

アミノ酸発酵菌開発の現状と課題

伊藤 久生

アミノ酸発酵は今から約100年前に創生されたアミノ酸事業を背景に、およそ50年前にわが国で誕生し、産学連携の下学術的發展を遂げると同時に、アミノ酸事業の更なる拡大、グローバル化を支えてきた技術である。1957年、木下・鶴高らによって *Micrococcus glutamicus* (現在の *Corynebacterium glutamicum*) が、糖質を主体とする培地にてL-グルタミン酸を過剰生産することが見いだされた。この発見を契機としてL-グルタミン酸の発酵生産法が開発、工業化された。その後、生合成系路の調節機構を回避する代謝制御発酵の技術の進展と共に、アミノ酸発酵の対象範囲は拡大し、L-リジン、L-スレオニン、L-フェニルアラニン、L-アルギニンなど各種アミノ酸の工業レベルでの発酵生産が可能となった。

アミノ酸発酵は、事業としても研究としても長い歴史を有する分野であり、L-グルタミン酸生産菌の発見や代謝制御発酵に関しては生物学関連の教科書でもとりあげられている。すでに飽和した事業分野、終了した研究分野と思われる方もあろうが、そうでもない。一例として図1に飼料用アミノ酸の世界市場拡大、図2にアミノ酸発酵関連企業から出願された飼料用アミノ酸発酵関連特許公開数の推移を示した。現在でもアミノ酸の世界市場は右肩上がりに伸張しており、アミノ酸発酵関連

特許も毎年多数出願されている。拡大する市場をめぐって国際的に熾烈な競争が繰り広げられており、事業的にも技術的にもきわめてアクティブな領域である。

本稿では、50年の歴史をもつアミノ酸発酵の研究開発が近年どのようなかたちになりつつあるのか、また将来はどのような可能性を目指しているのかについて、いくつかの例をあげて説明したい。アミノ酸発酵の研究開発の主体は現在ではそれを事業として推し進めている各企業であるが、基盤となるべき学術分野では大学などの公的研究機関との共同研究が多々進められている。企業と大学を含む社外研究機関とのコラボレーションを実施する際の利点・課題などにも触れていきたい。

アミノ酸発酵菌株の育種

アミノ酸発酵においては、原材料からの転換効率、生産速度、不純物濃度などの生産効率に関与する種々の因子は、使用する微生物の性質によって大きく左右される。高い生産能を有する変異株を取得するステップ、すなわち発酵生産菌株の育種が重視される所以である。図2にて示した特許も、その多くは発酵菌株の育種に関するものである。

アミノ酸発酵の菌株は、従来は *C. glutamicum* が中心であったが、遺伝生化学的知見が豊富で実験技術も整備されている *Escherichia coli* など親株として使用されつつ

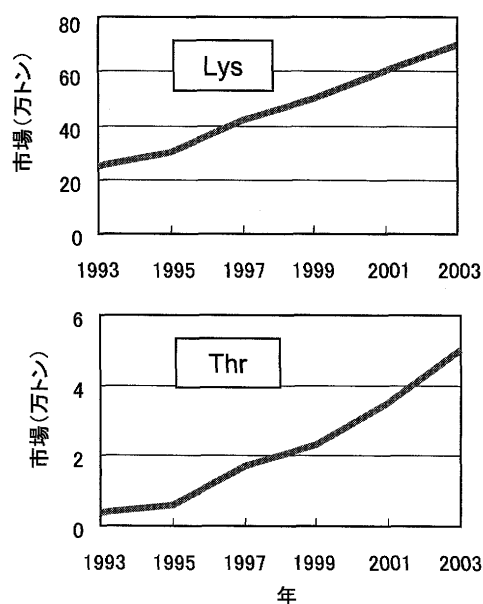


図1. 飼料用アミノ酸の世界市場の拡大 (味の素㈱推定)

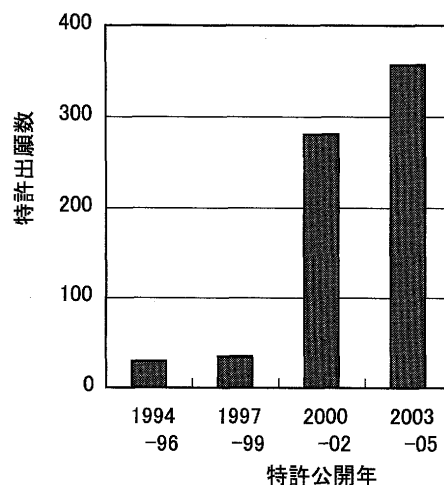


図2. アミノ酸主要サプライヤーからの飼料用アミノ酸発酵関連特許出願数の推移

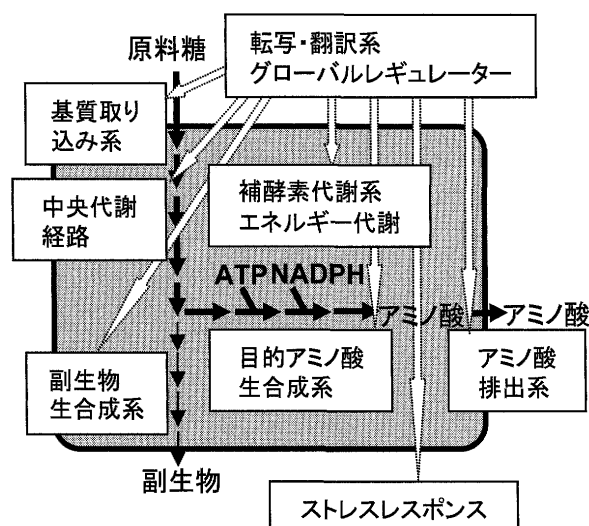


図3. アミノ酸生産菌株育種ポイントの広がり

ある。 *E. coli* は *C. glutamicum* と比較すると培養至適温度が高く生育も早いため、育種期間の短縮に加え、発酵生産性の向上も期待される。現在では、*E. coli* は単なる実験室モデル菌株でなく工業生産菌株でもある。

先に述べたように、変異株を用いた代謝制御発酵の発展につれてアミノ酸発酵の範囲は拡大した。さらに、1980年代以降遺伝子操作技術の進展に応じて、アミノ酸生合成経路遺伝子の発現量増強による生産効率の向上が図られてきた。生産効率の更なる向上を目指して、現在では改変されるべき箇所は目的とするアミノ酸の生合成経路、分解経路のみにとどまらず、図3に示すように中央代謝系、エネルギー代謝系、補酵素変換系、ストレス応答、目的物質の菌体外排出系など、多岐にわたっている。ここではそのうち、エネルギー代謝系改変の例、転写・翻訳調節因子改変の例、および目的アミノ酸の菌体外排出系改変の例について紹介する。このような育種改変のポイントが数多く積み重なって、図2に示したような多数の特許出願につながっているのである。

エネルギー代謝系改変による育種

アミノ酸発酵において通常使用される主原料は通常、グルコース、シュクロースなどの糖類あるいは糖類を高濃度含有する農産品である。培地に添加された糖類は、解糖系、TCA回路などの中央代謝経路を経てアミノ酸の生合成経路に入り、目的アミノ酸の炭素骨格となるが、一部は菌体自身の形成にも使用され、また、炭酸ガスまで分解されてエネルギー生成に利用されるものもある。中央代謝経路にてNADHが生成され、呼吸鎖にてNADHを酸化して膜電位を形成、膜電位を利用してATP合成がなされ、このATPがアミノ酸合成や菌体形成に使用され

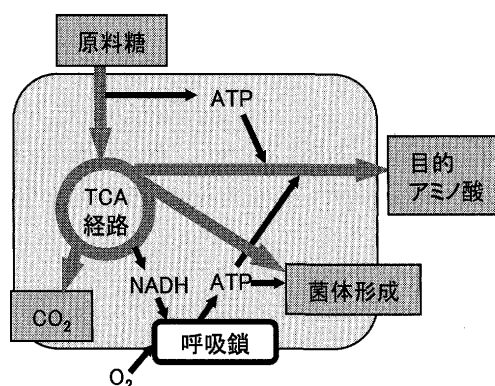


図4. アミノ酸発酵における炭素分配とエネルギー代謝
→ 炭素骨格の流れ

るわけである。すなわち、原料の糖炭素骨格は目的アミノ酸に転換されるか、菌体になるか、あるいは分解されてエネルギーを産生するか、大きく三分割される（図4）。一定量のATPを産生するために必要なNADH量を減らすことが可能であれば、そのために使用され炭酸ガスに分解される炭素骨格の量が低減し、その分炭素骨格を目的アミノ酸の生産のために有効に利用できる可能性がある。

E. coli K-12 株の呼吸鎖では、主に 2 種類の NADH dehydrogenase (NDH) と、2 種類の末端酸化酵素が機能していると考えられており、NDH と末端酸化酵素のそれぞれの段階で 2 種類ずつ存在する酵素は、プロトン排出効率が異なるため、相対的にエネルギー獲得効率が低いものと高いものが存在することとなる。高いエネルギー効率を示す酵素の増幅と、低いエネルギー効率を示す酵素の欠損化の組み合わせによって、単位菌体量を形成するための酸素使用量が減少した。これは、同菌株のエネルギー獲得効率が向上していることを示唆している。また、呼吸鎖改変を行った *E. coli* K-12 株を利用し各種のアミノ酸発酵を実施したところ、エネルギー効率が向上していると考えられる呼吸鎖の改変を行った株では、生産能の向上が観察された¹⁾。

転写・翻訳調節因子改変による育種

転写・翻訳調節因子のアミノ酸発酵に与える影響の例として、定常期特異的に発現する *rmf* 遺伝子の改変によるアミノ酸生産能の改良を示す。*rmf* は Ribosome modulation factor をコードする遺伝子であり、定常期にリボソームを二量体化し、翻訳活性を停止させる因子として知られている。一般にアミノ酸発酵の効率は培養後半低下する。発酵効率の高い培養中盤までと、低下する培養後半の各種遺伝子発現の違いを DNA アレイ技術を用いて検討したところ、培養後半に *rmf* 遺伝子の発現量が向

特 集

上していることが判明した。そこで、*E. coli* 由来の L-リジン生産菌にて *rmf* 遺伝子欠損を誘導したところ、生育の若干の向上に加え、L-リジン生産能の向上がみられた。生産能向上は特に定常期に著しい。翻訳活性の維持により、L-リジン生合成能がより長期に保持された結果と考えられた²⁾。

アミノ酸排出経路の改変

アミノ酸発酵においては、目的とするアミノ酸は菌体外に蓄積される。アミノ酸の菌体外排出経路は近年注目されつつある研究分野である。筆者らは *C. glutamicum* の L-グルタミン酸排出担体と想定される因子を特定した³⁾。本因子をコードする遺伝子 NCgl1221 は他微生物にてメカノセンシティブチャンネルと呼ばれている遺伝子と相同性を有する。メカノセンシティブチャンネルは、浸透圧のダウンショックの際に細胞膜の膨圧を感知し適合溶質を細胞外に放出する機能を有するイオンチャンネルである。NCgl1221 も同様に、L-グルタミン酸生産の誘導処理によって引き起こされる細胞膜の張力変化によって活性化され、L-グルタミン酸の細胞外への排出を触媒するトランスポーター本体か、あるいはその活性調節因子であると考えられている。NCgl1221 遺伝子をプラスミドなどで増幅すると、誘導処理条件での L-グルタミン酸蓄積の増加がみられた。また、誘導処理なしでも L-グルタミン酸を細胞外に排出するような変異型の NCgl1221 も単離されている。

菌の代謝系全体の至適化

アミノ酸発酵の効率化に向けた各要素技術の改変について触れてきたが、実際の高力価生産菌株ではこのよう

な改変が多数組み合わせられたものが使用される。多数の改変の組み合わせにおいては、単独では有効と思われる改変が常に有効であるとは限らない。逆に代謝経路全体のバランスを崩しネガティブな影響を与えることも稀ではない。実際の生産菌株育種においては、代謝系全体を俯瞰して至適化がなされていることがきわめて重要なポイントである。

代謝系全体の至適化には、近年発展の著しいフラックス解析技術、オミクス解析技術の使用が有効である。細胞内の生化学反応ネットワークの化学量論に基づく代謝フラックス解析によって、目的生産物の理想的な代謝経路を探ることができる。また、同位体ラベル基質を用いて代謝生産物の同位体分布比率を実験的に測定することによって、現状のフラックスの状態を推測することも可能である。菌体内の代謝中間体を網羅的に測定するメタボロミクス技術を使用すれば、代謝過程のどの部分に律速が生じているのか推定することができる。また、トランスクリプトミクス技術を使用することによって、ある一つの改変に対して菌が思わぬレスポンスをしていることを察知できる場合もある。これらの技術を用いて発酵生産時の代謝系全体の動きを捉え、適切な改良を加えることによって代謝全体を至適化することを筆者らは目指している。

発酵中の菌の代謝系全体の至適化の重要性について述べてきたが、将来的には発酵液から製品を単離精製する工程も含めた製造工程全体の至適化、さらには発酵原料である農産物調達まで含めた生産システム全体の至適化が重要となる。図5に当社が提唱する「環境調和型バイオサイクル」を示した。

糖蜜を原料として使用しているアミノ酸製造工場を想

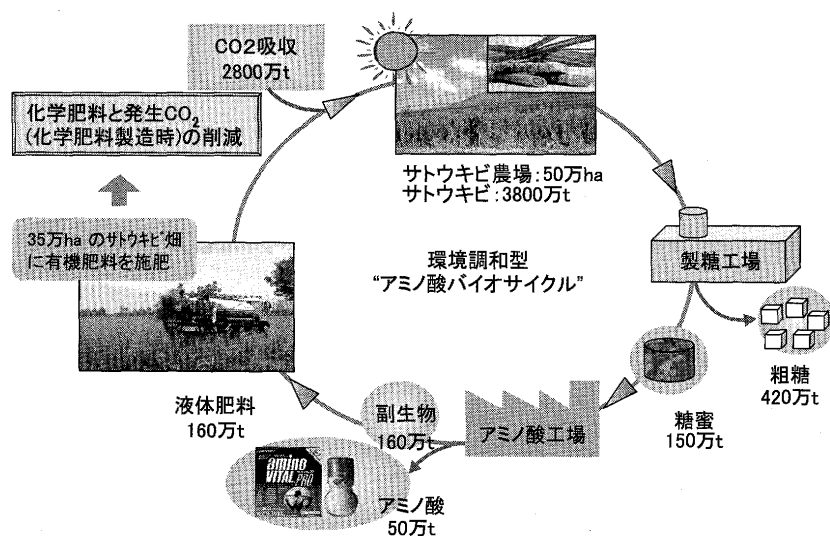


図5. 環境調和型「アミノ酸バイオサイクル」

定し、50万tのアミノ酸を製造するために150万tの糖蜜が必要と仮定する。150万tの糖蜜を入手するためには50万haの農場で生産されるサトウキビ3800万tが必要である。一方、アミノ酸の発酵生産に伴い副産物である培養廃液が160万t程度得られる。一般に培養廃液は良好な有機肥料として利用可能であり、160万tの液体肥料は35万haのサトウキビ畑に有機肥料として施肥することができる。このようなサイクルを回すことによって、大気中の炭酸ガスを吸収しながら再生可能な資源を用いて、環境的にも経済的にも有効な生産システムを構築することが可能と考えている。

産学連携によるアミノ酸発酵研究の課題

これまで述べてきたように、高度なアミノ酸発酵菌株は多数の改変箇所を有しており、それらの検討のためには、単にそのアミノ酸の生合成経路の研究だけでなく、使用する菌株の生理・生化学全般の研究が重要である。このような広い分野の研究を一企業だけで実施するのは不可能であり、社外との共同研究が必要となる場合が多い。筆者らも日本の国公立大学を始めとして種々の公的機関との共同研究を実施してきたが、その際に気になった点について触れてみたい。

企業・大学間の共同研究では情報公開、アウトプットである知財の取扱いなどが問題となる場合が多いように思われる。産業化を目指した研究開発の場合は、特許出願はアウトプットの一つの目安である。特許は未発表の新奇性ある知見にのみ与えられるため、学生の卒業・修了・学位取得などの都合上、学術発表を優先させたい大学と、特許取得を目指す企業とで利害が対立する場合がある。近年は、大学でも特許出願を十分意識した上で外部発表する風潮ではあるが、権利範囲を拡大するための実施例の追加、国内出願を元にした海外出願実施などの場合、国内出願が終了した後もしばらくの間発表を控える必要のある場合もある。学会発表・論文投稿だけでなく、科研費の報告書に一行概略を記載して提出したところ、それがweb上に速やかに公開され、特許成立の妨げとなった例もある。特許とするよりノウハウとする方が良い知見の場合は、企業内研究の場合は発表自体が見送られるが、大学との共同研究の場合はそうもいかない場合も多い。

日本の大学は国内のみ特許を出願し、海外出願には興味を示さない場合も多いが、アミノ酸発酵のように生産現場・市場が主に海外に依存しているような場合はそれ

では不十分である。日本でのみ成立した特許とは、日本企業の研究開発のみに制約を課し、海外の競合会社には自由に使用可能な情報を与える発明ということである。

研究成果を共同出願の形で特許化し、実用化された場合は、その対価も課題となる。すでに産業として成立しているアミノ酸発酵の場合、その更なる効率化に向けて新たな技術のパーツをはめ込んでいくという形になることが多いが、その新たなパーツによるメリットの算出は非常に困難である。知財に対するロイヤリティー、あるいは不実施保証を求められた場合に論理的に適切な金額は算出できない場合が多い。

企業が大学を含む外部機関と共同研究を実施する場合は、通常共同研究契約を締結する。共同研究前に研究の範囲、知財権が発生した場合の対応などを想定して開始するわけではあるが、契約書の作成・締結には結構な時間と労力が割かれる。一方、プリミティブな因子を検討対象とすることが多い大学との共同研究では、その範囲・方向性が不確定な場合もある。先行きはよく判らないがちょっと試してみようといったところから意外な発見が生み出されることも多いが、きちんと共同研究契約を交わした上での研究開始は、小回りの利きにくい対応となりがちである。アミノ酸発酵はこれまで、産学連携の下で発展してきた技術である。本稿にて論じたような課題は存在するが、更なる産学連携のもと更に技術の高度化を図り、事業を通じて世界に貢献したいと思っている。

おわりに

近年、バイオリファイナリーが注目されている。再生可能な農林資源からさまざまな有用化学品を製造する技術のことであり、世界的に今後の発展が大きく期待される分野であるが、糖系原料を微生物によって更に有用な化学品であるアミノ酸に転換するアミノ酸発酵はバイオリファイナリーそのものといえる。アミノ酸発酵で培われた技術・概念は、他の有用化学品の生化学的な製造にも適用可能であろう。アミノ酸発酵の研究開発が、バイオリファイナリーによる物質生産全般につながっていくことを期待したい。

文 献

- 1) 中井勇太, 中西一夫: 公開特許広報 特開 2002-17363 (2000).
- 2) Imaizumi, A. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **117**, 111 (2005).
- 3) Nakamura, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4491 (2007).