

ゲノム情報がアミノ酸発酵にもたらしたもの

三橋 敏

アミノ酸発酵—ゲノム以前の50年—

1956年、協和発酵工業（現協和発酵キリン）の研究グループは、グルタミン酸要求性株によるバイオアッセイと、当時の最先端技術であるペーパークロマトグラフィーによる産物の分析とを用いた巧妙な手法によって、グルタミン酸を著量分泌する細菌 *Corynebacterium glutamicum* を発見した^{1,2)}。微生物を用いた発酵法によってアミノ酸を生産する画期的な技術はこうして始まった。その後、程なくして、この株のホモセリン要求株を、ホモセリンを制限した条件で培養すると、著量のリジンが培地中に蓄積することが見いだされた³⁾。一般に、微生物は代謝物を必要以上に生産することを防ぐための制御機構をもつ。これを変異によって遺伝的に解除することにより、代謝物を過剰に生産することが可能となる。代謝制御発酵とよばれるこの手法は、アミノ酸アナログ耐性変異株による手法へと発展し、さまざまな品目のアミノ酸生産へと応用されてきた。

これらの発見をもとに、商業製造の現場で使用するアミノ酸生産菌株を取得するために、ランダム変異導入と優良株選択による変異育種法が行われてきた。これは、ニトロソグアニジンなどの変異剤による処理で染色体上に無作為に突然変異を誘発した後、代謝アナログなどの薬剤に対する耐性を指標に高生産菌候補となる株を多数選抜し、その中からアミノ酸生産性の向上した株を培養評価によって取得する手法である。一般に、生産性のより高い株を得るためには、この変異・選抜サイクルによる育種が、何サイクルも繰り返される。この技術は今でも現役であり、こうして育種された変異株によって、数多くの品目のアミノ酸が商業製造されている。

ポストゲノム時代のアミノ酸生産菌育種

1990年代中期、微生物のゲノム解読が大腸菌⁴⁾などのモデル生物を材料として進められた。サイエンスの面のみに限らず、技術的なインパクトも期待されたことから、当社も *C. glutamicum* の全ゲノム決定を独自に行った⁵⁾。当時、この情報を具体的にどのようにアミノ酸生産菌育種に応用するか、社内で議論したことを思い出す。そのとき、筆者らが考えたのは、「生産に重要ないくつかの変異を明らかにして、それを野生株に集めれば、かなりの生産性の菌株ができるのではないか」というアイデアであった。ランダム変異を繰返す育種法では、生

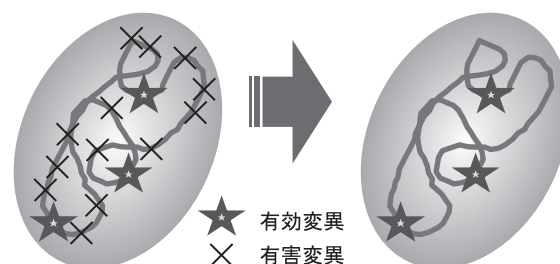
ランダム変異育種された
生産菌株野生株へ有効変異を
集積した再構築株

図1. ゲノム情報にもとづいて有効変異を同定し、野生株の染色体に集積する育種方法のコンセプト

産に有効な変異と同時に、それ以外の変異が染色体上に導入され、ストレス感受性などの原因となることが避けられない。これに対し、有害な変異を取り除くよりも、生産にとって有効な変異を集めるほうが現実的であると考えたのである（図1）。

まず、*C. glutamicum* 野生株からランダム変異育種が繰返されたリジン生産菌（B-6）を材料として、リジン生成に関わる経路上の遺伝子の変異点を同定した。その中からアスパルトキナーゼ遺伝子の変異（T311I）のみを野生株に導入した株（AK-1）は、ジャー培養評価において55 g/lのリジンを生産した。さらに、ホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子の変異（V59A）と、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の変異（P458S）とを付与した株（AHP-3）のリジン力価は80 g/lにまで向上した（図2）⁶⁾。

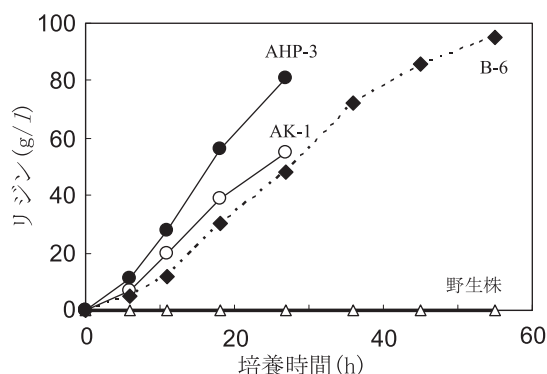


図2. 野生株に有効変異を再構築した株（AK-1, AHP-3）と、ランダム変異育種された株（B-6）のリジン生産の比較

*C. glutamicum*は旺盛な生育と糖消費能力をもつ微生物である。これを反映し、リジン生産に有効な、たった3つの変異を野生株に付与した株（AHP-3）は、旧来の株（B-6）に比べて、リジン生産速度が大幅に改善されていた（図2）。また、B-6のリジン生産温度（高くとも35℃）より高い40℃で発酵が成立し、同時に生産性が高まった⁷⁾。これにより製造の場で冷却コスト削減が期待できる。このように、ゲノムから発想した方法論により、アミノ酸生産菌の抜本的な改良が例示された。

ちなみに、この検討において、過去の育種サイクルで付与した薬剤耐性などの形質とは直接関連のない生産性向上変異が見つかることがあった。つまりあるサイクルで付与された薬剤耐性変異と同時に付与された変異が生産性向上に寄与していたということである。言うまでもなく、企業研究では生産性向上が最優先の目標である。長年にわたって何百何千という変異株の中から有望な生産株を繰り返し選択してきた地道な作業は、いわば生産性という選択圧で「進化」させているといえるかもしれない。当社には50年間以上にわたって選り抜かれた、さまざまな有用物質を生産する菌株が保存されている。これらの菌株が持つ変異点は、歴史のある企業にしかない財産といえよう。

31億塩基対のヒトゲノムの解析のために開発された塩基配列解析技術の最近の進歩はめざましい。これに伴う解析コストの急減な低下により、たかだか数百万塩基対程度のゲノムサイズの微生物の場合、「とりあえずゲノムを読んでみる」ということが可能となり、何らかの興味深い表現形質をもつ変異株の原因遺伝子を特定するために、その全ゲノムを決定してしまうことは、常套手段となっている。そのような情報から新たな観点の生産性向上機構が見いだされていくことであろう。

ジペプチド合成酵素遺伝子の発見

一方で、ゲノム情報は有用酵素のスクリーニングの手段ともなっている。たとえば、L-アミノ酸 α -リガーゼ発見の例が挙げられる。L-アミノ酸 α -リガーゼとは、2つのL-アミノ酸を修飾しないそのままの形で結合させ、ジペプチドを生成する酵素である（図3）。ジペプチドは単体アミノ酸にはない物理的性質や新たな機能をもつことから、アミノ酸以上の応用範囲が期待されている。当

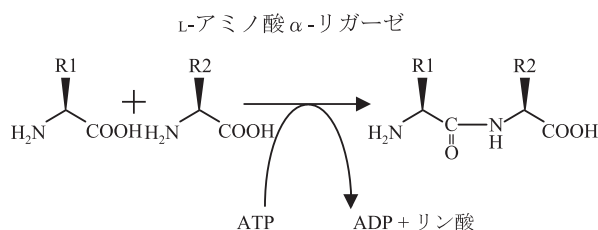


図3. L-アミノ酸 α -リガーゼによるジペプチドの生成

社の研究グループは、この酵素を活性によるスクリーニングではなく、配列情報だけに基づいてゲノム情報からピックアップすることに成功した⁸⁾。この酵素を用いることによって、当社は、ジペプチド「アラニルグルタミン」をグルコースから直接発酵によって生産できるプロセスを確立している⁹⁾。この生産プロセスは、これまでに蓄積されたアラニン発酵とグルタミン発酵の知見が生かされた発展型アミノ酸発酵ともいえよう。

“ポスト” ポストゲノム時代？

さて、筆者らは次にどのようなステップを踏み出せばよいだろうか。一生物分のDNA（ゲノム）を全合成して連結し、スーパー微生物を組み立てるべきだろうか。しかし、果たしてそれが可能なまで、筆者らは微生物を理解しているだろうか。残念ながら、その設計図を描ける段階には達していないといわざると得ない。なぜなら、実製造の場では、微生物のもつ未知の堅牢性（robustness）とか可塑性（plasticity）といった部分に頼っている面が、かなりあるはずだからである。アミノ酸を製造している発酵タンク内の環境は、決して均一で温和な「住み心地のよい」ものではない。たとえば、三階建のビル程もある発酵タンクの内部を想像してみしてほしい。最下部の発酵液には、かなりの水圧がかかる。個々の微生物は、その最下部と表層との間を攪拌される培地の循環によって、絶えず移動させられているのである。おそらく酸素濃度も均一ではないだろう。現場の生産菌はかなり過酷な条件での「労働」を強いられており、それでもなお、実用に耐える生産性を再現してくれているのである。筆者らが提案した育種の方法論は、野生株のそういった性質を最大限利用するという側面もある。

今後も、謙虚に微生物の声に耳を傾けなければならないと思う。そうすれば、彼らは、まだまだ多くのことを教えてくれるはずである。

文 献

- 1) 木下祝郎：発酵からニューバイオテクノロジーへ，p.7，バイオインダストリー協会（1988）。
- 2) 鶴高重三：発酵と工業，**41**，37（1988）。
- 3) Kinoshita, S. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 1957（1958）。
- 4) Blattner, F. R. et al.: *Science*, **277**, 5331（1997）。
- 5) Ikeda, M. and Nakagawa, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 99（2003）。
- 6) Ohnishi, J. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 217（2002）。
- 7) Ohnishi, J. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 69（2003）。
- 8) Tabata, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **187**, 5195（2005）。
- 9) Tabata, K. and Hashimoto, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6378（2007）。