を強化してもすぐ次の酵素が律速段階として顕在化するため、たとえ当面の律速酵素の活性を大幅に強化できたとしても、ATP 再生系全体としての活性は大きくは増大しないと考えられるからである。したがって、組換え DNA 技術の適用を考慮に入れても両活性を同時に強化することは難しく、転換菌の培養液量を大幅に削減する見通しは得られなかった。プロセスをより複雑にすることなく、転換反応系に強力な ATP 生合成活性を導入する方法を考案することが次世代プロセス開発における課題であった。

この課題は、XMP 生産菌 (*C. ammoniagenes*) が保持している ATP 生合成能を利用するという着想により解決の可能性を見いだした (Fig. 5)。自己共役反応プロセスは、前述のように XMP 源として XMP 発酵液を用いているが、加熱操作により XMP 生産菌を殺菌しており、XMP 発酵液由来の菌体は有効利用していなかった (Fig. 3)。しかし、XMP 発酵終了時点においても XMP 生産菌は強力な ATP 生合成活性を保持しており、その活性が転換反応時点で利用できることが明らかとなった。XMP 発酵終了時点の菌体量は、自己共役反応法における転換菌 (*C. ammoniagenes*) の菌体量とほぼ同等であることから、ATP 生合成活性は量的にも十分であった。

一方、XMP 生産菌は、前述のごとく GMP 合成酵素を欠失している (Fig. 1)。したがって、XMP 生産菌の ATP 生合成活性を利用する場合にも転換菌は必要であるが、従来の転換菌が単一の菌体によって ATP 生合成

1. Self-coupling reaction system



2. Coupling reaction between two different cells

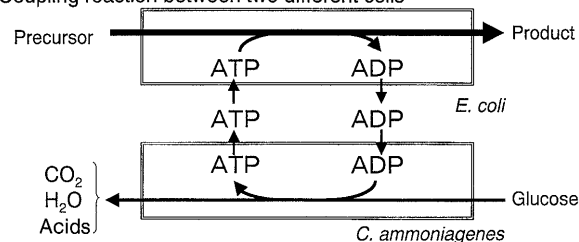


Fig. 5. Schematic comparison of self-coupling reaction and coupling reaction between two different cells.

活性と GMP 合成酵素活性の両方を供給していたのに対し、この場合は GMP 合成酵素活性のみを供給すればよいことになる。

GMP 合成酵素に限らず単一の酵素活性を強化するには、組換え DNA 技術を用いる方法がもっとも効率がよい。しかし、*C. ammoniagenes* の場合は、*E. coli* の場合ほど DNA 操作のためのいろいろな道具立てが整っていないため、GMP 合成酵素の供給に *E. coli* を用いる方法を考案した。この想定プロセスでは、XMP 生産菌である *C. ammoniagenes* の静止菌体を用いて AMP から ATP への再生を行い、その ATP を用いて *E. coli* 静止菌体の GMP 合成酵素が XMP から GMP への転換を行う。GMP 生成に伴って生じる AMP は再び XMP 生産菌の静止菌体により ATP に再生され、繰り返し使用される。この反応系が機能して GMP を蓄積するためには、*C. ammoniagenes* と *E. coli* の静止菌体間で ATP と AMP をやりとりすることが可能でなければならない。このように、2 種の異なる静止菌体間で共役する反応系を「異菌体間共役反応系」と命名した (Fig. 6)。

異菌体間共役反応系が成立すれば、転換反応において必要な転換菌の培養液量は、前述のように量的に十分な ATP 再生活性が別に存在するため、GMP 合成酵素活性の強化の度合いに応じて削減することができる。削減した液量だけ XMP 発酵液を増量することにより、転換反応液中の XMP の濃度を増すことが可能となる。

異菌体間共役反応系を構築するため、まず *E. coli* に組換え DNA 技術を適用することにより GMP 合成酵素活

性を大幅に強化することを試みた。

VII. *E. coli* の GMP 合成酵素活性強化

E. coli の GMP 合成酵素遺伝子 (*guaA*) は、我が国においてももっとも早くから組換え DNA 研究の材料として用いられた遺伝子である。¹⁵⁾ この *guaA* を用いて、セルフクローニングにより GMP 合成酵素活性を大幅に強化した *E. coli* の育種を試みた。

VII-1. コピー数増およびプロモーターの交換による高発現系の構築 まず常法により *guaA* を含むプラスミド pLC34-10 から *guaA* を切り出し、多コピー数プラスミド pBR322 につなぎ込んだプラスミド pXA1 を作成した。次に、tryptophane promoter (Ptrp) を保持するプラスミド pGBK3 から Ptrp を切り出し、pXA1 の *guaA* の上流に挿入し、プラスミド pXAR33 を作成した。pXAR33 を *E. coli* MM294 に形質導入した。形質導入株 *E. coli* MM294/pXAR33 を培養することにより、宿主の *E. coli* MM294 の場合に比べ GMP 合成酵素の活性が約 80 倍に増加した菌体を得た (Table 1)。¹⁷⁾

VII-2. 生育相と発現相との分離 より高活性を求めて *E. coli* MM294/pXAR33 株についてさらに培養条件などを検討したが、それ以上の活性増強株は得られなかった。そこで培養終了時点の生菌を調べると、プラスミド保持株は認められず、すべてプラスミド非保持株で占められていた。これは GMP 合成酵素が高発現すると致死的に働くためであると考えられた。¹⁶⁾

この結果から、菌の生育相と酵素誘導相を分離することが有効と考えられたため、温度感受性のリプレッサー (CI₈₅₇) と P_L プロモーターとの組み合わせによる温度感受性の発現系を導入し、¹⁶⁾ プラスミド pPLA66 を作成した (Fig. 7)。 *E. coli* MP347 に本プラスミドを形質導入した *E. coli* MP347/pPLA66 株を培地に培養し、培養の 5 時間目に昇温 (30→40°C) することにより、GMP 合成酵

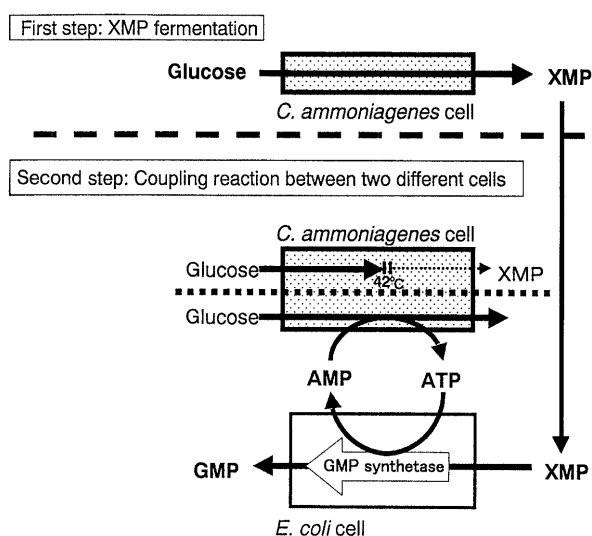


Fig. 6. Schematic representation of GMP production by a combination of fermentative production of XMP and its conversion to GMP by coupling reaction between two different resting cells.

Table 1. Comparison of GMP synthetase activities.

Host/Plasmid	Growth ^a (g/l)	GMP synthetase		
		(U/ml) ^b	(U/g) ^c	(fold)
MM294	6.48	0.0057	0.88	1
MM294/pXAR33	7.22	0.531	73.5	83.5
MP347/pPLA66	6.94	2.27	327	372
MP347/pPLC14	5.37	0.118	22	25

^a Wet weight of collected cells.

^b U, μ mol GMP formed per min; U/ml, U/ml culture broth.

^c U/g, U/g wet cells.

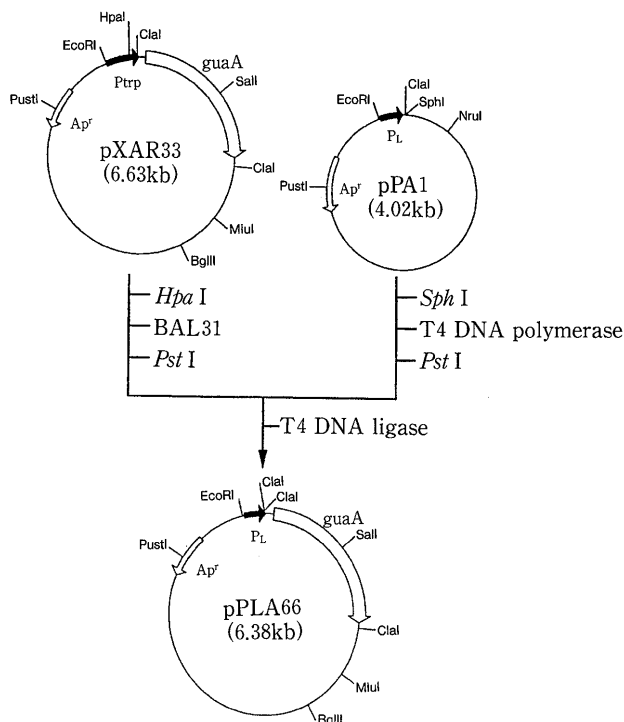


Fig. 7. Construction of plasmid pPLA66 carrying the *guaA* gene downstream of the P_L -promoter.

素活性が宿主の約370倍に強化された *E. coli* 菌体を得ることができた (Table 1).¹⁷⁾ この培養の終了時点の生菌を調べたところ、やはりプラスミド非保持菌のみが認められたことから、GMP 合成酵素が高発現すると致死的に働くことが再び示唆された。

VII-3. 2 シストロン発現系の有効性 *guaA* 遺伝子の発現をさらに最適化する目的で、 P_L プロモーターの下流にある SD 配列から 14 bp のところに *guaA* の ATG コドンが位置するように設計した合成 DNA を用いてプラスミド pLC14 を構築した。最適と考えられる配置をとる本プラスミドを導入した形質導入株 *E. coli* MP347/pLC14 では、宿主に対し約25倍の GMP 合成酵素しか発現しなかった。¹⁷⁾

一方、pPLA66 では *guaA* 遺伝子の上流に位置する 68 bp が保持されており、その中には上流のイノシン酸脱水素酵素遺伝子 (*guaB*) のストップ・コドン (TGA) を含む C 末側 10 bp の領域も含まれている。pPLA66 においては、この TGA コドンの上流に ATG コドンが位置しており、14 アミノ酸からなる短鎖ペプチドが生成していると考えられる。また、pPLA66 では *guaA* 遺伝子の SD 配列も保存されている。pPLA66 の高発現には、この短鎖ペプチドの存在と、*guaA* の SD 配列を保存していることが有効に働いており、特に 2 シストロンの発現系が *guaA* の高発現に必要であったと考えられる。¹⁷⁾

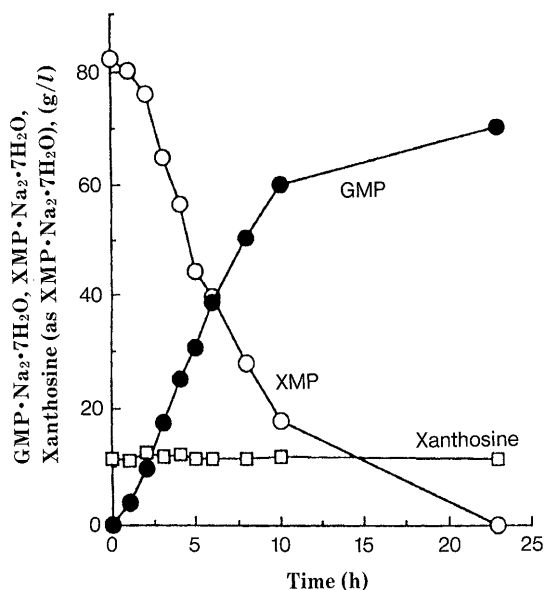


Fig. 8. Time course of GMP production from glucose by a combination of fermentative production of XMP and its enzymatic conversion to GMP by coupling reaction between *C. ammoniagenes* and *E. coli* cells.

VIII. 異菌体間共役反応による GMP 生産プロセス

VIII-1. 異菌体間共役反応プロセスの成立要件

(1) ATP 膜透過性付与法 自己共役反応プロセスでは、POESA を添加することによって XMP および GMP が細胞膜を透過するようになった静止菌体を用いた。しかし、異菌体間共役反応系ではこれらに加えて ATP も細胞膜を透過できるようにする必要がある。POESA 単独処理では ATP は透過しなかったため、透過条件の検討を行い、POESA と少量のキシレンを用いることにより ATP が菌体の細胞膜を透過することを見いだした。¹⁸⁾ なお、*C. ammoniagenes* は 1 層の細胞膜よりなるグラム陽性細菌であり、一方 *E. coli* は 2 層からなるグラム陰性菌であるが、同一の条件を用いて膜透過性付与処理を行ったところ違いは特に認められなかった。

(2) ATP の供給 反応開始時に POESA (4 mg/ml) と少量のキシレン (10 μ l/ml) を添加することにより、ATP が菌体から反応液中に漏出する。反応液中において、ATP の濃度は菌体内に閉じこめられた場合に比べて著しく希釈された状態となるが、このように低濃度になっても、ATP を添加する必要は認められなかった。本反応系に存在する ATP は主として XMP 発酵終了菌に由来するが、その持ち込み量だけで GMP 合成酵素反応は進行した。¹⁷⁾

VIII-2. 異菌体間共役反応プロセスの概要 異菌体間共役反応プロセスでは、まず *C. ammoniagenes* の XMP

生産性変異株を用いて XMP を発酵生産する。次いで、セルフクロニングにより GMP 合成酵素活性の発現を強化した *E. coli* MP347/pPLA66 を別に培養し、この培養液を XMP 発酵終了液に相当比率で加え転換反応に移る。転換反応開始に先立ち、グルコース、フィチン酸、Mg イオン、リン酸イオンなど反応成分を添加し、温度、通気量、攪拌数、pH を至適条件に設定する。最後に膜透過性処理剤として POESA と少量のキシレンを添加して転換反応を開始する。

XMP 発酵液に対する GMP 合成酵素供給源としての *E. coli* 培養液の量は、自己共役反応法では等量であったのに対し、本異菌体間反応プロセスでは17分の1(全反応液量に対し、XMP 85%, 転換菌 5%, 転換反応液成分10%)に削減しても20~24時間のうちにすべての XMP が消失し、80%以上の収率で70 g/l 以上の GMP が得られた (Fig. 8).¹⁷⁾なお、本転換反応において、XMP 発酵液から菌体を除去した上澄液を XMP 源として使用した場合、GMP はほとんど生成しなかった。このことは、XMP 発酵終了後の *C. ammoniagenes* の菌体が ATP 再生系として機能していることを示している。

K. 異菌体間共役反応法の応用

異菌体間共役反応法は、ATP 再生活性を供給する菌体と生合成酵素活性を供給する菌体とを分離した分業システムとすることによって、生合成酵素源を ATP 生合成能力に関係なくスクリーニングできることになった。微生物のみならず、動植物細胞を含めあらゆる生物をスクリーニングの対象とすることができるため、目的の触媒活性を有する生合成酵素を見いだす可能性が大きく広がった。目的の酵素が見いだされれば、それが ATP を要求する生合成酵素であっても、その遺伝子をクロニングし微生物 (たとえば *E. coli*) を用いて高発現させて共役反応系に組み込むことにより、ATP を必要としない実用的な生産プロセスを構築できる見通しが得られた。

K-1. *C. ammoniagenes* と *E. coli* の共役反応法による IMP の生産 IMP は、発酵生産したイノシンの5'-位をリン酸化することにより得られる。従来は化学的なリン酸化法が用いられてきたが、筆者らは GMP において成功した異菌体間共役反応法を適用することを念頭に、イノシンリン酸化活性を *E. coli* 中に求め、グアノシンとイノシンを基質とする酵素 guanosine-inosine kinase を見いだした。ついで、本酵素の遺伝子を取得し、セルフクロニングによりその活性を大幅に強化した

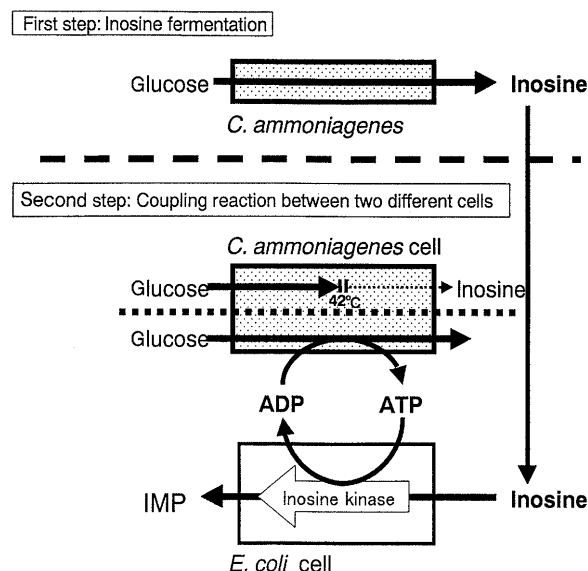


Fig. 9. Schematic representation of IMP production by a combination of fermentative production of inosine and its conversion to IMP by coupling reaction between two different resting cells.

E. coli を育種した。¹⁹⁾

C. ammoniagenes のイノシン生産性変異株を育種し、GMP の場合に倣って、イノシン発酵終了後の菌体の ATP 再生活性を利用する異菌体間共役反応プロセスを構築した (Fig. 9)。本共役反応プロセスを用いることにより、ATP を必要とする guanosine-inosine kinase を用いながら、ATP を添加することなくグルコースから IMP を生産することが可能な実用的プロセスが実現した。^{20,21)}

K-2. 複合共役反応法による CDP コリンの生産

CDP コリンは、脳血管障害の治療薬として世界で年間

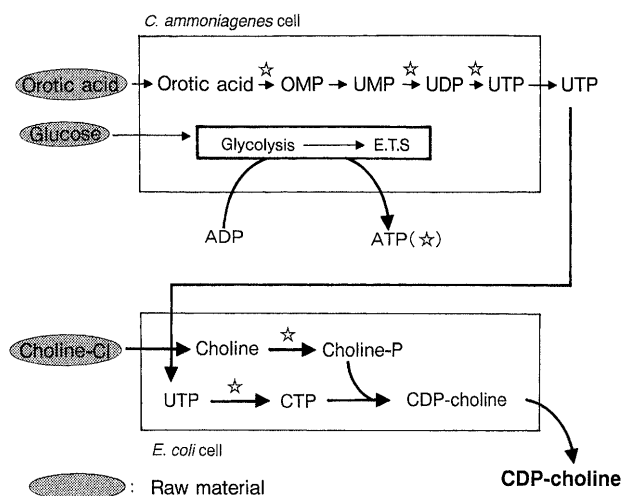


Fig. 10. CDP-choline production from orotic acid and choline chloride by a complex-coupling reaction with two kinds of resting cells.

数十トンの需要がある。従来は5'-シチジル酸（以下CMP）とコリンリン酸を原料とする化学的合成法により生産されてきたが、これらの原料は高価であるためコストが高く、製法革新が望まれていた。

筆者らは主原料として、CMPの代わりに *C. ammoniagenes* の変異株を用いる発酵法によりきわめて経済的に生産できるオロット酸を用い、またコリンリン酸の代わりに化学合成法で安価に製造されている塩化コリンを用いる、酵素法による製造プロセスを開発した。新プロセスは、自己共役反応系と異菌体間共役反応系を同時に利用する複合共役反応系からなる。すなわち、オロット酸かUTPまでは、単一の *C. ammoniagenes* の静止菌体を酵素源とする自己共役反応系である。一方、(1) UTP からCTP、(2) 塩化コリンからコリンリン酸、および(3) CTPとコリンリン酸からCDPコリンの各酵素反応は、*E. coli* の静止菌体により供給されるそれぞれの生合成酵素と *C. ammoniagenes* のATP再生系との共役反応系である。したがって、全体としては複合的な共役反応プロセスと言える。²¹⁾

リン脂質の生合成経路は真核生物と原核生物では異なっており、原核生物はCDPコリン生合成経路を持たない。群馬大学の山下らは、*Saccharomyces cerevisiae* の choline kinase (CKIase) 遺伝子 (*CKI*) および cholinephosphate cytidylyltransferase (CCTase) 遺伝子 (*CCT*) をクローニングし、*E. coli* における発現に成功した^{22,23)} ので、両遺伝子源としてこの *E. coli* を導入した。またCTP synthetase の遺伝子 (*pyrG*) を遺伝子バンクより入手した。

C. ammoniagenes の菌体と、セルフクローニングでCTP synthetaseを強化した *E. coli*、および *S. cerevisiae* 由来の2遺伝子をそれぞれ導入した *E. coli* の計4種類の菌体を用いて複合共役反応を行い、オロット酸と塩化コリンを原料として、酵素法によりCDPコリンが製造できることを実証することができた。しかし実用的観点から見ると、用いる菌体種類は2種以下にしたい。そこで3種類の *E. coli* がそれぞれに保持している各遺伝子を単一のプラスミドに挿入し *E. coli* に導入したところ、単一の *E. coli* 菌体が3種類の酵素活性を発現した。^{24,25)} この *E. coli* と *C. ammoniagenes* との2種の菌体を酵素源とする反応により、オロット酸と塩化コリンとからCDPコリンを生産する実用的なプロセスが成立した (Fig. 10)。

本研究の機会を与えていただき、また発表の許可をいただきました当社関係幹部の皆様に感謝申し上げます。本研究は、森英郎

博士、飯田彰博博士、遠藤節子さん、森下恵理子さんをはじめ、協和発酵東京研究所旧藤尾グループの皆様、杉山喜好研究員をはじめとする同技術研究所の皆様、防府工場製造部、工務部の皆様との共同研究開発の結果をまとめたものであり、関係の方々に感謝致します。

文 献

- 1) 国中 明：農化，**34**，489-492 (1960).
- 2) Yamaguchi, S.: *J. Food Sci.*, **32**, 473-478 (1967).
- 3) 国中 明：核酸発酵，p. 76，講談社 (1976).
- 4) Matsui, H., Sato, K., Enei, H., and Hirose, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 393-394 (1979).
- 5) Furuya, A., Abe, S., and Kinoshita, S.: *Biotech. Bioeng.*, **13**, 229-240 (1971).
- 6) Misawa, M., Nara, T., Udagawa, K., Abe, S., and Kinoshita, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 370-376 (1969).
- 7) 栃倉辰六郎：醸酵工学，**56**，508-526 (1978).
- 8) Kimura, A., Hirose, K., Karia, Y., and Nagai, S.: *J. Bacteriol.*, **125**, 744-746 (1976).
- 9) 立木 隆：バイオサイエンスとインダストリー，**47**，936-943 (1989).
- 10) Murata, K., Tani, K., Kato, J., and Chibata, I.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 11-21 (1980).
- 11) 谷 吉樹：発酵と工業，**42**，667-675 (1984).
- 12) Furuya, A., Abe, S., and Kinoshita, S.: *Biotech. Bioeng.*, **13**, 229-240 (1971).
- 13) Furuya, A., Okachi, R., Takayama, K., and Abe, S.: *Biotech. Bioeng.*, **15**, 795-803 (1973).
- 14) 藤尾達郎，古屋 晃：発酵と工業，**42**，570-580 (1984).
- 15) Shimada, K., Fukumaki, Y., and Takagi, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **147**, 203-208 (1976).
- 16) Maruyama, A., Nishi, T., Ozaki, A., Ito, S., and Fujio, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1879-1884 (1986).
- 17) Fujio, T., Nishi, T., Ito, S., and Maruyama, A.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 840-845 (1997).
- 18) Fujio, T. and Furuya, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 143-147 (1985).
- 19) Mori, H., Iida, A., Teshiba, S., and Fujio, T.: *J. Bacteriol.*, **177**, 4921-4926 (1995).
- 20) Mori, H., Iida, A., Fujio, T., and Teshiba, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 693-698 (1997).
- 21) 藤尾達郎，丸山明彦，森 英郎：バイオサイエンスとインダストリー，**56**，737-742 (1998).
- 22) Hosaka, K., Kodaki, T., and Yamashita, S.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 2053-2059 (1989).
- 23) Tsukagoshi, Y., Nikawa, J., Hosaka, K., and Yamashita, S.: *J. Bacteriol.*, **173**, 2134-2136 (1991).
- 24) Fujio, T. and Maruyama, A.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 956-959 (1997).
- 25) Fujio, T., Teshiba, S., and Maruyama, A.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 960-964 (1997).