

アミノ酸発酵研究の最前線： 生産プロセスの高効率化に向けて

安枝 寿

アミノ酸発酵産業は、1950年代のわが国での *Corynebacterium glutamicum* によるL-グルタミン酸発酵法¹⁾の確立以来、産学連携の下に発展を遂げ、同時に各種のアミノ酸事業の拡大を通してグローバルに展開しつつある。現在でもアミノ酸の世界市場は伸張り、拡大する市場をめぐり国際的に熾烈な競争が繰り広げられている。最も生産量が多いL-グルタミン酸ナトリウム市場は2006年時点で約195万トン、飼料用アミノ酸としてのL-リジンは約96万トンとも推定されている。したがって、このような大量生産の製品を製造する上で、環境保護への配慮はきわめて重要なものとなってきた。

アミノ酸発酵産業は基本的には農業との連携によってバイオマスが循環する「資源循環型」の産業である。弊社グループでは図1に示したように、アミノ酸「バイオサイクル」という環境に配慮した生産活動を推進している²⁾。たとえば、主原料としてサトウキビの糖蜜を用いるアミノ酸生産プロセスでは、50万トンのアミノ酸を製造するために約150万トンの糖蜜が必要である。一方、この過程で約160万トンの、窒素や有機物を含む副生物が出るが、この多くは肥料として加工し、主原料である糖蜜150万トンの供給に必要なサトウキビ畑面積50万haの約7割へ有機肥料として供給が可能である。このことは、その分の化学肥料（尿素）の使用量の低減につなが

り、結局は、その尿素を製造する際に年間発生する二酸化炭素（約23万トン）の削減に貢献している。

アミノ酸発酵菌の育種ターゲットの変化

さて、筆者ら応用微生物学を専門とした技術者の観点からは、「環境適合型」の製法開発とは、自ずとアミノ酸生産菌の高効率化が中心課題となる。またその生産菌株についても、*C. glutamicum* を代表とするコリネ型細菌以外に、比較的培養至適温度が高く、発酵生産性の向上が期待できる *Escherichia coli* などを研究対象として基盤的研究が進められている。なぜならば、高い発酵生産性は、アミノ酸発酵工程での省エネや製造設備への省投資に寄与できる重要な特徴といえるからである。

近年、さまざまな微生物のゲノム配列が解読され、インフォマティクス研究や精密なトランスクリプトーム、メタボローム解析研究により蓄積された知見を基に、現在では、アミノ酸生産菌育種のためのターゲットは、アミノ酸の固有生合成系酵素群から、中央代謝系やエネルギー代謝系、目的生産物の排出輸送系、さらに、遺伝子発現に関する転写・翻訳系、ストレス応答などを含むグローバルレギュレーター系の改変へと微生物全体をシステムとして捉えた全体最適化へ向けたすべての因子群へと展開している（図2）。

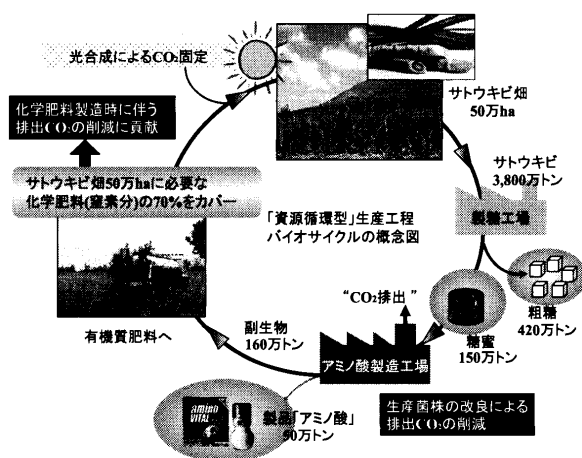


図1. アミノ酸製造にかかわる資源循環型バイオサイクルの概念図。使用済みの物質や副生物を環境への負荷なく再利用や活用を図り、持続的な生産活動を確立する。アミノ酸生産菌の改良は、アミノ酸製造時の二酸化炭素排出量低減などに貢献できる。

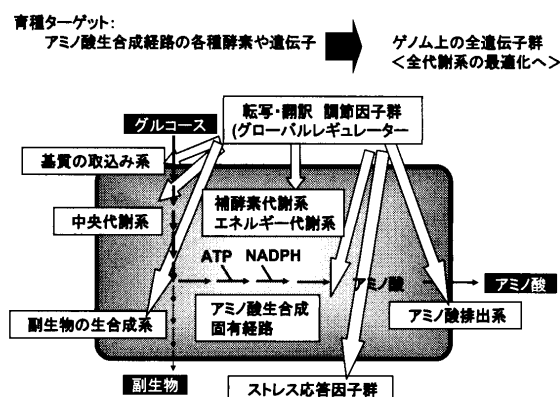


図2. アミノ酸生産菌の育種ターゲットの拡大。研究対象は、アミノ酸固有生合成経路上の重要酵素をコードする遺伝子群から、生産菌での全代謝系の最適化を図るためにゲノム上の全遺伝子群へと変化している。

特 集

以下に、環境負荷低減技術と捉えられるアミノ酸生産菌の改良育種について、いくつかの研究事例を紹介する。

rmf遺伝子欠損によるアミノ酸生産性の改良

アミノ酸発酵の培養では、微生物は急速な生育後に定常期に入り、通常は生育後半から目的アミノ酸の生産が始まり培地中に蓄積されるが、目的アミノ酸の生産速度は定常期において徐々に低下傾向となる。工業生産上、定常期でも生産速度を最大値で長期にわたり維持できる菌株の育種は生産性の観点で重要である。我々は、さまざまな培養条件下でのアミノ酸生産菌のトランスクリプトーム解析から定常期に特異的に発現レベルが上昇する遺伝子 *rmf* に着目した⁴⁾。本遺伝子産物 RMF (ribosome modulation factor) はリボソームを二量体化しその翻訳活性を停止させることが知られている因子³⁾である。このような RMF の機能から、定常期では RMF により活性型リボソーム数が減少し、目的アミノ酸の生合成などに必要な酵素やそれらの関連因子の新規生合成が低下することで、結果としてアミノ酸の生産速度が低下するものと推定した。そこで *E. coli* で作製した L-リジン生産菌から、その *rmf* 遺伝子の破壊株を構築し L-リジン生産性をフラスコにて培養評価したところ、対照株に比べ定常期での生産性が向上し、その結果、L-リジンの蓄積量は約 1.7 倍となることがわかった⁴⁾。

エネルギー代謝系改変によるアミノ酸発酵への効果

E. coli は好気条件下の呼吸鎖構成因子 (図 3) として主に 2 種類の末端酸化酵素をもち、エネルギー獲得効率が相対的に高いものと低いものが機能しているとされている。そこで、高いエネルギー獲得効率を示す Cyt *bo* をコードする *cyo* オペロンの増幅と低い効率の Cyt *bd* オペロンの欠損とを組み合わせた呼吸鎖改変株を作製し、その株の

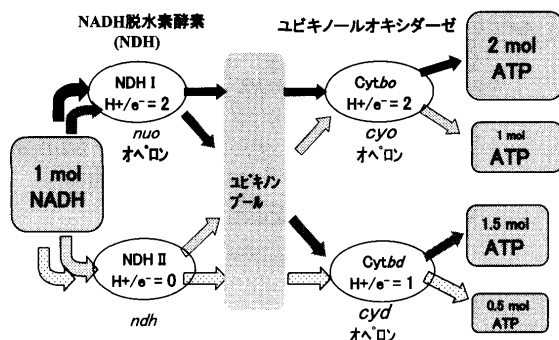


図 3. *E. coli* の呼吸鎖の模式図。NADH は NADH 脱水素酵素 (NDH) で酸化され、次に末端酸化酵素に電子が受け渡される。NDH と末端酸化酵素はそれぞれ 2 種類存在し、プロトン輸送効率の良いものと悪いものがあり、電子の流れる経路により、ATP の合成効率が変化することになる。

連続培養による単位菌体量形成に必要な酸素要求量を調べたところ、予想どおり、対照株にくらべて改変株は酸素要求量が低下しており、エネルギー獲得効率 (NADH 分子当たりの生成 ATP 分子数比) の向上が示唆された。そこで本呼吸鎖改変株を利用して L-リジンや L-スレオニンの生産株を作製し培養にて生産性を評価したところ、両発酵でアミノ酸の蓄積量が増加した。特に、L-リジンでは最大約 1.6 倍の向上が見られた⁵⁾。

アミノ酸排出に関与する新規因子の活用

L-リジンを含む塩基性アミノ酸の排出因子をコードする遺伝子としてすでに *C. glutamicum* の *lysE* 遺伝子が報告されている⁶⁾。我々は、新規に *E. coli* における L-リジン排出系因子をコードする遺伝子をスクリーニングし、その候補遺伝子として機能未知遺伝子 *ybjE* を得ることができた⁷⁾。本遺伝子産物は 9 回膜貫通型の膜タンパク質と推定された。そこで *E. coli* の L-リジン生産菌にて本遺伝子の増幅効果を検討したところ、L-リジンの生産量が向上することがわかった⁷⁾。なお、*LysE* と *YbjE* の間のアミノ酸配列上の相同性は認められない。

一方、コリネ型細菌における L-グルタミン酸の排出に関与する因子として我々は NCgl1221 を同定している⁸⁾。本遺伝子は細胞が急激な浸透圧変化を受けた際に、その調整機能を有すると言われるメカノセンシティブチャネルをコードする *yggB* のホモログであるが、1) *C. glutamicum* を変異処理し、L-グルタミン酸を過剰生産する変異株では、この遺伝子にも変異が見られる、2) 同変異遺伝子のみを野生株へ移行するだけで、その株は L-グルタミン酸の過剰生産株となる、3) L-グルタミン酸過剰生産株で本遺伝子を欠損させると L-グルタミン酸分泌能が損なわれ、細胞内の L-グルタミン酸濃度が野生株の約 10 倍にも達する、などの結果⁸⁾より、本遺伝子産物は L-グルタミン酸の排出因子そのものか、排出を促進するためのポジティブレギュレーターであろうと推測している (以降、ここでは本因子を *GluE* と命名する)。また、本 *GluE* が排出担体と仮定し、コリネ型細菌における L-グルタミン酸の過剰生産誘導との関係について、現時点での我々のモデルを図 4 にまとめたので参照されたい⁸⁾。

このような生産物の排出系に係わる因子を同定し、育種へ応用することは大変重要である。一般に細胞内のアミノ酸濃度は、その生物が必要とする最小限の濃度となるようにさまざまな制御系により維持、管理されていると思われるが、人為的に必要なタイミングで、目的アミノ酸を菌体外へ輸送する因子を有効活用することはきわめて効率よいアミノ酸生産菌の構築につながるであろう。

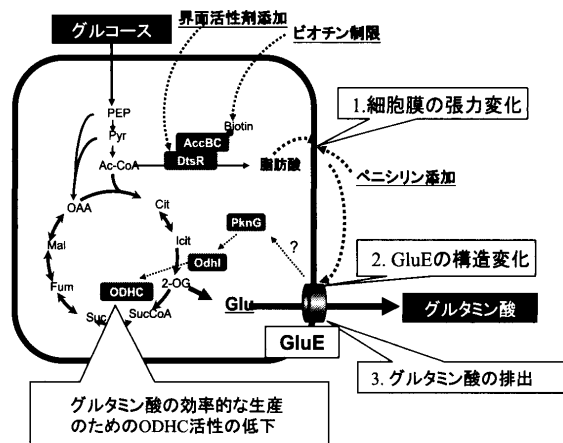


図4. コリネ型細菌のL-グルタミン酸生産誘導モデル⁸⁾。野生株の場合、培地中のビオチン制限や培地への界面活性剤添加、ペニシリン添加により細胞膜の張力が変化する。それに伴って細胞膜中のGluEの立体構造が変化し、菌体内のL-グルタミン酸が菌体外へ排出される。一方、L-グルタミン酸生成の誘導を必要としないL-グルタミン酸生産変異株では、すでに変異によりGluEの立体構造が変化しており、そのために常にL-グルタミン酸を培地中へ排出していると我々は考えている。AccBC, アシル-CoA-カルボキシラーゼサブユニットB, C; DtsR, 界面活性剤高感受性解消因子; ODHC, 2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体; PknG, Ser/Thr プロテインキナーゼ; OdhI, ODH 活性調節因子。

効率的なL-グルタミン酸生産に向けての 新規代謝経路の構築

一般的な代謝経路によるグルコースからのL-グルタミン酸生合成の最大理論モル収率は100%で、グルコース1モルからは1モルのL-グルタミン酸を生成しうる。しかし、その際に結果的に1モルの炭酸ガス排出が起こるため原料の炭素源が無駄となる。筆者らは、その炭酸ガス発生点の一つであるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) による反応は、ホスホケトラーゼ (PKT) による反応系を新規に導入することでバイパスできることを見いだした。つまりは炭酸ガス生成を伴わずに、フルクトース6-リン酸 (F6P) からアセチル-CoAを生成する経路をコリネ型細菌で設計し、実際に、L-グルタミン酸の高効率な生産菌構築 (図5) に成功した⁹⁾。すなわち、この新規代謝経路ではグルコースからのL-グルタミン酸生合成の最大理論モル収率は120%と飛躍的に向上するため、非常に効率的な生産菌が育種できる可能性を開くことができた。

おわりに：アミノ酸発酵の未来形

1908年に昆布のうま味成分がL-グルタミン酸塩であることを池田菊苗博士（旧東京帝国大学）が発見し、その有用性が認識されるに従い、今日では冒頭に述べたようにL-グルタミン酸ナトリウムはその世界需要に応えるために最も大量に発酵生産されるアミノ酸となっている。また各種飼料用アミノ酸も、家畜動物での飼料効率

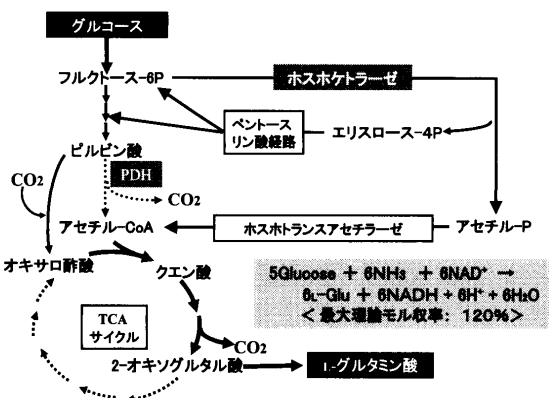


図5. 効率的なL-グルタミン酸生産のための新規代謝経路の設計と構築。ペントースリン酸経路の酵素群とホスホトランスアセチラーゼ(PTA)の反応系にPKT反応系が組み込まれると、炭酸ガス排出を伴うPDH反応をバイパスして、F6Pからアセチル-CoAが供給可能となる。

の向上や排泄物中の窒素化合物の低減化効果により、ますます需要が増大している。今後もこのアミノ酸発酵産業が持続的に成長を続けるためには、その生産プロセスは環境となおいっそう調和するものでなければならない。たとえば前述の炭酸ガスの発生を削減できる菌株の開発や、発酵の主原料である炭素源には食糧と競合しない未利用バイオマスの利用や環境中に無駄に放出されているC1化合物の活用¹⁰⁾なども含めて、安価かつ安全な炭素源の利用が望まれる。また副原料や製品の精製段階で使用する酸やアルカリ類の削減プロセスの構築、発酵段階での高温化に耐えられる耐熱性の生産菌の活用¹¹⁾なども環境負荷低減のためには大変有効な技術となるだろう。

以上のように、我々は、世界の人々への有用物質の大量提供のために、ゼロエミッション視点も入れた環境調和型の生産システムの構築を積極的に進めていきたいと考えている。

本稿に記載いたしました各研究に対しまして、ご指導、ご協力
いただきました関係各位に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Kinoshita, S. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 193 (1957).
- 2) 横井大輔: アミノ酸 No.27, Ajico News No.218 (2005).
- 3) Wada, A. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 410 (1995).
- 4) Imaizumi, A. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **117**, 111 (2005).
- 5) 中井勇太ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.261 (2006).
- 6) Vrljic, M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **22**, 815 (1996).
- 7) 植田拓嗣ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.238 (2006).
- 8) Nakamura, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4491 (2007).
- 9) Chinen, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 262 (2007).
- 10) Gunji, Y. and Yasueda, H.: *J. Biotechnol.*, **127**, 1 (2006).
- 11) Nishio, Y. *et al.*: *Genome Res.*, **13**, 1572 (2003).