

博士論文

光合成細菌変異株(*Rhodobacter sphaeroides*
CR-720)を用いた 5-アミノレブリン酸の
大量生産及びグリシンの代謝に関する研究

平成 27 年 3 月

広島国際学院大学大学院工学研究科

田中 享

学位論文 目次

第1章 緒論	3
1. 1 光合成細菌とは	4
1. 2 光合成細菌の排水処理及び農業分野への利用	4
1. 3 5-アミノレブリン酸(ALA)の農業、医療、健康への利用	5
1. 4 光合成細菌による ALA の生産及び ALA 生産における問題点	7
1. 5 本研究の目的	8
1. 6 参考文献	15
第2章 光合成細菌を用いたレブリン酸濃度, pH の最適化, 及び酸化還元電位の制御による ALA の大量生産	16
2. 1 緒言	17
2. 2 実験方法	18
2. 2. 1 供試菌株と培地	18
2. 2. 2 発酵槽による ALA 生産	18
2. 2. 3 ALA 合成酵素活性	19
2. 2. 4 分析方法	19
2. 3 実験結果	19
2. 3. 1 第7次変異株 (CR-720) の好気暗条件での ALA 生産能力	19
2. 3. 2 グリシン追添加による ALA 生産の増大	21
2. 3. 3 CR-720 株の ALA 生産に対する至適レブリン酸 (LA) 濃度	23
2. 3. 4 CR-720 株による ALA 生産に対する pH の影響	23
2. 3. 5 好気条件下での CR-720 株の ALA 合成酵素活性	24
2. 3. 6 CR-720 株の ALA 蓄積に対する酸化還元電位 (ORP) を指標とした酸素供給条件の設定	25
2. 3. 7 ORP を指標として設定した酸素供給条件による CR-720 株の ALA 生産量	29
2. 4 考察	29
2. 5 要約	30
2. 6 参考文献	31
第3章 光合成細菌変異株を用いた ALA 生産における副産物の生成と培養温度の制御による ALA の大量生産	33
3. 1 緒言	34
3. 2 実験方法	35

3. 2. 1	供試菌株と培地	3 5
3. 2. 2	発酵槽による ALA 生産	3 5
3. 2. 3	5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸(AHVA)の合成	3 6
3. 2. 4	AHVA 粗結晶の取得	3 6
3. 2. 5	分析方法	3 6
3. 3	実験結果	3 7
3. 3. 1	発酵での未知物質検出	3 7
3. 3. 2	未知物質の分析・同定	3 8
3. 3. 3	CR-720 株における AHVA 生成の温度依存性	4 0
3. 3. 4	ALA 生産における CR-720 株の培養温度条件の設定	4 1
3. 3. 5	5 kI 発酵槽を用いた 28°C 条件下での CR-720 株の ALA 生産濃度	4 3
3. 4	考察	4 5
3. 5	要約	4 6
3. 6	参考文献	4 6
第 4 章 安定同位体標識グリシンを用いた光合成細菌 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 変異株		
	CR-720 の 5-アミノレブリン酸生産におけるグリシン代謝解析	4 9
4. 1	緒言	5 0
4. 2	実験方法	5 1
4. 2. 1	供試菌株と培地	5 1
4. 2. 2	ALA 生産条件	5 1
4. 2. 3	ALA, アンモニア, コハク酸及びグリシンの分析	5 2
4. 2. 4	代謝物の誘導體化	5 2
4. 2. 5	誘導體化した代謝物の分析	5 2
4. 3	実験結果	5 3
4. 3. 1	ALA 生産時のアンモニア生成	5 3
4. 3. 2	安定同位体(¹³ C 及び ¹⁵ N)の代謝産物への移行	5 5
4. 3. 3	安定同位体(¹³ C 及び ¹⁵ N)の ALA への移行	5 7
4. 3. 4	安定同位体の代謝産物及び ALA への回収率	5 9
4. 4	考察	6 1
4. 5	要約	6 2
4. 6	参考文献	6 3
第 5 章 結言		
		6 5
主論文リスト		
		6 8
謝辞		
		6 9

第 1 章
緒 論

1. 1 光合成細菌とは

光合成細菌は30－35億年前に地上に出現したとされる原始的な原核生物で、太陽エネルギーを利用して生育する細菌で地球上に広く分布し、特に水田、溝、河川、湖沼、海岸、活性汚泥及び土壌中のいたるところに生育している。環境条件によって多面的な機能（炭酸固定、炭酸ガスの放出、窒素固定、脱窒作用、硫化物の酸化など）を発揮し、自然界における炭素、窒素、硫黄の循環に大きな役割を果たしている。このような生理的、生態学的機能を利用した光合成細菌による排水処理への応用や、菌体や菌体成分の利用についての真価が、約40年前より我が国をはじめとして多方面で理解されてきた¹⁾。

光合成細菌は、水圏微生物の一種である。水中の嫌気層に分布し、そこで酸素非発生型光合成(anoxygenic photosynthesis)を行って生育する。その意味で光合成細菌は、生理的に藻類や藍藻などとは大きく異なる¹⁻³⁾。

光合成細菌は、生理生態学的特徴から紅色非硫黄細菌、紅色硫黄細菌、緑色硫黄細菌及び滑走性糸状緑色硫黄細菌に分類される¹⁾。最近の遺伝子による分類では、シアノバクテリアやヘリオバクテリアも光合成細菌に分類されているが、生理的、応用的な役割を考え、本論文では旧分類で議論を進める³⁾。酸素非発生型光合成を行う微生物は細胞膜に光合成系がある²⁾。紅色細菌の中には細胞膜の内膜系に似た膜が発達することがある。こうした膜は細胞を破壊するときには小胞として単離されるので、クロマトフォアと呼ばれることがある²⁾。

微生物の特性として系統的に同一群に分類されていても、性質は個々の種、さらには株によって大きく異なることが知られる。光合成細菌の応用にあたっては最適の株を選択し、その性質を最大限利用することが重要となる。

光合成細菌の大きな特徴は、その実用的な広範な応用である。小林、北村らにより始められた応用研究は現在多くの応用が実用的に行われている。

1. 2 光合成細菌の排水処理、農業への応用

家庭排水や小規模の食品工場などから排出される有機物による河川や湖沼の富栄養化が問題となっている現状がある。通常、これらの有機物は活性汚泥法や接触酸化法処理により処置されているが、窒素やリンが残存するケースが多いとされている³⁾。河川などに有機物が排出された結果、窒素やリンによる富栄養化現象を引き起こしている例も多い³⁾。最近では国や多くの地方自治体で排水の窒素やリンに関する規制を設けており、有機物を含むこれらの排水処理においては窒素やリンと有機物との同時除去が課題となっている³⁾。

有機性排水の処理は小林ら⁴⁾、北村ら⁵⁾及び佐々木ら⁶⁾による研究において、食品工場や農業施設から排出される高濃度の有機性排水処理が、光合成細菌を用いて行われ、一部の施設では実用化されている³⁾。

光合成細菌は多種類の有機物（有機酸、糖質及び低級脂肪酸等）を早い速度で資化でき、増殖や保存性等にも優れ、菌体の安全性は極めて高く、高タンパクの微生物タンパク(SCP)源としてばかりでなく、ユビキノン(コエンザイムQ10)、ポルフィリンや5-アミノレブリン

酸(ALA)など医薬品などの原料を作り出す菌も含まれ、有用な菌も多い^{4,6)}。

排水処理においては佐々木ら³⁾により、多孔質セラミックに固定化した光合成細菌を用いた窒素、リン及び硫化水素の簡便で低コストの同時除去に関する研究に関する報告がされている。また、鯉の養殖に用いる水はアンモニアや亜硝酸などが含まれないよう管理されており、アルギン酸カルシウムに固定化した光合成細菌を用いた、養鯉水槽水の浄化と脱窒に関する研究が報告され実用化されている⁷⁾。

一方で、光合成細菌は農業にも利用されており、光合成細菌を水稲へ施用した試験では、処理区は対照区と比較して収量が増加したと報告されている(表 1)。この試験結果などに基づき「水稲への光合成細菌施用」は長野県農林研究財団から長野県の普及技術として認められている⁸⁾。また、光合成細菌を利用して食味値が高いササニシキを 10 a あたり 1 トン以上を安定して収穫している農家の例もある⁸⁾。また、野菜栽培や作物栽培及び養豚への応用など過去 40 年間、光合成細菌の農業への利用は多い⁹⁾。

表 1 光合成細菌の水稲への使用効果(収量調査結果: kg/a) (長野県北安曇農業改良普及センター)⁸⁾

	全重	わら重	もみ重	粗玄米重	粗玄米重指数
移植時苗箱処理+ 本田処理	151	49.9	96.1	77.2	115
移植時苗箱処理	151	50.7	98.2	78.6	117
対照区	134	48.1	84.3	66.9	100

光合成細菌にはビタミン、色素及びアミノ酸を豊富に含み、それらの成分は作物の成育時に植物体内に直接取り込まれるものと考えられている⁸⁾。

1. 3 5-アミノレブリン酸(ALA)の農業、医療、健康への利用

光合成細菌の実用例で近年特に注目されるのが ALA の生産利用である。

ALA は、テトラピロール化合物の共通前駆体として生物に内在するケトアミノ酸で動物では C4 経路によりグリシンとスクシニル CoA の縮合で合成され、植物では C5 経路によりグルタミン酸から 3 段階の酵素により合成されることが知られている¹⁰⁾。

C4 経路いわゆる Shemin pathway¹¹⁾においては、スクシニル CoA はトリカルボン酸(TCA)回路を通じてグルコースから供給される。いくつかの微生物では、スクシニル CoA がメチルマロニル CoA 経路によりプロピオニル CoA から合成される。これが光合成細菌の主な ALA の生合成経路と考えられている¹⁰⁾。

ALA は農業分野において、生分解性の農薬としての応用研究が Rebeiz らによって行われた¹²⁾。ALA は毒性がなく、生分解性が高いことからパラコート等に替わる安全な農薬として着目されてきた。

Rebeiz らは、高濃度の ALA が与えられた植物ではクロロフィル生合成で過剰量のプロトポルフィリンIX(PPIX)が合成される、光動力学的農薬としての ALA 反応メカニズムを提唱した¹²⁻¹³⁾。これらの植物に光を照射すると、過剰な PPIXが活性酸素を生じ、細胞表面の不飽和脂肪酸が酸化され植物が損傷を受けるとされる。Rebeiz らは同様のメカニズムで ALA の *Trichopusia ni* に対する殺虫効果を報告している¹³⁾。

田中らは低濃度での ALA 投与が植物のクロロフィルを増加させ、成長が促進することを稲の苗などで発見した¹⁴⁾。葉、土及び根に ALA を与えることで穀物の収率は 121-163%程度に改善された¹⁵⁾。この効果はジャガイモやニンニクのような根菜類で特に顕著であった。

廿日大根では ALA の投与によって光合成活性と CO₂ 吸収が増大した。また同時に、暗呼吸に伴う CO₂ 生成が暗条件下では ALA 投与によって抑制されることが報告されている¹⁵⁻¹⁶⁾。ALA による光合成能（光合成系 I 及び II）を増大する効果が *Spirulina plantensis* でも観察されている¹⁷⁾。

世界中で、土壌中の塩濃度上昇によって農耕地が広い範囲で失われている現状がある。ALA は綿の耐塩性を向上させることが報告されており¹⁶⁻¹⁸⁾、耐塩性の植物を増やすことによる環境修復への応用が期待できる。

さらに、ALA を 0.1–1.0 mg/l で 5°C の温度条件下のもと稲に与えたとき、ALA を添加しない対照区と比較して 40~50% 生存率が上昇したこと等、耐塩性ばかりではなく、耐冷性や耐ストレス性も増加したことが報告されている¹⁶⁾。

ALA は医療分野においては、鉛中毒等、重金属障害の患者の尿中に ALA が高濃度に排出されることが古くから知られていた¹⁹⁾。ALA 脱水酵素(ALAD)が重金属によって阻害され、そこで ALA が蓄積される。ALA の検出が重金属中毒の早期発見の上で重要となっていた。

一方で Kennedy らによってがん患者に対して ALA を用いた光動力学的治療(PDT)について報告された²⁰⁾。Kennedy らは ALA を含有したクリームを皮膚がん塗布し、数時間の光照射を実施した。ALA 投与後 3-4 時間後、光照射することで PPIX から一重項酸素が生成し、がんを死滅させる機構による。このメカニズムは植物による除草の機構¹²⁾と同様である。

金子らは ALA を用いた悪性神経膠腫の術中診断(PDD)について報告している²¹⁾。悪性神経膠腫の細胞は紫～青の光(395-415nm)を用いた赤の蛍光によって検出し、手術を行う。正常細胞には PPIX は検出されないが、悪性神経膠腫の細胞では PPIX が主に生成される(Fig. 1)。

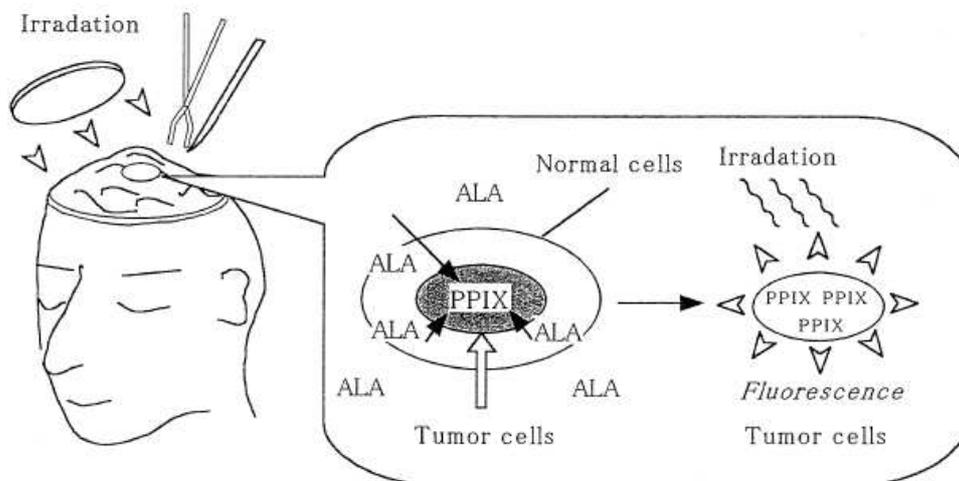


Fig. 1 Photodynamic diagnosis of glioma (brain tumor) during surgery. Accumulated PPIX (protoporphyrin IX) from ALA intumor cells becomes fluorescent under violet-blue light irradiation, thereby simplifying the distinction between glioma cells and normal brain cells. (文献²¹⁾に基づき佐々木らが作成²⁰⁾)

最近では, ALA と Fe^{2+} との組み合わせにより, 糖尿病予防に関する臨床データが報告されており予防に関する効果も見出されている²²⁾.

また, ALA と Fe^{2+} を用いた抗マラリア薬への利用の可能性が報告されており, ALA の医薬分野での用途開発が進んでいる²³⁾.

1. 4 光合成細菌による ALA の生産及び ALA 生産における問題点

光合成細菌による ALA 生産が, 既に我々の技術開発において実用化され広く販売されているが, ALA の大量生産においては問題も存在している. Fig. 2 に示す通り, 生体内において ALA は, ポルフォビリノーゲンを經由するポルフィリン, ビタミン B_{12} , 及びクロロフィルのようなテトラピロール化合物の唯一の前駆体であり, テトラピロールの生合成系における重要な中間体である²⁴⁾. ALA の生合成は, Fig. 2 にまとめたように2つの異なる経路で進行する: (1) スクシニル CoA とグリシンから合成される経路(Shemin pathway, C-4 pathway), (2) グルタメートから合成される経路(C-5 pathway).

ALA 合成酵素(ALAS)は, テトラピロール化合物の生合成における律速酵素であり, 本酵素の合成は ALA 合成酵素遺伝子である *hem A* もしくは *hem T* のフィードバック調節により厳密に制御されている²⁴⁾.

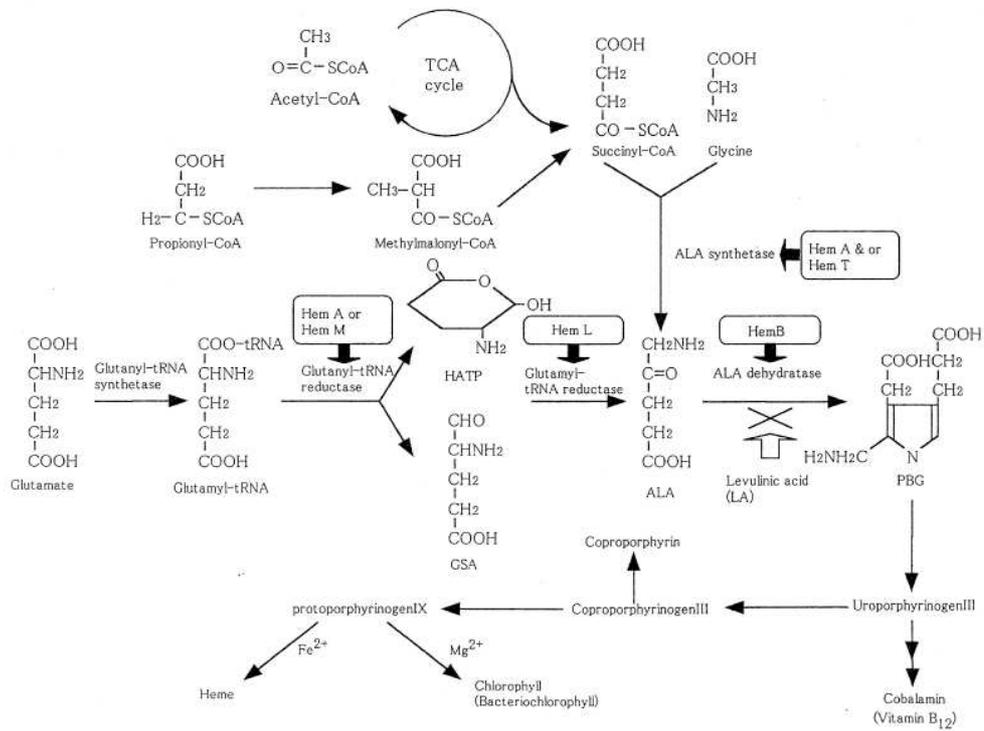


Fig. 2 Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA) and tetrapyrrole compounds such as porphyrin, vitamin B₁₂ and chlorophyll. GSA, Glutamate-1-semialdehyde; HATP, hydroxyaminotetraphydropyranone; PBG, porphobilinogen.²⁴⁾

光合成細菌はテトラピロールを合成できるが、菌体外への ALA 生産のためにレブリン酸のような ALA dehydratase (ALAD) 阻害剤を用いても 1990 年までは ALA の生合成量は非常に低いレベルであった(Table 2)²⁴⁾.

Table 2 Production of 5-aminolevulinic acid (ALA) by different groups of microorganism²⁴⁾.

Group	C and N source	ALA (μ M)	References
Anoxygenic photosynthetic bacteria			
<i>Chlorobium limicola</i>	glutamate	3.95	Andersen et al. (1983)
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	glutamate	0.58	Andersen et al. (1983)
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	succinate & glycine	0.75	Andersen et al. (1983)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	succinate & glycine	2000	Sasaki et al. (1987)
<i>R. sphaeroides</i>	acetic, propionic & butyric acid & glycine	4200	Sasaki et al. (1990)
<i>R. sphaeroides</i>	succinate & glycine	16000	Sasaki et al. (1998)
<i>R. sphaeroides</i>	succinate & glycine	160	Ishii et al. (1990)
<i>R. sphaeroides</i> CR520	glucose & glycine	14300	Watanabe et al. (1996)
<i>R. sphaeroides</i> CR720	glucose & glycine	27500	Kamiyama et al. (2000)
<i>Rhodovulum</i> sp.	glutamate & glycine	2000	Noparatnaraporn et al. (2000)
Oxygenic photosynthetic bacteria			
<i>Anacystis nidulans</i>	glutamate	0.38	Andersen et al. (1983)
<i>Anabaena variabilis</i>	glutamate	0.019	Avissar (1980)
Algae			
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	glutamate	0.225	Kipe-Nolt (1980)
<i>Cyanidium caldarium</i>	glutamate	0.483	Jugenson et al. (1976)
<i>Chlorella vulgaris</i>	CO ₂	1400	Beale (1970)
<i>Chlorella</i> sp.	glucose & glycine	2000	Sasaki et al. (1995b)
<i>Chlorella regularis</i>	glucose & glycine	3700	Ano et al. (1999)
Aerobes			
<i>Pseudomonas riboflavina</i>	L-alanine	200	Ree et al. (1987)
<i>Propionibacterium shermanii</i>	succinate & glutamate	40	Menon & Shemin (1967)
<i>Escherichia coli</i>	succinate & glycine	2250	Mariet et al. (1996)
<i>E. coli</i>	succinate & glycine	20000	Choi et al. (1999)
Anaerobes			
<i>Clostridium thermoaceticum</i>	glucose & L-cystein	155	Koesnandar et al. (1989)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	methanol & 2-oxoglutamate	0.40	Lin et al. (1989)
<i>Metanobacterium thermoautotrophicum</i>	H ₂ & CO ₂	0.20	Lin et al. (1989)

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の培養液に逐次的にレブリン酸を加えることにより、嫌気明条件下(照度 5 klux)で著量の ALA を菌体外に生産したことが佐々木らによって報告された(約 4 mM)²⁴⁾。嫌気明条件下での ALA 生産ではプロピオン酸が他の有機酸に対して優先的に資化されていた²⁵⁾。*R. sphaeroides* は主にメチルマロニル CoA からスクシニル CoA を合成する。この反応は Shemin pathway においてビタミン B₁₂ がメチルマロニル CoA ムターゼの顕著な補助因子とされる。レブリン酸の添加によって *R. sphaeroides* による ALA の生成は実用レベルとなる 16 mM にまで達した¹⁵⁾。

しかしながら、光合成細菌による ALA 生産において不利な点は、培養に光照射が必要となることであった。特殊な発酵槽が必要で、大量に生産するためには光照射のためのコストも必要となり、一般的な通気攪拌槽と比較して高価となる。そこで、好気暗条件下でも ALA を生産可能な *R. sphaeroides* の変異株が Nishikawa らによって開発された²⁶⁾。1998 年に好気暗条件下での培養方法による ALA の工業生産方法が確立された²⁷⁾。

好気条件下では菌体生育 (ATP 生成) が優先され、ALA 合成酵素 (ALAS) は酸素により不活性化されることにより ALA 生産には強く影響をうける。そこで、我々は生育には好気条件を ALA 生産には微好気条件を培養条件に適用した。典型的な微好気条件下での ALA 生産パターンを Fig. 3 に示す。*R. sphaeroides* 変異株 CR-520 を用いて、好気条件下 (溶存酸素濃度 (DO)>1 mg/l) で生育させ、通気条件と攪拌速度を変更することで酸化還元電位 (ORP) を制御し微好気条件に移行した。CR-520 株は 96 時間培養後、ALA を 12 mM 生産した。ORP の制御(平均 17 mV)によって ALA 生産の最大値は 14.3 mM に達した。しかしながら通常の空気を使用した通気条件下では、ALA 生産量は低かった。菌体生育及び呼吸を抑制するためには -31 mV 未満の低い ORP での制御が必要で、エネルギー供給の制限により ALA の生産が抑制されたものと考察した。

最近では遺伝子組換え微生物を用いた ALA 生産研究が海外でも盛んに行われており、*R. sphaeroides*, *Bradyrhizobium japonica* 及び *Agrobacterium radiobactor* の ALA 合成酵素遺伝子 (*hemA*) を導入した *Escherichia coli* による ALA 生産に関する研究が行われており²⁹⁻³²⁾、溶存酸素濃度の制御を加えた培養条件下において、最大で 72 mM の生産が報告されている³³⁾。

一方、ALA は化学的にも合成可能である。竹矢らによって実用に近い 6 つの化学合成法について報告されている³⁴⁾。Fig. 4 に示すように ALA は (A) レブリン酸、(B) 2-ヒドロキシピリジン、(C) フルフラール、(D) フルフリルアミン、(E) テトラヒドロフルフリルアミン、(F) コハク酸から合成できる。この中でフルフリルアミン(D)による光酸化による方法が最も実用化に近いと考えられるが、ALA の化学合成は、まだ多段階での反応を要し収率も低いため、生物学的な生産と比較して、現在でもまだコスト競争力はないと考えられる³⁵⁾。

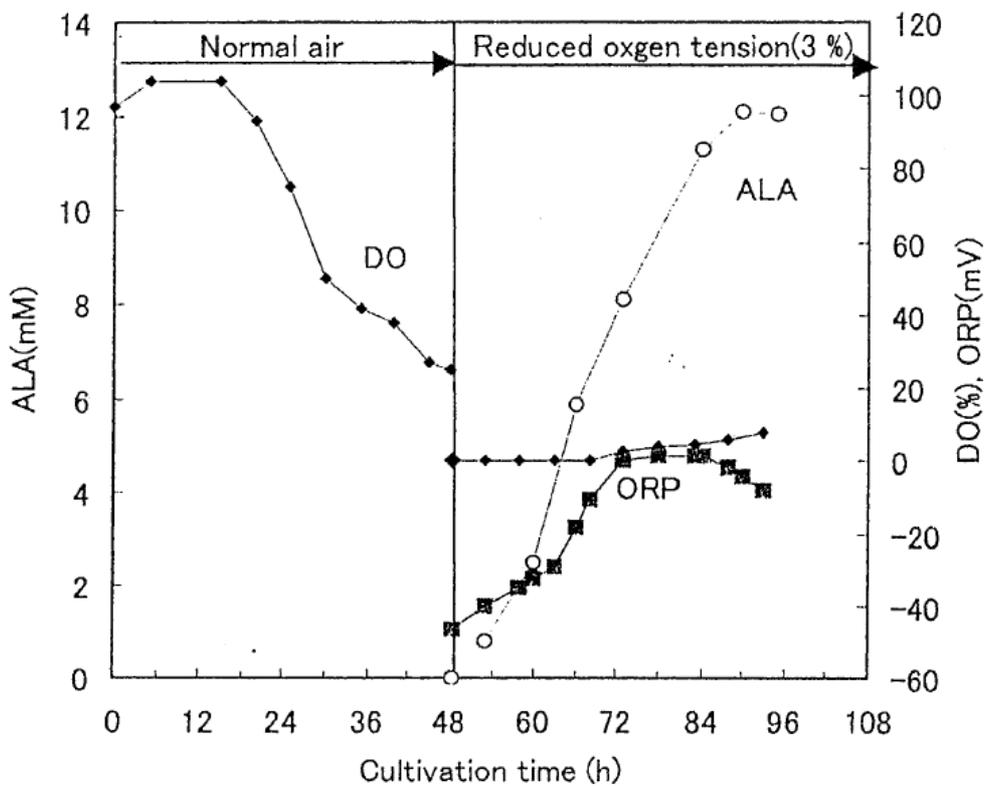


Fig. 3 5-aminolevulinic acid production by a mutant of *R. sphaeroides* CR-520 under dark and aerobic-microaerobic conditions. GGY2 medium (glucose is a main carbon source) was used. At 48 h, 60 mM of glycine and 5 mM of levulinic acid were added. Oxygen tension of the supplied gas was reduced to 3%.²⁸⁾

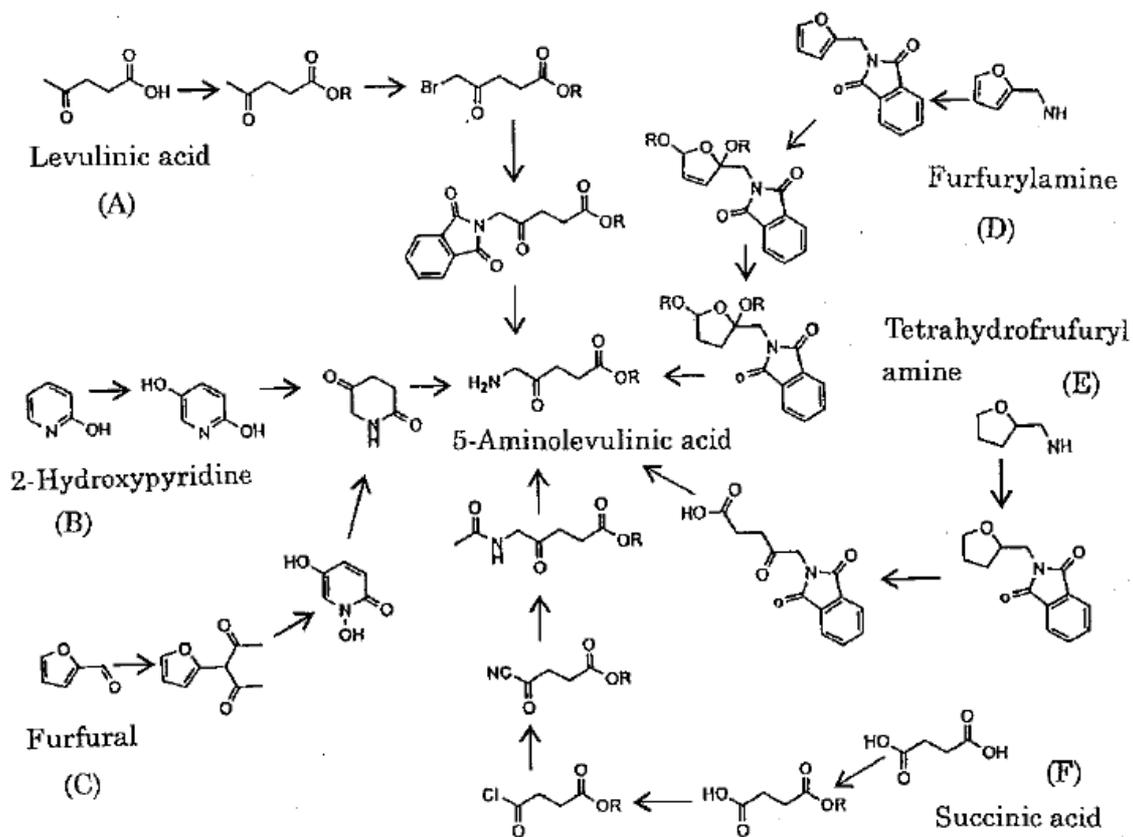


Fig. 4 A-F Chemical synthesis of ALA from various industrial materials. ²⁴⁾

1. 5 本研究の目的

ALA の工業的生産法の改良を目指し、グリシンなどの添加技術, ORP 制御, ならびにグリシンの代謝を検討し, さらなる ALA 生産の安定化および低コスト生産を目指した.

遺伝子組換え *E. coli* を用いた ALA 生産研究により, pH を 6.5 に調節することで ALA 生産が上昇することが報告されている³¹⁾. *R. sphaeroides* の ALAS に対する至適 pH 範囲は 7.8 ~8.0 との報告がある³⁶⁾. 酸化還元電位と ALA 生産の関係については CR-520 株で報告されている²⁴⁾. しかしながら, 発酵槽を用いた ALA 生産 に対するレブリン酸濃度, pH および酸化還元電位の至適値を検討した報告はこれまでにない. 本報では CR-720 株を用いた発酵槽での ALA 生産について, レブリン酸添加, pH および酸化還元電位の至適条件の検討を行い, さらなる高生産を目指した.

R. sphaeroides を用いた ALA 生産における培養温度は, CR-720 株の親株である CR-520 株及び CR-606 株を用いて 2 l 発酵槽により 30°C で実施された²⁷⁾, CR-720 株は, 生育の至適温度が 32°C である一方で, ALA 生産においては 27°C 以上の培養温度では培養温度の上昇に伴って未知の副産物の生成が増加する傾向が認められ, ALA 生産量も 32°C 以上の培養温度では減少する傾向が試験管による実験で認められた. 本報では, *R. sphaeroides* 変異株 CR-720 株による ALA 生産時における副産物の構造を決定し, 副産物の生成抑制条件として培養温度を検討した. さらに, CR-720 株を用い実製造設備(5 kl 発酵槽)により ALA 生産のさらなる増大を試みた.

R. sphaeroides では C-4 経路が ALA 生合成の主経路とされる³⁷⁾. しかし, CR-720 については ALA 生合成経路やグリシンの代謝経路はほとんど検討されていない. 今回は, グリシンの代謝に焦点を当て, 安定同位体標識グリシン(グリシン-2-¹³C 及びグリシン-¹⁵N)を添加して, ALA 生産時の安定同位体 ¹³C 及び ¹⁵N の移行について GC/MS 分析によって検討した.

本論文は 5 章から成る. 第 1 章においては, 光合成細菌の応用, ALA の農業・医薬分野への応用, ならびに光合成細菌による ALA 生産研究を取り巻く ALA 生産に関する研究を総説した.

第 2 章においては, レブリン酸の添加条件を検討し, さらに pH 及び酸素供給条件を検討した結果を纏めた.

第 3 章においては, CR-720 株による ALA 生産と併行して増加する未知不純物を見出しそして同定し, 未知不純物の低減条件を検討した. さらに 5 kl 発酵槽で ALA 生産を行った結果を纏めた.

第 4 章においては, CR-720 株での試験管での ALA 生産試験でその原料として安定同位体標識したグリシンを使用し, 安定同位体の他の化合物への移行を GC/MS 分析によって調べグリシンの代謝に関する検討を行った結果を纏めた.

さらに, 本研究成果に基づき, ALA のさらなる生産力価の向上に向けた考察を行った.

1. 6 参考文献

- 1) 北村 博, 森田茂廣, 山下仁平: 光合成細菌, 北村 博, 森田茂廣, 山下仁平編, iii, 学会出版センター(1984).
- 2) 三室 守, 土屋 徹: 光合成微生物の機能と応用, pp14-15, シーエムシー出版(2006).
- 3) 矢口美恵子, 川口博子, 佐々木健: 光合成細菌によるバイオコンバージョン, pp147-195, 地人書館(2001).
- 4) Kobayashi, M., Kurata, S.: *Process Biochem.*, **13**, 27-30(1978)
- 5) 北村 博, 黒澤慶二, 小林正泰: 光合成細菌, 北村 博, 森田茂廣, 山下仁平編, 113-121 学会出版センター(1984).
- 6) Sasaki, K., Naparatnaraporn, N., Nagai, S.: Bioconversion of waste materials to industrial products, Martin, A. M. eds., 223-226, Elsevier Applied Science Publishers(1991).
- 7) 永富 寿, 竹野健次, 渡辺昌規, 佐々木健, ハン-チュ ヤン: 水環境学会誌, **24**, 64-68(2001).
- 8) 牧 孝昭: 生物工学会誌, **89**, 113-116(2011).
- 9) 農山漁村文化協会編: 現代農業別冊 農家が教える光合成細菌とことん活用読本, pp10-154, 農山漁村文化協会(2006).
- 10) Sasikara, Ch., Ramana, Ch. V., and Rao, P. R.: *Biotechnol. Prog.*, **10**, 451-459(1994).
- 11) Shemin, D., Russell, C. S., and Adamsky, T.: *J. Biol. Chem.*, **215**, 613-626(1995).
- 12) Rebeiz, C.A., Juvik, J. A., Montazer-Zouhool, A., Hopen, H., and Wu, S. M.: *Enzyme Miclob. Technol.*, **6**, 390-401(1984).
- 13) Rebeiz, C. A., Juvik, J. A., and Rebeiz, C. C.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, **30**, 11-27(1988).
- 14) Tanaka, T., Takahashi, K., Hotta, Y., Takeuchi, Y., and Konnai, M.: Proceeding of the 19th annual meeting of plant growth regulator Society of America, San Francisco. Plant Growth Regulator Society of America, Washington DC, pp237-241(1992).
- 15) Sasaki, K., Tanaka, T., Nagai, S.: Bioconversion of waste materials to industrial products, second edition. Martin, A. M., eds., Blackie Academic and Professional, 247-291(1998).
- 16) 堀田康司, 渡辺圭太郎: 植物の化学調節, **34**, 85-96(1999).
- 17) Sasaki, K., Marques, F., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 453-457(1995).
- 18) Kuramochi, H., Konnai, M., Tanaka, T., and Hotta, Y.: US Patent, 5661111(1997).
- 19) 佐々 茂; 血液 尿化学検査 免疫学的検査 第3版, pp690-697(1989).
- 20) Kennedy, J. C., Pottier, R. H., Pross, D. C.: *J. Photochem. Photobiol.*, **6**, 143-148(1990).
- 21) Kaneko, S., Aoki, T., Nanato, H., Miyoshi, N., Houki, S., Fukuda, Y.: *Iwamizawa-siritu Sougou Byoin-shi*, **24**, 71-79(1998).
- 22) Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Tanaka, T., and Sugiyama, M.: *Nutrition*, **29**, 1030-1036(2013).
- 23) Komatsuya, K., Hata, M., Balogun, E. O., Hirosaka, K., Suzuki, S., Takahashi, K., Tanaka, T.,

- Nakajima, M., Ogura, S., Sato, S., and Kita, K.: *J. Biochem.*, **154**, 501-504(2013).
- 24) Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., and Tanaka, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23-29(2002).
- 25) Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y., and Hayashi, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 727-731(1990).
- 26) Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 798-804(1999).
- 27) 上山宏輝, 堀田康司, 田中 徹, 西川誠司, 佐々木健: 生物工学会誌, **78**, 48-55(2000).
- 28) 渡辺圭太郎, 西川誠司, 田中 徹, 堀田康司: 日本公開特許公報, 特開平 8-168391(1996).
- 29) Choi, H. -P., Lee, Y. -M., Yun, C. -W., and Sung, H. -C.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 1136-1140 (2008).
- 30) Fu, W., Lin, J., and Cen, P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 777-782(2007).
- 31) Qin, G., Lin, J., Liu, X., and Cen, P.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 316-322(2006).
- 32) Kang, Z., Wang, Y., Gu, P., Wang, Q., Qi, Q.: *Metabol. Eng.*, **13**, 492-498(2011).
- 33) Yang J., Zhu, L., Fu, W., Lin, Y., Lin, J., and Cen, P.: *Chinese J. Chem. Eng.*, **21**, 1291-1295(2013).
- 34) 竹矢晴彦, 田中 徹, 堀田康司, 佐々木健: ポルフィリン, **6**, 127-135(1997).
- 35) Miyachi, N., Tanaka, T., Nishikawa, S., Takeya, H., and Hotta, Y.: Porphyrins, **7**, 342-347(1998).
- 36) Burnham, B. F. and Laccelles, J.: *Biochem. J.*, **87**, 462-472 (1963).
- 37) Yubisui, T., and Yoneyama, Y.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 77-85(1972).

第 2 章

光合成細菌変異株を用いたレブリン酸濃度, pH の最適化, および酸化還元電位の制御による 5-アミノレブリン酸の大量生産

2. 1 緒言

5-アミノレブリン酸 (ALA) は、ポルフィリン、ヘム、ビタミン B₁₂ など、ポルフィリン誘導体生合成における最初の間体として知られ、植物、動物、ヒトに広く分布している。チトクロムやヘモグロビンもすべて ALA を 経て合成され、すべて生理的にも重要な物質である。ALA 生合成は、グリシンとスクシニル-CoA から ALA 合成酵素 (ALAS) を 経て生成される、いわゆる Shemin 経路 (C-4 経路) と、グルタミン酸から生成される C-5 経路で主に行われる¹⁾。ALA 脱水酵素 (ALAD) により、2 分子の ALA が脱水縮合され、ピロール化合物であるポルフォビリノーゲン (PBG) を生成する。1950 年代に精力的に行われたポルフィリン誘導体生合成研究を通じて、細菌、動物、植物においてその最終産物であるポルフィリン誘導体の存在量に比べて、遊離の ALA や PBG の存在量がきわめて少量であることが指摘され²⁾、多くの場合 ALA 合成がポルフィリン誘導体生合成における律速段階であることが知られている。1984 年、Rebeiz らによって ALA は低毒性除草剤として応用できることが報告された³⁾。現在は、除草剤としてよりはむしろ耐塩性や植物生長促進の効果が報告され、農業分野での用途開発が進んでいる⁴⁻¹⁰⁾。さらに、がん治療薬、腫瘍診断薬としての医用分野での用途が最近注目されている¹⁰⁾。ALA の生産については化学合成法が報告されている¹⁰⁾。

しかし、その収率は低く、現在でも一部しか実用化されていない、1970~1985 年までの微生物による ALA 生産研究では、光合成細菌、嫌気性菌、藻類などでほとんどが ALAD の競争阻害剤であるレブリン酸 (LA) を培地に添加することで ALA 菌体外生産が認められているが、いずれも ALA 生産量は低い¹⁰⁾。最近では、*Rhodobactor sphaeroides*, *Bradyrhizobium japonicum* および *Agrobacterium radiobactor* の ALA 合成酵素遺伝子 (*hem A*) を導入した *Escherichia coli* の遺伝子変異株による発酵槽を用いた ALA 生産に関する研究が行われており¹¹⁻¹⁵⁾、最大で 39.3 mM の生産が報告されている¹¹⁾。一方、光合成細菌は光従属栄養による増殖ばかりでなく、好気暗条件下でも呼吸により増殖できる。ALA の実用的大量生産には好気暗条件がコスト的に優れているので、著者らは好気暗条件下でも ALA 生産が可能な菌の開発を進めた。すでに報告した通り、第 5 次変異株 (CR-520) および第 6 次変異株 (CR-606) の ALA 生産量を増大させるためには通気および攪拌速度の調節が特に効果的であった。通常に通気条件下での CR-606 株の ALA 生産量は、前駆体であるグリシン、ALAD の競争阻害剤である LA および酵母エキスを添加後 18 時間で 20 mM だった¹⁶⁾。さらなる高生産を考えて変異源処理を行い、試験管による培養で 27.5 mM 生産することができる CR-720 株を得た¹⁷⁾。光合成細菌による LA 添加濃度の検討は、IFO12203 株、CR-17 株および CR-286 株に関して報告されている^{18,19)}。好気条件下での培養により CR-520 株の ALAD の活性は、その親株である CR-450 株のおよそ 1/2 に低下しており、CR-606 株はその親株とほぼ同程度の活性であった。試験管での培養条件下では CR-520 株、CR-606 株および CR-720 株の最大 ALA 蓄積量に対する至適 LA 濃度は 5 mM と報告されている¹⁷⁾。

一方、遺伝子組換え *E. coli* を用いた ALA 生産研究により、pH を 6.5 に調節することで ALA 生産が上がるということが報告されている¹¹⁾。*R. sphaeroides* の ALA 合成酵素活性に対する至適

pH 範囲は 7.8~8.0 との報告がある²⁰⁾。酸化還元電位と ALA 生産の関係については CR-520 株で報告されている¹⁰⁾。しかしながら、発酵槽を用いた ALA 生産に対する LA 濃度, pH および酸化還元電位の至適値を検討した報告はこれまでにない。本報では CR-720 株を用いた発酵槽での ALA 生産について, LA 添加, pH および酸化還元電位の至適条件の検討を行い, さらなる高生産を目指した。

2. 2 実験方法

2. 2. 1 供試菌株と培地

R. sphaeroides CR-520, CR-606, CR-649 および CR-720 株は, 著者らの実験室保有のものを使用した¹⁷⁾。培地はグルタメート-グルコース培地 (GGY2)¹⁶⁾ および改変培地 (2 × GGY2 および TT2) を使用した。121°C, 20 分, 高圧蒸気滅菌した後, 最終濃度が 50 mM となるよう別に滅菌した 2 M グルコースを加えた。2 × GGY2 培地の組成は, グルコースの最終濃度を 200 mM とした以外は, すべて GGY2 培地成分の 2 倍量とした。培地はオートクレーブする前に 5 N-NaOH を用いて pH 6.8 に調整した。TT2 培地の組成は, 酵母エキスを工業用酵母エキス (オリエンタル酵母工業社, 東京), 3 g; NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.2 g; Na₂HPO₄ · 12H₂O 4.37 g; 無水 FeCl₃, 3.24 mg とした以外は, 2 × GGY2 培地と同様の組成とした。菌株は, 攪拌条件下 32°C で培養を行った (21 mmφ 試験管では振幅幅 5 cm で 250 rpm, 仕込量 10 ml, 32°C で培養, 500 ml 容坂口フラスコでは, 振幅幅 50 mm で 100 rpm, 仕込量 100 ml, 32°C で培養, 300 ml 容バツフル付三角フラスコでは, 回転半径 35 mm で 120 rpm, 仕込量 30 ml, 32°C で培養)。

2. 2. 2 発酵槽による ALA 生産

種培養は, 10 ml の GGY2 培地または 2 × GGY2 培地を含む 21 mmφ 試験管を用いて 48 時間行った。次いで, 200 ml の GGY2 培地または 2 × GGY2 培地を含む坂口フラスコに対し試験管による培養液を 2% (v/v) 植菌し, 48 時間, 前培養を行った。GGY2 培地を用いて本培養を行う場合, 1 l の培地を含む 2 l 発酵槽 CTB-33 (TAITEC 社, 東京) に前培養液を 10% (v/v) 植菌した。培養は通気速度 0.2 vvm, 攪拌速度 300 rpm, 32°C で行った。24 時間培養後, グリシン, LA, グルコースおよび酵母エキスを培養液に加えた。pH は 1N-NaOH および 1N-硫酸を用いて, 6.3~6.9 の間に調整した。2 × GGY2 または TT2 培地を用いて本培養を行う場合, 1.8 l の培地を含む溶存酸素電極 (TOA-DKK 社, 東京), 酸化還元電位電極および pH 電極 (メトラー・トレド社, Swiss) を装着した 3 l 発酵槽 (MDL-300, 丸菱バイオエンジニアリング社, 東京) に前培養液を 10% (v/v) 植菌した。培養は通気速度 0.2 vvm, 攪拌速度 180 から 400 rpm, 32°C で行った。

2. 2. 3 ALA 合成酵素活性

培養は、溶存酸素電極 (TOADKK 社, 東京) を装着した 1.8 l の 2 × GGY2 培地を含む 3 l 発酵槽を用いた。菌体は 5000 × g, 20 分の遠心分離により集菌し、リン酸カリウム緩衝液 (50 mM, pH 7.5) を用いて 2 回洗浄した。菌体は、同様の緩衝液を用いて菌体を $3\sim 5 \times 10^9$ 個/ml に再懸濁した後、電動式フレンチプレス (大岳製作所社, 東京) を用い、150 MPa, 4°C 条件下で菌体を破碎した。破碎した菌体の懸濁液は、15,000 × g, 20 分, 2 回遠心分離を行った。その上清液を粗酵素液とした。粗酵素液のタンパク濃度はプロテインアッセイキット (バイオラッド社, USA) を用いて分析した。ALA 合成酵素の測定は、Yubisui らの方法に従って実施した²¹⁾。

2. 2. 4 分析方法

培養液中の ALA 濃度は、岡山らの方法に従い蛍光分析法により分析を行った²²⁾。分析条件詳細は前報の通りとした¹⁶⁾。菌体濃度は、分光光度計 UV1600 (島津製作所社, 京都) を用いて 660 nm の濁度によって分析した。培養液中のグリシン濃度は、LC-10A システムおよび蛍光検出器 RF10A (島津製作所社, 京都) により、オルトフタルアルデヒドを用いたポストカラム-HPLC 分析法によって分析した²³⁾。グルコース濃度は酵素電極分析計 (AS-210, 旭化成社, 東京) を用いて分析した。

2. 3 実験結果

2. 3. 1 第 7 次変異株 (CR-720) の好気暗条件での ALA 生産能力

Fig. 1 に変異株 CR-520, CR-606 および CR-720 の ALA 生産および菌体濃度の挙動を示す。CR-606 株を親株として変異を行い、低濃度グリシン添加 (10 mM) でも ALA を生産し、さらに 60 mM グリシン存在下でも ALA を高生産する菌株として選抜した第 7 次変異株 (CR-720) の ALA 生産量は、CR-606 株を上回っていた。CR-720 株の ALA 生産量は前駆体であるグリシン、ALAD 阻害剤である LA, および酵母エキスを添加後 24 時間で 22 mM, また生産速度は 0.92 mM/h であった (Fig. 1A)。このとき、CR-520 株および CR-606 株の ALA 生産量はそれぞれ 18 時間で 3.9 mM, 24 時間で 16 mM であった。また CR-606 株の ALA 生産速度は 0.67 mM/h であった。グリシン, LA, および酵母エキス添加後、CR-720 株の菌体濃度 (OD_{660nm}) は、0 時間で 3.4, 30 時間で 7.1 であった。一方、CR-520 株および CR-606 株の菌体濃度 (OD_{660nm}) は、0 時間で 5.1 および 6.6, 30 時間で 16 および 14 であった (Fig. 1B)。

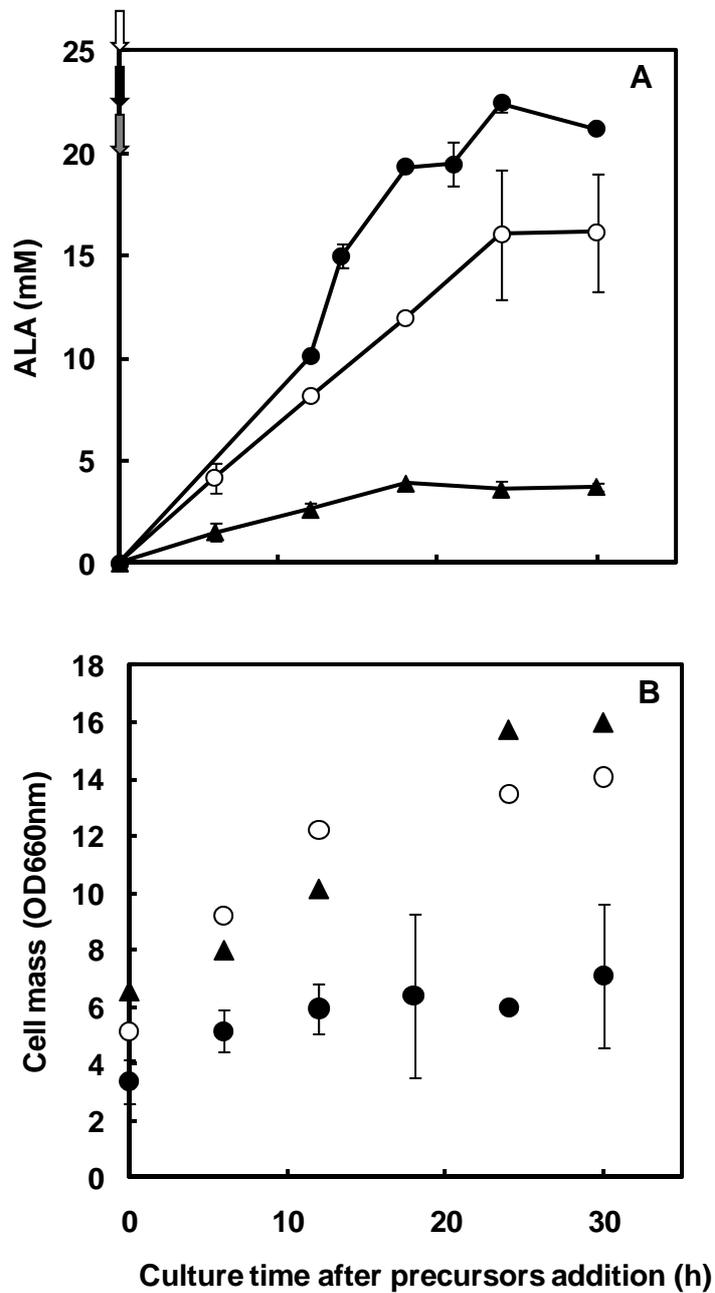


Fig. 1 ALA production by mutants of *R. sphaeroides* in a 2-l jar fermentor containing GGY2 medium (pH: controlled at 6.55 ± 0.05). A: ALA production and B: Cell mass in the following strains ●: CR-720, ○: CR-606, and ▲: CR-520. Addition of □: glycine (60 mM), ▾: LA (5 mM), ▿: yeast extract (10 g/l). The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

2. 3. 2 グリシン追添加による ALA 生産の増大

グリシンを追添加することによる ALA 生産の増大を試みた。グリシン, LA, および酵母エキスを添加後, 12 時間後に最終濃度としてグリシンを 60 mM 追添加した以外は Fig. 1A と同一の条件下で培養を行った結果, Fig. 2 に示すように CR-720 株の ALA 生産量はグリシン, LA, および酵母エキスを添加後 36 時間で 32 mM であった。また, このときの ALA 生産速度は 0.89 mM/h であった。グリシン, LA, および酵母エキス添加後, 12 時間後にグリシンをさらに追添加した場合, 残存グリシン濃度は, グリシン, LA, および酵母エキス添加直後で 53 mM, 12 時間後 (追添加後) 78 mM, 36 時間後 7.4 mM, および 48 時間後 2.5 mM であった。36 時間以降, ALA 生産は停止した。

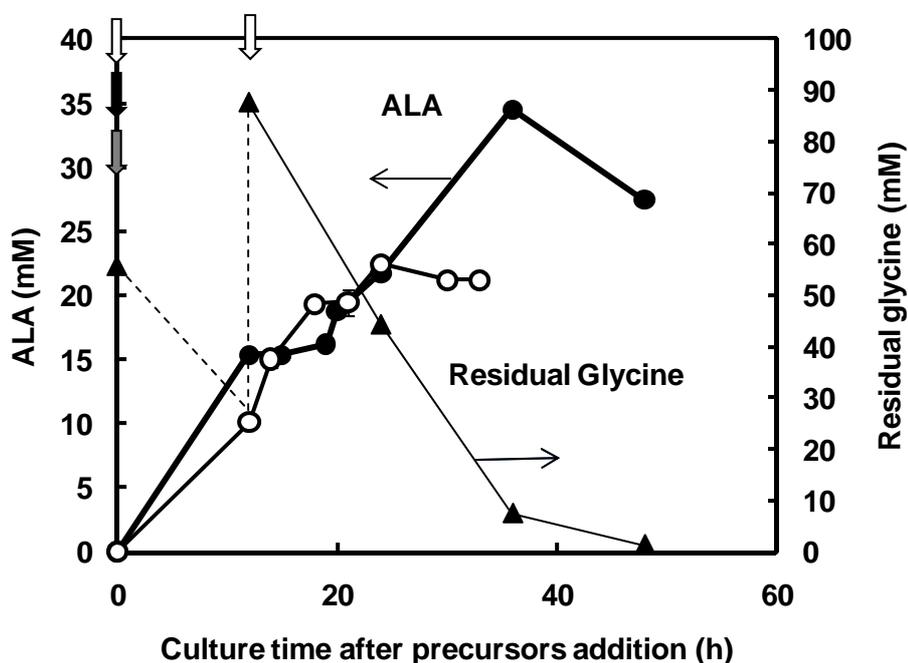


Fig. 2 Effects of repeated addition of glycine on the ALA production of strain CR-720 in a 2-l jar fermentor containing GGY2 medium (pH: controlled at 6.40 ± 0.05). ●: ALA concentration with repeated addition of glycine, ▲: residual glycine concentration with repeated addition of glycine, ○: ALA concentration with 1-time addition of glycine, ↓: glycine addition (60 mM), ▾: LA addition (5 mM), ▿: yeast-extract addition (10 g/l). The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

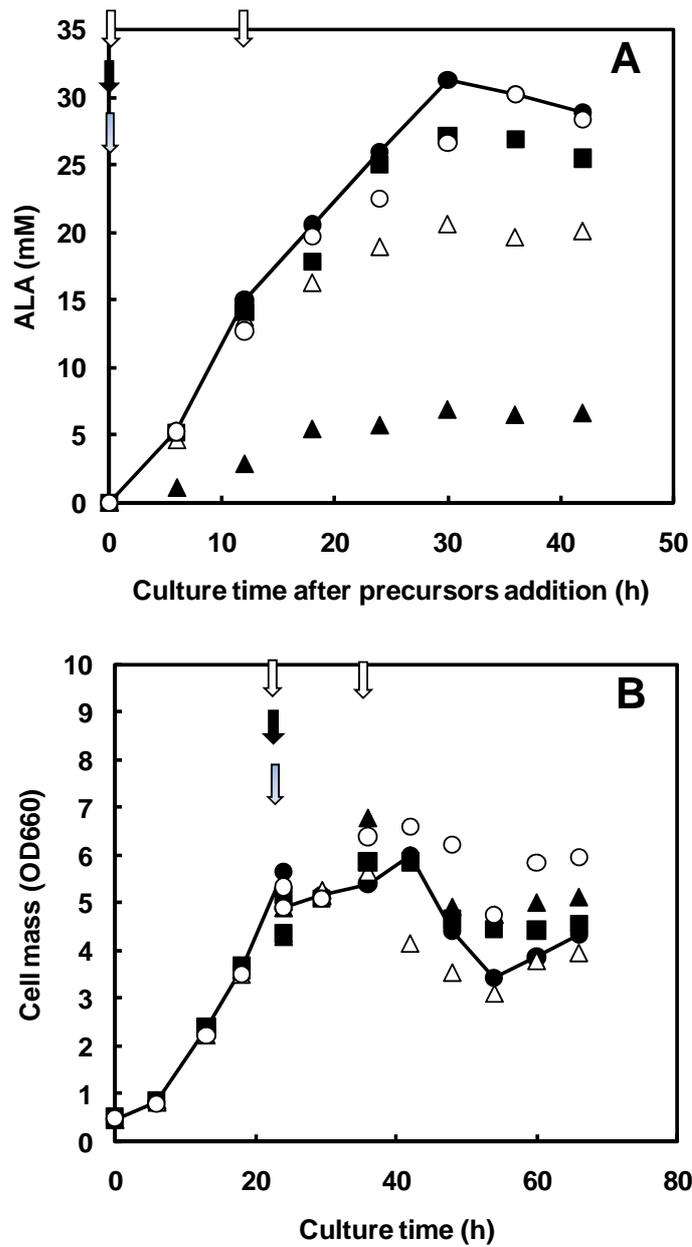


Fig. 3 Effects of LA concentration on the ALA production of strain CR-720 in a 2-l jar fermentor (pH: controlled at 6.55 ± 0.05). A: ALA production and B: Cell mass after precursor addition at the following conditions, LA at concentrations of \blacktriangle : 0 mM, \triangle : 0.5 mM, \bullet : 1 mM, \blacksquare : 2 mM, and \circ : 4 mM; \downarrow : glycine addition (60 mM), \blacktriangledown : LA addition (0–4 mM), \blacktriangledown : yeast-extract addition (10 g/l). The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

2. 3. 3 CR-720 株の ALA 生産に対する至適レブリン酸 (LA) 濃度

グリシン, LA, および酵母エキス添加後の pH を 6.4 ± 0.1 に調節し, グリシン添加 (最終濃度として 60 mM) を 2 回行う条件下で, 2 l 発酵槽を用いて CR-720 株の ALA 生産量に対する LA 濃度の至適範囲を検討した. LA を最終濃度として 1, 2 および 4 mM 添加した場合は, グリシン, LA, および酵母エキス添加後 30 時間での ALA 生産量は, それぞれ 25, 27 および 22 mM であった (Fig. 3A). ALA 生産速度は, それぞれ 0.8, 0.9 および 0.7 mM/h であった. また, 最終濃度として 0.5 mM にて 1 回 LA を添加した場合の ALA 生産量は 21 mM であった. LA 無添加の場合, グリシン, LA, および酵母エキス添加後 30 時間での ALA 生産量は 7 mM であった. 一方, グリシン, LA, および酵母エキス添加後の菌体濃度は, LA を 4 mM 添加した場合に菌体濃度 (OD_{660nm}) が他の濃度と比較して高く推移した (Fig. 3B). しかしながら, 菌体濃度 (OD_{660nm}) は 5~6 であった.

2. 3. 4 CR-720 株による ALA 生産に対する pH の影響

CR-720 株を用いて ALA 生産に対する pH の至適範囲を検討した. 2 l 発酵槽を用い, GGY2 培地にて CR-720 株を 24 時間培養したのち, 前駆体としてグリシン, ALAD 阻害剤として LA, および酵母エキスを, 最終濃度がそれぞれ 60 mM, 1 mM および 10 g/l になるよう添加し, pH の設定値を 6.05, 6.25, 6.45, 6.65 および 6.85 ± 0.05 として硫酸および NaOH を用いて自動制御を行った. また, グリシン, LA および酵母エキス添加後, さらにグリシンを 12 時間後および 24 時間後に最終濃度として 60 mM 上昇するよう添加した. 結果を Fig. 4 に示す. pH 設定値が 6.05 のとき, グリシン, LA, および酵母エキス添加 36 時間後の ALA 生産量は 17 mM であった. その他の pH 設定値における ALA 生産量は 25 から 31 mM を示した. グリシン, LA, および酵母エキス添加 36 時間以降, pH 設定値が 6.25 および 6.45 の場合, 66 時間後に ALA 生産量はそれぞれ 45 および 43 mM となった. 一方, pH 設定値が 6.05, 6.65 および 6.85 の場合は, 66 時間後の ALA 生産量はそれぞれ 24, 32, および 32 mM であった. 以上の結果, pH は 6.25 ± 0.05 が最適と言える.

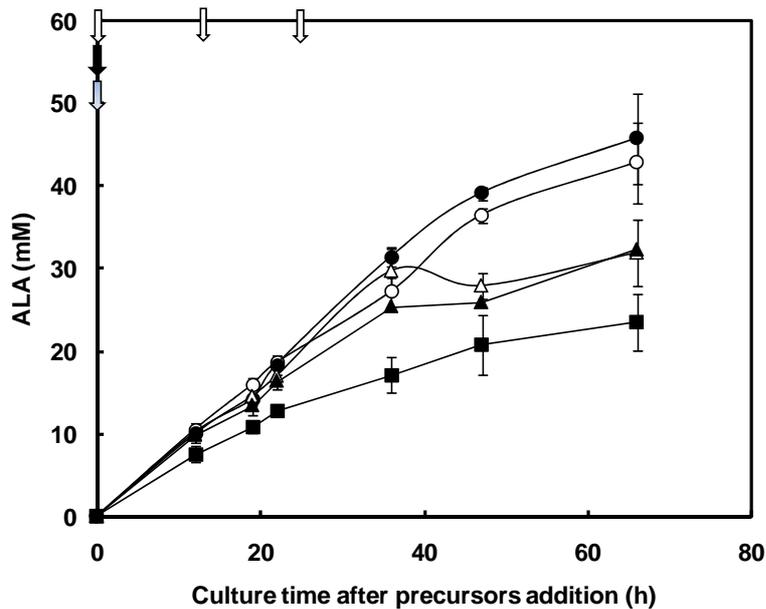


Fig.4 Effects of pH on ALA production of strain CR-720. In 2-l jar fermentors, the pH was controlled at ●: 6.25 ± 0.05 , ○: 6.45 ± 0.05 , ▲: 6.65 ± 0.05 , □: 6.85 ± 0.05 , ■: 6.05 ± 0.05 . ▾: glycine addition (60 mM), ▽: LA addition (1 mM), and ▿: yeast extract addition (10 g/l). The values represent the average and standard deviation of triplicate measurements.

2. 3. 5 好気条件下での CR-720 株の ALA 合成酵素活性

グリシン添加条件, および pH の検討により, CR-720 株の最大 ALA 生産量を増大させることができた (Fig. 4). しかしながら, 菌体濃度 (OD_{660nm}) は 5 ~ 7 程度と低かった (Fig. 1B, Fig. 3B). そこで, 菌体濃度を増加させることで ALA 生産速度を向上させることを目的として, 培地の検討を行った. GGY2 培地の各成分を 2 倍としグルコース濃度を 200 mM とした改変培地 (2 × GGY2 および TT2) により CR-720 株を培養した. Fig. 5 に示すように 44 時間後の菌体濃度 (OD_{660nm}) は GGY2 培地による培養では 8.2 であったのに対し, 2 × GGY2 培地による培養では 13 となった. また, 酵母エキスを工業用酵母エキス (オリエンタル酵母社) 主体とした TT2 培地による培養では 28 に達した (Fig. 5B). 2 × GGY2 培地に含まれる成分の中で, 菌体増殖に寄与する成分を確認するため, 各成分を半量添加した培地を作製し CR-720 株を培養したところ, 成分を半量にしたそれぞれの培地で培養による 44 時間後の菌体濃度は, 2 × GGY2 培地の菌体濃度よりも低く, すべての成分は必要十分量であることを確認した (Fig. 5A). そこで, 31 発酵槽を用いて, 改変培地 (2 × GGY2) により CR-720 株の培養を行い, 溶存酸素濃度が 1.61, 0.81, 0.02 mg/l のときに培養液をサンプリングし, それぞれの菌体の ALA 合成酵素 (ALAS) 活性を測定した. 結果を Table 1 に示す. 比較対照として第 5 次変異株 (CR-520) および第 6 次変異株 (CR-606) を用い同じ培

養を行った結果を示す。溶存酸素濃度が 1.61 mg/l の場合, CR-720 株の ALAS 活性は CR-520 株の約 5 倍であった。また, 0.02 および 0.81 mg/l においても CR-720 株の ALAS 活性は有意に上昇していた。一方, 溶存酸素濃度が 1.61 mg/l の場合の ALAS 活性は, 0.81 mg/l の場合の ALAS 活性に対して約 1/2 であった。

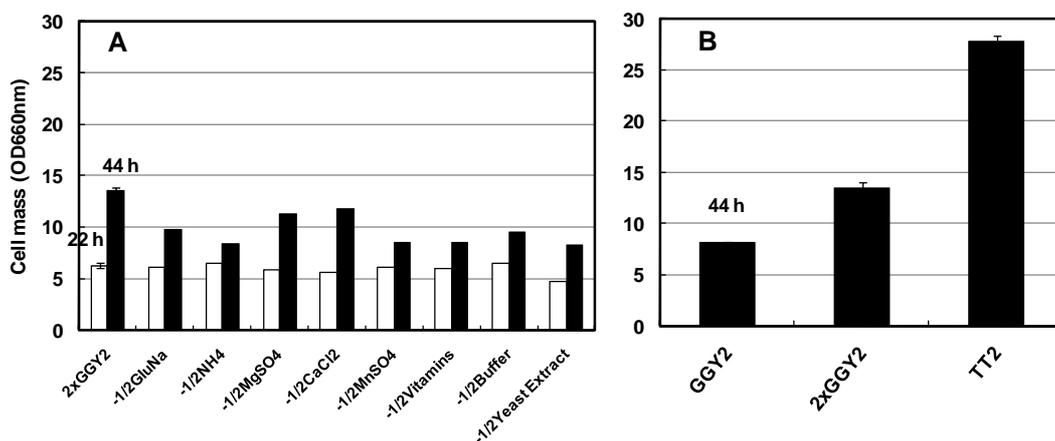


Fig. 5 Growth of strain CR-720 on various media. A: Growth on 2 × GGY2 medium with half concentration of each constituent, B: Growth on GGY2 medium, 2 × GGY2 medium, and TT2 medium in 300-ml Erlenmeyer flasks containing 30 ml of each medium. Strain CR-720 was grown at 32°C and 120 rpm agitation. The cell mass was measured after 22 h and 44 h. The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

Table 1. ALA synthetase activity of mutant strains exposed to different dissolved oxygen levels

DO (mg/l)	ALA synthetase activity (nmol /min /mg-protein) ^a		
	CR-720	CR-649	CR-520
0.02 ± 0.04	9.6 ± 1.9	5.8 ± 0.4	6.9 ± 1.2
0.81 ± 0.28	10.4 ± 3.7	3.3 ± 0.4	2.4 ± 0.1
1.61 ± 0.13	5.3 ± 1.6	1.6 ± 2.3	1.1 ± 1.1

^a After 48-h culture, DO was controlled by agitation in a 3-l jar fermentor. The values represent the average and standard deviation values of triplicate measurements.

2. 3. 6 CR-720 株の ALA 蓄積に対する酸化還元電位 (ORP) を指標とした酸素供給条件の設定

CR-720 株の最大 ALA 蓄積を確認するため, 酸素供給条件の検討を行った。3 l 発酵槽を用い, 2 × GGY2 培地により 40 時間生育させた後, グリシン, LA, および酵母エキスをそれぞれ最終濃度が 60 mM, 1 mM および 10 g/l となるよう添加し, 通気速度は 0.2 vvm 一定のもと

攪拌速度を 180, 300, 350, 400 rpm として, ALA 生産量, 酸化還元電位 (ORP) および菌体濃度を観察した. Fig. 6 に示すように攪拌速度を 300 rpm としたとき, グリシン, LA, および酵母エキスを添加した 35 時間後に ALA 生産量 33 mM (生産速度 ; 0.94 mM/h) を得た. また攪拌速度が 300 rpm のとき, グリシン, LA, および酵母エキスを添加した 35 時間後の菌体濃度 (OD_{660nm}) は, 14 であった (Fig. 6B) . 一方, 350 および 400 rpm とした場合の ALA 生産量は, グリシン, LA, および酵母エキスを添加した 21 時間後にそれぞれ 29 および 10.6 mM (1.38, 0.53 mM/h) であった (Fig. 6A) . このとき, グリシン, LA, および酵母エキスを添加した 35 時間後の菌体濃度は, 24 および 21 であった (Fig. 6B) . これらの条件下での ORP 値を測定すると, 攪拌速度 180, 300, 350 および 400 rpm のとき, それぞれ -164, -111, -71 および 22 mV を示した. 350 rpm のとき, グリシン, LA, および酵母エキスを添加した 21 時間後には培養液中のグリシン濃度分析値は 4.2 mM であった. 溶存酸素濃度は前駆体添加後, すべて 0 mg/l であった.

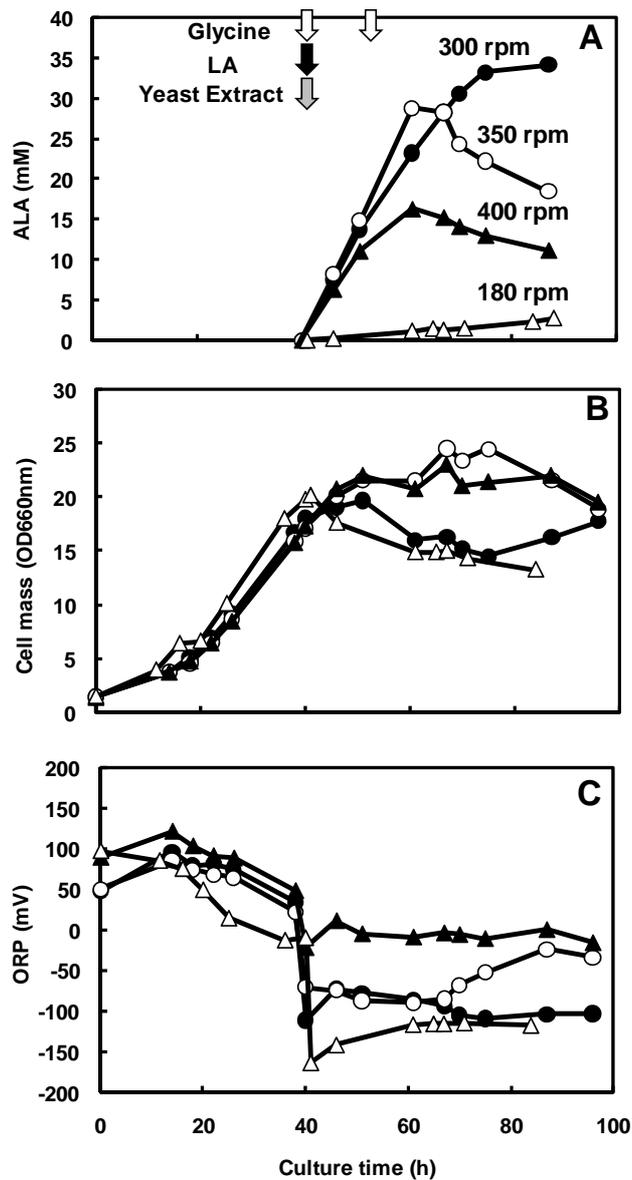


Fig. 6 Effects of agitation on ALA production of strain CR-720. A 3-l jar fermentor containing $2 \times$ GGY2 medium was used and the pH was controlled 6.3 ± 0.1 . Agitation after the addition of glycine, LA, and yeast extract was controlled at \triangle : 180 rpm, \bullet : 300 rpm, \circ : 350 rpm, and \blacktriangle : 400 rpm. A: ALA production, B: cell mass, C: redox potential (ORP), \square : glycine addition (60 mM), \blacktriangledown : LA addition (1 mM), \blacktriangledown : yeast extract addition (10 g/l). The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

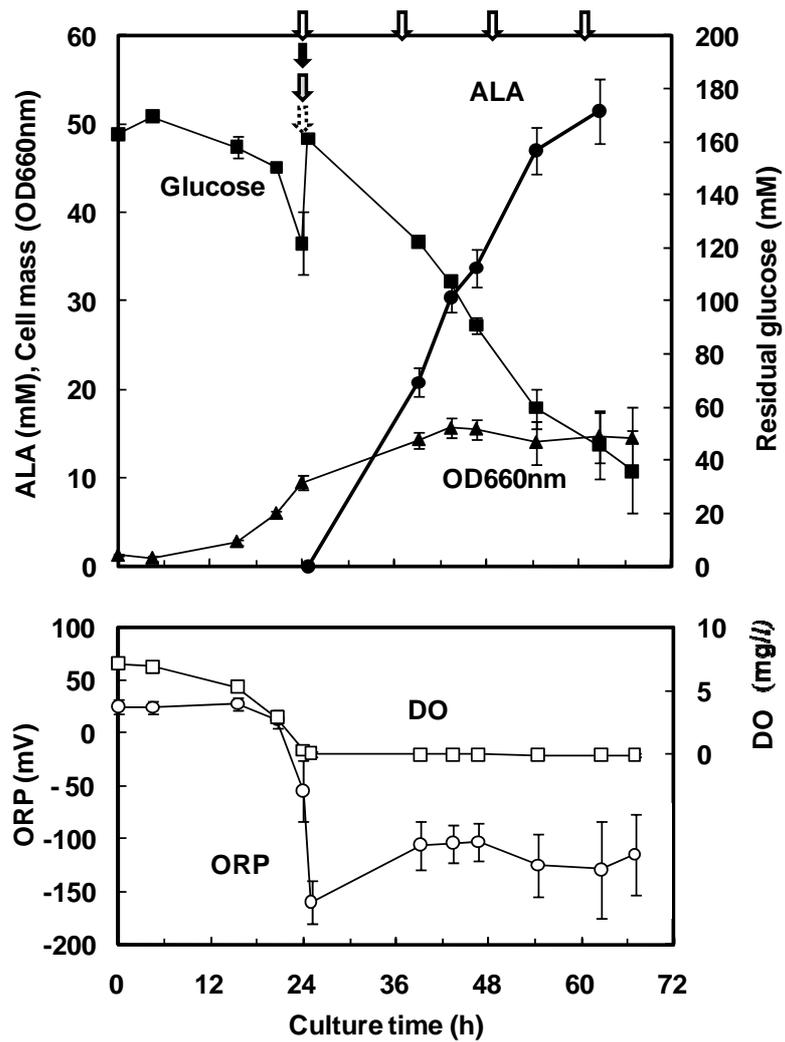


Fig.7 ALA production of strain CR-720 with agitation and redox potential (ORP) control in a 3-l jar fermentor containing TT2 medium. Agitation was carried out at 350 rpm and pH was controlled at 6.3 ± 0.1 after the addition of LA, yeast extract, glycine, and glucose. ●: ALA production, ▲: cell mass, ■: residual glucose, □: dissolved oxygen (DO), ○: oxidation reduction potential (ORP), ▾: glycine addition (60 mM), ▿: LA addition (1 mM), ▽: yeast-extract addition (5 g/l), ◻: glucose addition (50 mM). The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

2. 3. 7 ORP を指標として設定した酸素供給条件による CR-720 株の ALA 生産量

ORP の違いにより ALA 生産に大きく差異が見られたので、3 l 発酵槽を用いて CR-720 株を 40 時間培養後、前駆体としてグリシン、ALAD 阻害剤として LA、グルコースおよび酵母エキスをそれぞれ 60 mM、5 mM、50 mM および 10 g/l となるよう添加、硫酸を用いて pH を 6.3 ± 0.1 に調整し ALA 生産を行った。また、ALA 生産開始時の攪拌速度は、ORP 測定値がおよそ -150 mV になるよう調整した結果、350 rpm が適当であったので、ALA 生産時の攪拌速度は 350 rpm 一定とした。グリシン、LA、グルコース、および酵母エキス添加後グリシンを 12, 24, および 36 時間後に最終濃度として 60 mM 分をそれぞれ追添加した。Fig. 7A に示すように、CR-720 株の ALA 生産量はグリシン、LA、グルコース、および酵母エキスを添加した 30 時間後および 38 時間後に、それぞれ 47 および 52 mM に達した。また、ALA 生産開始から 27 時間後までの ALA 生産速度は 1.6 mM/h に達した。ALA 生産時の溶存酸素濃度は 0 mg/l を推移し、ORP は -150 ~ -100 mV の範囲内であった (Fig. 7B)。ALA 生産開始から 30 時間後および 38 時間後のグルコース残存量は、それぞれ 60 および 46 mM であった。また、ALA 生産時の菌体濃度 (OD_{660nm}) は、16 から 19 を推移していた (Fig. 7A)。グルコースの減少と ALA の生産は並行しており、ALA 生産開始から 30 時間までのグルコースから ALA へのモル収率は 46% であった。

2. 4 考察

今回、3 l 発酵槽を用い CR-720 株によって得た ALA 生産濃度 (52 mM) は、最近の報告、*Rhodospseudomonas palustris* による 0.2 mM²⁴⁾、*R. palustris* の *hem A* 遺伝子を含んだ *E. coli* による 39.3 mM¹¹⁾、遺伝子組換え *E. coli* による 24 mM²⁵⁾、29 mM¹²⁾、23 mM¹³⁾ と比較して 1.3 倍以上高い結果であった。CR-720 株は、GGY2 培地では ALA 生産時の菌体濃度 (OD_{660nm}) が 5 ~ 7 と低く、一方、ALA 生産量は 22 mM の結果を得、CR-606 株や CR-520 株と比較して好気暗条件で高かった。本結果は、CR-720 株では菌体生産に回るエネルギーが、より多く ALA 生産に振り向けられたと考えられる。遺伝子組換え *E. coli* による ALA 生産では、グリシン 90 mM を 1 回添加、1 ~ 2 g/l (13 ~ 26 mM) を 1 回もしくは数回¹¹⁻¹⁵⁾ 添加している。グリシン 26 mM を 1 回さらに 13 mM を 2 回添加した場合のグリシンからの ALA の収率は 54% であるのに対し¹²⁾、今回の著者らの実験ではグリシンを合計 120 mM 添加し、ALA を 34 mM 生産した (Fig. 2) ことから、グリシンからの ALA の収率は 28% となり、遺伝子組換え *E. coli* と比較して CR-720 株はグリシンからの ALA 収率は低かった。CR-720 株ではグリシンが、アンモニアなどの他の物質に代謝され、ALA 生産に用いられていないためと考えられる¹⁸⁾。ALA 脱水酵素阻害剤としての LA 添加濃度は、CR-720 株については試験管培養で 5 mM と報告されている¹⁸⁾。また、遺伝子組換え *E. coli* では、30 mM と 10 mM での 2 回添加での報告がある¹²⁾。今回、CR-720 株は 1 mM を 1 回添加することでも、5 mM 添加とほぼ同様の ALA 生産を得た。このことは LA のコスト低減に効果的である。CR-720 株の ALA 生産時の pH 制御値はきわめて狭い範囲 (pH 6.25 ~ 6.45) で、前駆体添加後 30 時間以降の ALA 生

産を継続可能なことを今回明らかにした。pH 6.5 に制御を行い、ALA を生産させた例は報告されているが、遺伝子組換え *E. coli* を含め、これまでに ALA 生産を増大させるための pH 設定幅についての報告がなく、新たな知見を得た。従来、光合成細菌 *R. sphaeroides* の変異株の培養には Lascelles ら²⁷⁾ の培地を基本としてヘムによるフィードバックを避けるためクエン酸鉄などの微量金属成分やスクシニル-CoA の供給源としてグルコースを添加し改変した GGY2 培地を使用してきた¹⁶⁾。グルコース濃度を 200 mM とし、GGY2 培地のその他成分を 2 倍とした 2 × GGY2 培地を用いて培養した CR720 株は、溶存酸素濃度が 0.81 mg/l 存在下でも ALAS 活性が 10.4 nmol/min/mg-protein を示し、GGY2 培地で生育した CR-720 株の ALAS 活性 13.3 nmol/min/mg-protein¹⁶⁾ と比較してほぼ同等の活性を有していた (Table 1)。菌体濃度は GGY2 培地のほぼ 1.3 倍得られた (Fig. 5) ことから、菌体あたりの酵素活性は上昇していると考えられた。2 × GGY2 培地で生育した CR-720 株は、ALA 生産に対する最適な酸素供給条件として、通気量 0.2 vvm 条件下での ORP 値が -150 ~ -100 mV 程度であることを 3 l 発酵槽を用いた ALA 生産試験で今回新たに確認した (Fig. 6)。さらに、酵母エキスを、工業用酵母エキスを主体とした TT2 培地に変更し、ALA 生産時 ORP 値の推移が -150 ~ -100 mV となる攪拌速度は 350 rpm であることを確認し、ALA 生産が 52 mM、また、生産開始後 30 時間までの ALA 生産速度は 1.6 mM/h であることを確認した (Fig. 7)。ALA 生産速度についてはこれまで報告されている遺伝子組換え *E. coli* による 1.6 mM/h¹¹⁾ と比較してほぼ同等の結果を得た。以上のことから、本報では、工業的な生産に応用が可能となるよう、新規に ORP を指標として、ALA 生産の至適酸素供給条件を設定したことを報告した。さらに、これまでとは安価な培地を使用し、工業的レベルに達する 52 mM の ALA 生産を可能にした。なお、これまで、ALA をバイオ生産で実用化している例は報告されていない。

2. 5 要約

すでに得ている光合成細菌変異株 *R. sphaeroides* CR-720 株は、*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンによる変異を逐次行い取得した変異株であり、光照射せずに従来の変異株に対して 5-アミノレブリン酸 (ALA) を高蓄積する。本菌株は前駆体として 50 mM グルコース、60 mM グリシン、ALA 脱水酵素阻害剤として 5 mM レブリン酸および 10 g/l 酵母エキス存在下、2 l 発酵槽で ALA を生産させたところ、親株である CR-606 株に対して生産量は 40% 増大した。また、グリシンの追添加およびレブリン酸添加濃度の最適化を行い、厳密に pH を 6.25 ± 0.05 に制御した結果、ALA を 43 mM 生産した。さらに、培地を改良し高菌体濃度を得た。本培地で生育した CR-720 株の菌体が持つ ALA 合成酵素活性は CR-606 株の約 3 倍であった。さらに、3 l 発酵槽を用いて酸化還元電位 (ORP) を指標とした酸素供給条件の設定を行った結果、ORP 値が -150 から -100 mV で ALA の生産は最大値を示した。CR-720 株は最終的に ALA を 52 mM 生産し、生産速度は 1.6 mM/h を得た。

2. 6 参考文献

- 1) 田中 徹, 岩井一弥, 渡辺圭太郎, 堀田康司: 植物の生長調節, **40**, 22-29 (2005).
- 2) Mauzerall, D. and Granick, S.: *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-446(1956).
- 3) Rebiez, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H. J., and Wu, S. M.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 390-396 (1984).
- 4) 渡辺圭太郎, 船田茂行, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p.59 (2008).
- 5) 船田茂行, 小堀寿浩, 藤田峰斎, 堂田正彦, 渡辺圭太郎, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p.60 (2008).
- 6) Awad, M. A.: *Sci. Hortic.*, **118**, 48-52 (2008).
- 7) 渡辺圭太郎, 船田茂行, 小堀寿浩, 笛木正一, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会発表記録集, p.38 (2007).
- 8) 船田茂行, 渡辺圭太郎, 田中 享, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p.39 (2007).
- 9) 岩井一弥, 倉持仁志, 竹内安智: 芝草研究, **35**, 99-104 (2007).
- 10) Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., and Tanaka, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23-20 (2002).
- 11) Choi, H. -P., Lee, Y. -M., Yun, C. -W., and Sung, H. -C.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 1136-1140 (2008).
- 12) Fu, W., Lin, J., and Cen, P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 777-782 (2007).
- 13) Qin, G., Lin, J., Liu, X., and Cen, P.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 316-322 (2006).
- 14) Xie, L., Eiteman, M. A., and Altman, E.: *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1751-1755 (2003).
- 15) Xie, L., Hall, D., Eiteman, M. A., and Altman, E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 267-273 (2003).
- 16) Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 798- 804 (1999).
- 17) 上山宏輝, 堀田康司, 田中 徹, 西川誠司, 佐々木 健: 生物工程, **78**, 48-55 (2000).
- 18) Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y., and Hayashi, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 403-406 (1991).
- 19) Tanaka, T., Watanabe, K., Hotta, Y., Lin, D., Sasaki, K., and Nagai, S.: *Biotechnol. Lett.*, **13**, 589-594 (1991).
- 20) Burnham, B. F. and Laccelles, J.: *Biochem. J.*, **87**, 462- 472 (1963).
- 21) Yubisui, Y. and Yoneyama, Y.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 77-85 (1972).
- 22) Okayama, A., Fjii, S., and Miura, R.: *Clin. Chem.*, **36**, 1494-1497 (1990).
- 23) 安居嘉秀: 島津評論, **47**, 365-372 (1990).
- 24) Saikour, A., Choorit, W., Prasertsan, P., Kantachote, D., and Sasaki, K.: *Biosci. Biotechnol.*

- Biochem.*, **73**, 987-992 (2009).
- 25) Liu, X. X., Wang, L., Wang, Y. J., and Cai, L. L.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**, 822-830 (2010).
- 26) 田中 享, 西川誠司, 室岡義勝 : 日本生物工学会大会講演要旨集, p.98 (2003).
- 27) Lascelles, J.: *Biochem. J.*, **72**, 508-518 (1959).

第 3 章

光合成細菌変異株を用いた ALA 生産における副産物の生成と 培養温度の制御による ALA の大量生産

3. 1 緒言

5-アミノレブリン酸(ALA)は、ポルフィリン、ヘム、ビタミン B₁₂ 等、ポルフィリン誘導体生合成における最初の中間体として知られ、植物、動物、ヒトに広く分布している。チトクロムやヘモグロビンも全て ALA を経て合成され、全て生理的にも重要な物質である。ALA は、グリシンとスクシニル-CoA から ALA 合成酵素を経て生成される、いわゆる Shemin 経路(C-4 経路)と、グルタミン酸から生成される C-5 経路で主に行われる¹⁾。ALA は、ALA 脱水酵素(ALAD)により 2 分子が脱水縮合され、ピロール化合物であるポルフォビリノーゲン(PBG)を生成する。1950 年代に精力的に行われたポルフィリン誘導体生合成研究を通じて、細菌、動物、植物においてその最終産物であるポルフィリン誘導体の存在量に比べて、遊離の ALA や PBG の存在量が極めて少量であることが指摘され²⁾、多くの場合 ALA 合成がポルフィリン誘導体生合成における律速段階であることが知られている。

1984 年、Rebeiz らによって ALA は低毒性除草剤として応用できることが報告された³⁾。ALA は毒性がなく分解性も優れていて、植物に対して様々なストレス条件下においての成長促進効果が報告されており、農業分野での用途開発が進んでいる⁴⁻¹⁰⁾。一方、ALA はがん治療薬、腫瘍診断薬として医療用途での開発が注目されている¹⁾。最近では、ALA と Fe²⁺ を用いたヒトによる糖尿病予防に関する臨床試験結果¹¹⁾、ならびに ALA と Fe²⁺ を用いた抗マalaria薬への可能性が報告されており医療分野での用途開発が進展している¹²⁾。

ALA の生産については化学合成法が報告されている。しかし、化学合成法は収率が悪く、一部でしか実用化はされていない¹⁾。1970~1985 年までの微生物による ALA 生産研究では、光合成細菌、嫌気性菌、藻類などでほとんどが ALA 脱水酵素(ALAD)の競争阻害剤であるレブリン酸(LA)を培地に添加することで ALA 菌体外生産が認められているが、いずれも ALA 生産濃度は低かった。最近では *Rhodobacter sphaeroides*, *Bradyrhizobium japonica* 及び *Agrobacterium radiobactor* の ALA 合成酵素遺伝子(*hemA*)を導入した *Escherichia coli* による ALA 生産に関する研究が行われており¹³⁻¹⁶⁾、溶存酸素濃度の制御を加えた培養条件下において、最大で 72 mM の生産が報告されている¹⁷⁾。

光合成細菌は、光従属栄養増殖ばかりでなく、好気暗条件下でも呼吸により増殖できる。ALA の実用的大量生産には好気暗条件がコスト的に優れているので、著者らは好気暗条件下でも ALA 生産が可能な菌の開発を進めた。既に報告した通り、*R. sphaeroides* IFO12203 を起源として *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N''*-ニトロソグアニジンを用いて繰り返し変異を行い好気暗条件下でも ALA を生産可能な第 5 次変異株(CR-520)および第 6 次変異株(CR-606)を取得した¹⁸⁾。CR-520 および CR-606 の ALA 生産濃度を増大させるためには通気及び攪拌速度の調節が特に効果的であった。通常の空気を通気速度 0.1 - 0.2 vvm で通気した培養条件下での CR-606 株の ALA 生産濃度は、前駆体であるグリシン、ALAD の競争阻害剤である LA 及び酵母エキスを添加後、18 時間で 20 mM だった¹⁸⁾。さらなる高生産を考へての変異源処理により取得した CR-720 株は、酸化還元電位(ORP)を指標とし-150 から-100 mV となる酸素供給条件下においてグリシン、LA、グルコース及び酵母エキスを添加後、38 時間培養後の ALA

生産濃度は 52 mM だった¹⁹⁾.

R. sphaeroides を用いた ALA 生産における培養温度は, CR-520 株及び CR-606 株を用いて 2 l 発酵槽により 30°C で実施され¹⁸⁾, CR-720 株では 3 l 発酵槽により 32°C で実施されている¹⁹⁾. しかしながら, CR-720 株は, 生育の至適温度が 32°C である一方で, ALA 生産においては 27°C 以上の培養温度では培養温度の上昇に伴って未知の副産物の生成が増加する傾向が認められ, ALA 生産量も 32°C 以上の培養温度では減少する傾向が試験管による実験で認められた.

本報では, *R. sphaeroides* 変異株 CR-720 株による ALA 生産時における副産物の構造を決定し, 副産物の生成抑制条件として培養温度を検討した. さらに, CR-720 株を用い実製造設備 (5 kl 発酵槽) での ALA 生産のさらなる増大を試みた.

3. 2 実験方法

3. 2. 1 供試菌株と培地

R. sphaeroides CR-720 株は, 著者らの実験室保有のものを使用した²⁰⁾. 菌体を生育させる培地はグルコース及び酵母エキスからなる TT2 培地¹⁹⁾及び TT3 培地を使用した. 121°C, 20 分, 高圧蒸気滅菌した後, 最終濃度が 150 mM となるよう別に滅菌した 2 M グルコース液を加えた. TT3 培地の組成は, グルコースの最終濃度を 250 mM とし, 工業用酵母エキス(オリエンタル酵母工業社, 東京)の最終濃度を 8 g/l とした以外はすべて TT2 培地の組成と同様とした. pH 調整は行わなかった.

菌株は, 試験管(21mmφ)では振幅幅 5 cm で 250 rpm, 仕込量 10 ml, 300 ml 容バツフル付三角フラスコでは, 回転半径 35 mm で 120 rpm, 仕込量 30 ml, 2 l 容バツフル付三角フラスコでは, 回転半径 35 mm で 140 rpm, 仕込量 200 ml でそれぞれ培養温度 32 °C で培養を行い生育させた.

3. 2. 2 発酵槽による ALA 生産

3 l 発酵槽による ALA 生産試験の場合, 種培養は, 10 ml の TT2 培地を含む 21 mmφ試験管を用いて 48 時間行った. 次いで, 200 ml の TT2 培地を含む 2 l 容バツフルフラスコに対して試験管による培養液を 2 % (v/v) 植菌し, 好気暗条件下 24 時間培養を行った. 次に, 1.8 l の TT2 培地を含む, 溶存酸素電極(TOA-DKK 社, 東京), 酸化還元電位電極及び pH 電極(メトラー・トレド社, Swiss)を装着した 3 l 発酵槽 MDL-300(丸菱バイオエンジニアリング社, 東京)に, 前培養液を 2 % (v/v) 植菌した. 培養は通気速度 0.2 vvm, 攪拌速度 180 から 400 rpm, 温度は 26 から 34°C で行った.

5 kl 発酵槽による ALA 生産試験の場合, 種培養は, 200 ml の TT2 培地を含む 2 l 容バツフル付三角フラスコを用いて 24 時間行った. 次いで 120 l の TT2 培地を含む 200 l 発酵槽にフラスコ培養液を 1 % (v/v) 植菌し, 通気速度 0.02 vvm, 攪拌速度 230 rpm で 24~30 時間, 前培

養を行った. 3 kl の TT3 培地を含む, 溶存酸素電極, pH 電極(メトラー・トレド社, Swiss)及び温度計を装着した 5 kl 発酵槽に前培養液全量を植菌した. 培養は培養温度 28 °C, 通気速度 0.2 vvm, 攪拌速度 60~105 rpm,で行った.

3. 2. 3 5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸(AHVA)の合成

Biel らの方法²¹⁾に従い, ALA, 水素化ホウ素ナトリウム及び炭酸水素ナトリウム(和光純薬工業社, 大阪)を室温下で一晩混合したのち, イオン交換樹脂 IR-120B(オルガノ社, 東京)による精製を行い, TLC で発色が見られた画分を採取し, エバポレーターにより濃縮, 乾固させ合成 AHVA を得た. (R)-(-)-5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸((R)-(-)-AHVA), 及び(S)-(+)-5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸((S)-(+)-AHVA)は, Herdies の方法²²⁾に従って合成した.

3. 2. 4 AHVA 粗結晶の取得

発酵液を Granick らの方法²⁾に従ってイオン交換樹脂 IR-120B(オルガノ社, 東京)による精製を行い, ALA 画分を取得した. ALA 画分を 1N 水酸化ナトリウム水溶液により pH を 8.0 に調整し一晩室温下で放置した. さらに pH を 8.0 に調整した ALA 画分を塩酸を用いて pH を 4.0 に調整し, イオン交換樹脂を用いて精製を行った. 取得した ALA 画分を Herdies らの方法²²⁾に従って硫酸バリウム(和光純薬工業社, 大阪)共存下にて室温で攪拌し, 遠心分離により上清を取得した. ろ液をさらに 1N 水酸化ナトリウム水溶液により pH を 8.0 に調整し一晩室温下で放置した後, 塩酸を用いて pH を 4.0 に調整し, 再度イオン交換樹脂を用いて精製した. AHVA を TLC により確認し AHVA 画分を得た. AHVA 画分をメタノール(和光純薬工業社, 大阪)を用いて結晶化し, AHVA 粗結晶を得た.

3. 2. 5 分析方法

培養液中の ALA 濃度は, エーリッヒ発色法により分析を行った¹⁸⁾. 菌体濃度は分光光度計 UV1600(島津製作所社, 京都)を用いて 660nm の濁度によって分析した. 培養液中の AHVA, 5-アミノ吉草酸(DAVA)は, 高速液体クロマトグラフィー LC-10A 及び蛍光検出器 RF-10A(島津製作所社, 京都)により, オルトフタルアルデヒドを用いたポストカラム-HPLC 分析法²³⁾により移動相濃度勾配条件を改変した方法によって分析した. 合成した AHVA は 99.9%D 重水(メルク社, Germany)に溶解し, 核磁気共鳴装置 JNM- α 400(日本電子社, 東京)を用いて分析し, 核磁気共鳴(¹H NMR)スペクトルを取得した. 純水に溶解した(R)-(-)-AHVA, (S)-(+)-AHVA, AHVA 粗結晶, および発酵液は, Agilent1100 シリーズの HPLC 及びダイオードアレイ検出器 DAD(アジレントテクノロジー社, USA)により, 純水 1 l に 60%過塩素酸 10 ml を加えて pH を 1.0 に調整した溶液を移動相とし, 流速を 0.5 ml/min, CROWNPAK CR(+)-カラム(ダイセル社, 大阪), カラム温度 3°C, 測定波長 190~400 nm にて分析した.

3. 3 実験結果

3. 3. 1 発酵での未知物質検出

3 l 発酵槽を用いて CR-720 株を生育させ、24 時間培養後に菌体濃度(OD_{660})がおよそ 10(約 4 g dry cell /l)に達し、攪拌速度を 350 rpm とし、グリシン、レブリン酸、酵母エキス及びグルコースを添加後に、硫酸を用いて pH を 6.3 ± 0.1 に自動調整し ALA の生産を開始した。生産開始後 19 時間後に 28 mM 生産した。生産速度は 1.5 mM/h であった(Fig. 1)。一方で、生産開始後 19 時間以降は生産速度が低下し、生産開始後 44 時間後では 41mM の生産であった。生産開始からの生産速度は 0.9 mM/h となった。残存グリシン濃度を確認するため、経時的に HPLC によりアミノ酸を分析したところ、生産開始後 19 時間以降のグリシンは 2.5~17 mM 残存していた。一方、リテンションタイム約 45 分に未知ピークを検出し、そのピークエリアは生産開始後、ALA の増加とともに増加していた(Fig. 1, u.k. 1)。生産開始から 25 時間経過以降、ALA 生産速度は低下したが未知ピーク u.k.1 は増加し続け、生産開始から 44 時間後のピークエリアは 5.4×10^7 となった。一方でアミノ酸分析のクロマトグラム上のリテンションタイム約 52 分に、新たな未知ピークを観察した(Fig. 2, u.k. 2)。未知ピーク u.k. 2 は、培養開始時の培地には検出されず、生産開始時のピークエリアは 3.5×10^6 、生産開始から 20 時間後に 8.1×10^6 、44 時間後には 5.6×10^6 であった。

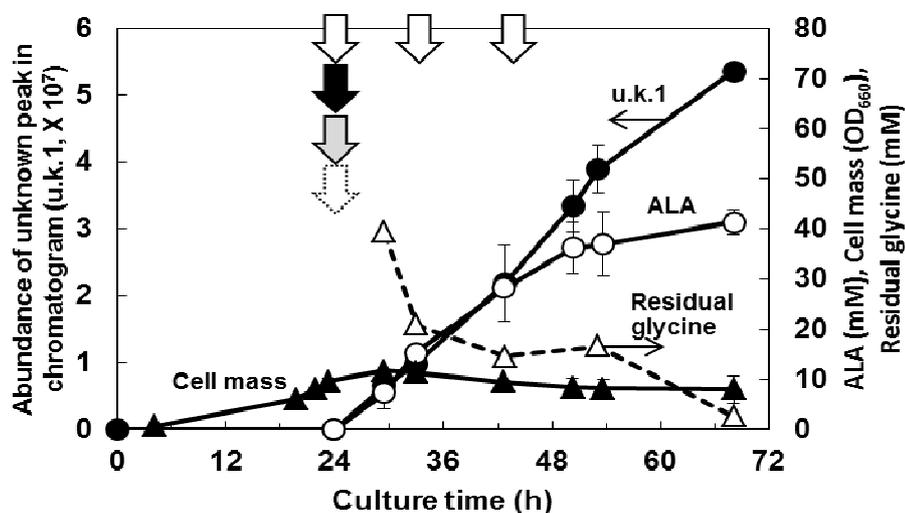


Fig. 1. Increase of an unknown peak detected by amino acid analysis associated with the production of ALA from strain CR-720 in 3-l jar fermenter containing TT2 medium at 32 °C. Agitation and aeration were controlled out at 350 rpm and 0.2 vvm, and pH was controlled at 6.3 ± 0.1 after addition of levulinic acid (LA), glycine, yeast extract and glucose. ●, unknown peak area in amino acid analysis (u.k.1); ○, ALA production; ▲, cell mass; △, residual glycine; ↓, LA addition (5 mM); ⇓, glycine addition (60 mM); ⇓, yeast extract addition (5 g/l); ⇓, glucose addition (50 mM). The values represent the averages and standard deviations of triplicate experiments.

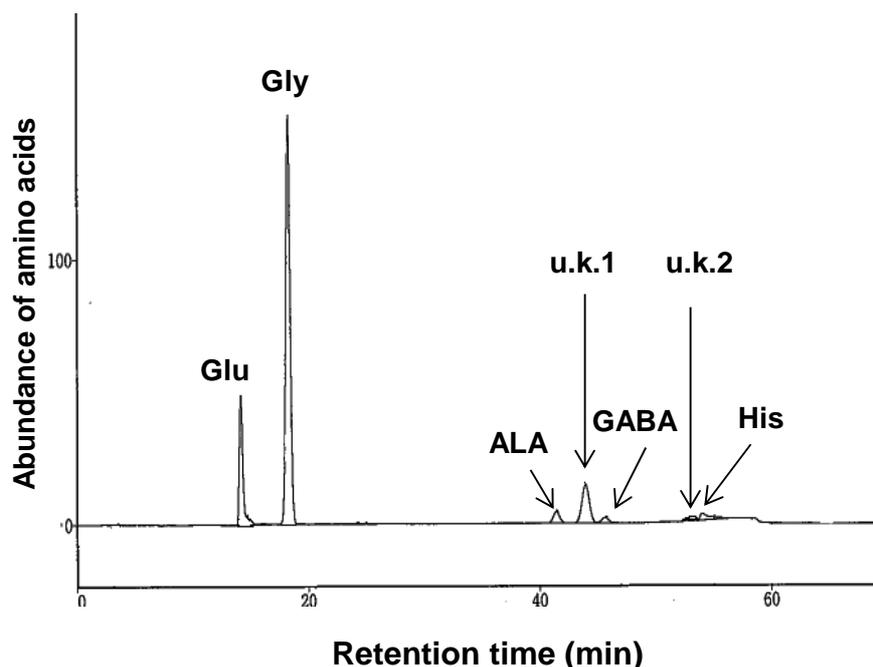


Fig. 2. Amino acid chromatogram of culture medium of strain CR-720 44 h after addition of levulinic acid (5 mM) and glycine (60 mM). Glu, glutamic acid; Gly, glycine; LA, levulinic acid; ALA, 5-aminolevulinic acid; u.k.1, unknown peak in amino acid analysis (retention time is 45 min.); GABA, γ -aminobutylic acid; u.k.2, unknown peak area in amino acid analysis (retention time is 52 min.); His, histidine

3. 3. 2 未知物質の分析・同定

発酵液中の未知ピークはアミノ酸分析法で検出され、この分析法はイオン交換を利用した分離の上、オルトフタルアルデヒドによるアミノ基の修飾反応の後、生成した誘導体を蛍光検出する原理とすることから、ALAに構造が類似しているアミノ酸の1種と考えられ、2種のアミノ酸(5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸(AHVA)、および5-アミノ-n-吉草酸(DAVA))について検討した(Fig. 3).

AHVAについては、市販試薬が存在しないため、Bielらの方法²¹⁾に従い、ALAより合成した。合成したAHVAを¹H NMR分析した結果、4位の炭素に結合するプロトン由来のカップリングが隣接する5位及び3位の炭素に結合するプロトン数からピーク数5になるところ、ピーク数7に分裂していた(Fig. 4 d)。この結果は、4位の炭素に結合するプロトンと5位及び3位の炭素に結合する2つのプロトンとの磁気的關係は非等価にあることを示しており、合成したAHVAはラセミ体であることが明らかとなった。3位の炭素に結合する2つのプロトンのピークはそれぞれ、 $\delta = 3.16$ (dd, $J = 16.2, 3.2$ Hz, 1H, 3-CH₂), 2.91 (dd, $J = 22.5, 9.4$, 1H, 3-CH₂)であった(Fig. 4 c)。また、化学シフト $\delta = 2.23$ -2.41のピークはピーク数10となっており、2位の炭素に結合する2つのプロトン及び隣接する3位のプロトンが全て非等価な関係

として解析した結果, *dubble dubble dublet* のピークが重なり合っていると考えられ, 2位の炭素に結合するプロトン由来のピークであることが確認できた(Fig. 4 c). 化学シフト $\delta = 1.66-1.87$ のピークはピーク数13となっており同様に解析を行った結果, 3位の炭素に結合するプロトンに由来するピークであることを確認した(Fig. 4 a). これらの結果から合成したAHVAはAHVAの構造を有していることを確認した.

合成したAHVAをアミノ酸分析法により分析した結果, リテンションタイムが45分であったことから, 発酵液中で検出したu.k. 1とリテンションタイムが一致した. すなわち, u.k. 1はAHVAと同定した. 合成したAHVAを分析標準品として, ALA生産開始後44時間後の培養液中のAHVAを定量した結果, $2.88 \pm 0.04 \text{ mM}(n=2)$ であった.

一方, DAVAは, 試薬を入手, アミノ酸分析法により分析した結果, リテンションタイムが52分であったことから発酵液中で検出したu.k. 2とリテンションタイムが一致し, u.k. 2はDAVAと同定した. 試薬のDAVAを分析標準品として, ALA生産開始後44時間後の培養液中のDAVAを定量した結果, $0.24 \pm 0.06 \text{ mM}(n=2)$ であった. 一方, 発酵液の精製及び結晶化を行い取得したAHVA粗結晶の比旋光度を測定した結果, $[\alpha]_D^{20} = +22.0 \pm 0.0 (n=3)$ であった. また, Herdiesの方法²²⁾に従って合成した(S)-(+)-AHVA及び(R)-(-)-AHVAを標準品とし, 光学分割カラムを用いたHPLC法により発酵液から取得したAHVA粗結晶を分析した結果, (R)-(-)-AHVAは検出されなかった(data not shown). この結果はCR-720株が(S)-(+)-AHVAを特異的に生成していることが明らかとなった.

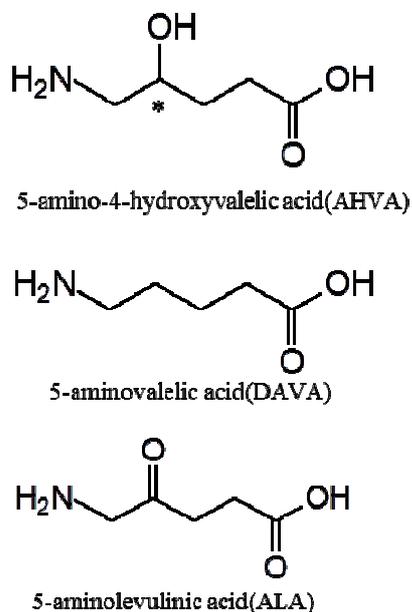


Fig. 3. Analogical structures of unknown peaks in the culture medium of strain CR-720. The chemical structure of 5-aminolevulinic acid (ALA), 5-amino-4-hydroxyvaleric acid (AHVA) and 5-aminovalelic acid (DAVA); *, asymmetric carbon in AHVA.

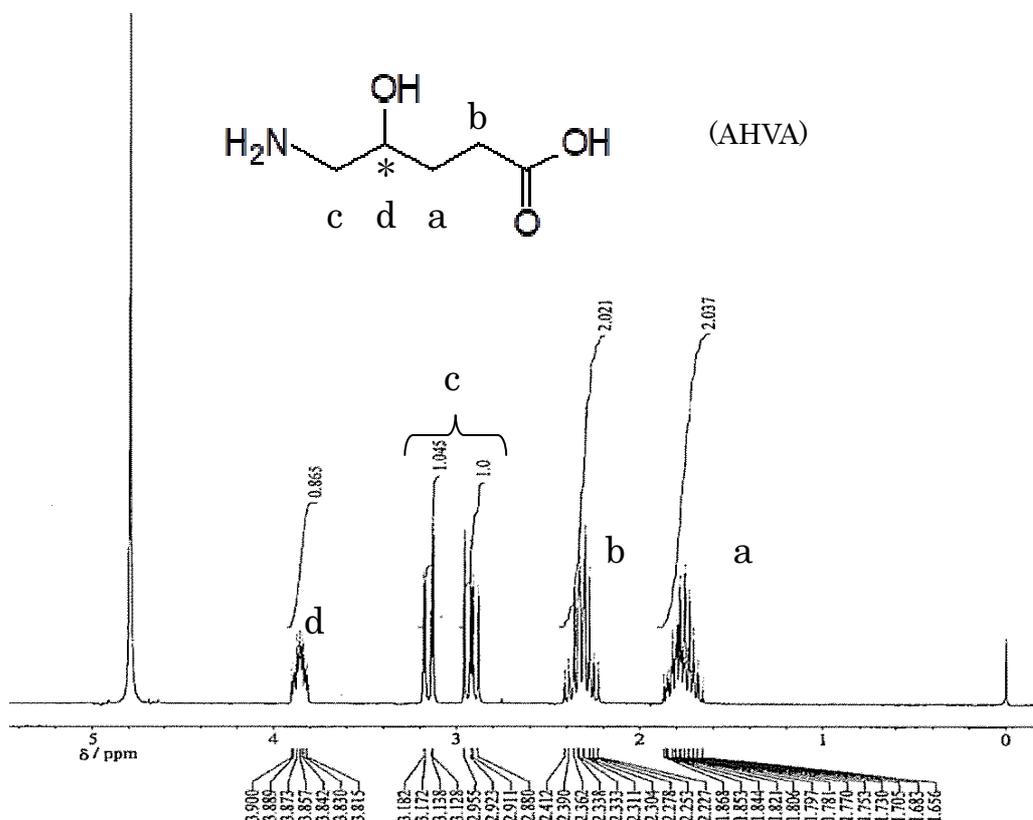


Fig. 4. ^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectrum of AHVA synthesized from ALA, sodium borohydride, and sodium hydrogen carbonate. AHVA was purified with ion-exchange resin, followed by NMR spectrometric analysis in D_2O (400 MHz). (a) $\delta = 1.66 - 1.87$ (m, 2H, 3- CH_2); (b) 2.23 - 2.41 (m, 2H, 2- CH_2); (c) 2.88 - 3.18 (m, 2H, 5- CH_2); (d) 3.86 (ddd, $J = 25.6, 12.8$ and 4.3 Hz, 1H, 4- $\text{CH}(\text{OH})$).

3. 3. 3 CR-720 株における AHVA 生成の温度依存性

AHVA は ALA 生産時に増加する不純物として低減する必要があったため、ALA 生産力価を可能な限り維持しながら AHVA の生成を低減する条件を検討した。培養温度により ALA 生産が変動する可能性があったことから、まず温度の影響について検討した。試験管を用いた ALA 生産評価法¹⁸⁾により、温度勾配装置を用いて CR-720 株の ALA 生産時の培養温度幅を 24~35 $^{\circ}\text{C}$ として、AHVA の生産挙動について検討した。その結果、ALA 生産は 26~32 $^{\circ}\text{C}$ の範囲で培養 20 時間後に約 40 mM を維持し、AHVA は 28 $^{\circ}\text{C}$ 以上の培養温度で増加し、35 $^{\circ}\text{C}$ では約 4 mM まで生成することを確認した(Fig. 5)。

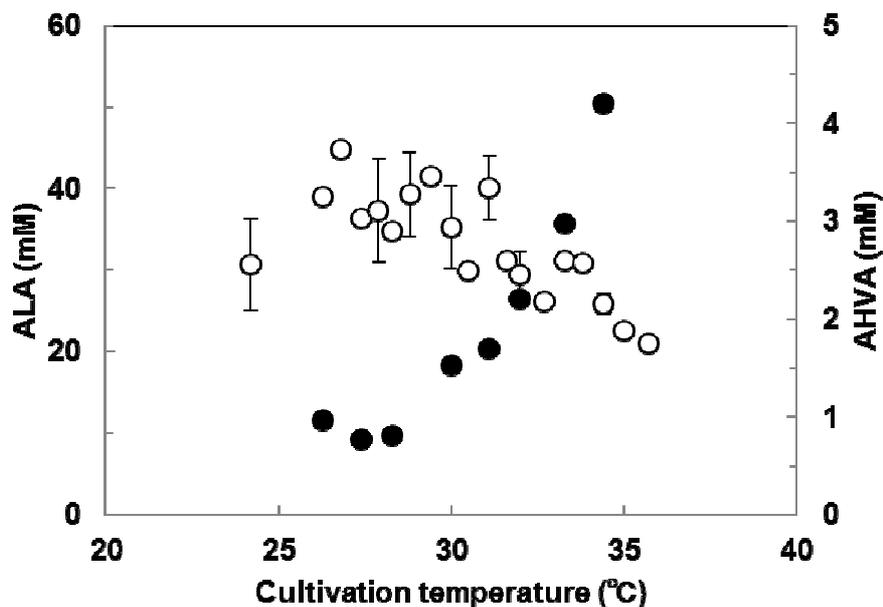


Fig. 5. Effects of cultivation temperature on AHVA and ALA production of strain CR-720 in 15 mm ϕ test tubes containing TT2 medium. 20 h after cultivation, glycine (120 mM), LA (5 mM), and yeast extract (2 g/L) were added. ●, AHVA; ○, ALA. The values represent the averages and standard deviations of duplicate experiments.

3. 3. 4 ALA 生産における CR-720 株の培養温度条件の設定

CR-720 株を培養温度 26, 28, 30, 32 及び 34 °C で 3 l 発酵槽にて生育させ, 23 時間後の菌体濃度はそれぞれ OD₆₆₀ = 3.8, 6.0, 8.9, 11, 及び 9.9 となった. 培養温度 28, 30 及び 32°C に設定した発酵槽の攪拌速度を 350 rpm に設定, グリシン, レブリン酸, 酵母エキス及びグルコースを添加したのち, 硫酸を用いて pH を 6.3 \pm 0.1 に調整し, ALA の生産を開始した. ALA の生産開始後, pH を硫酸を用いて 6.3 \pm 0.1 に自動調整した.

ALA の生産開始から 19 時間後の ALA 生産濃度は, 28, 30 及び 32°C 条件下でそれぞれ 28, 26 及び 26 mM を示し, ALA 生産速度は, 1.4~1.5 mM/h であった(Fig. 6 A). 一方, ALA の生産開始から 41 時間後の ALA 生産濃度はそれぞれ 44, 38 及び 40 mM であった. ALA の生産開始から 44 時間後までの ALA 生産速度は, それぞれ 1.1, 0.9, 及び 1.0 mM/h となった. 生産開始後 41 時間後の AHVA 生成量は, 28, 30 及び 32°C 条件下でそれぞれ 1.1, 2.1 及び 2.9 mM であった(Fig. 6 B). 生産開始後 41 時間後の菌体濃度(OD₆₆₀)は, 28, 30 及び 32°C 条件下でそれぞれ OD=11, 10 及び 6 であった(Fig. 6 C).

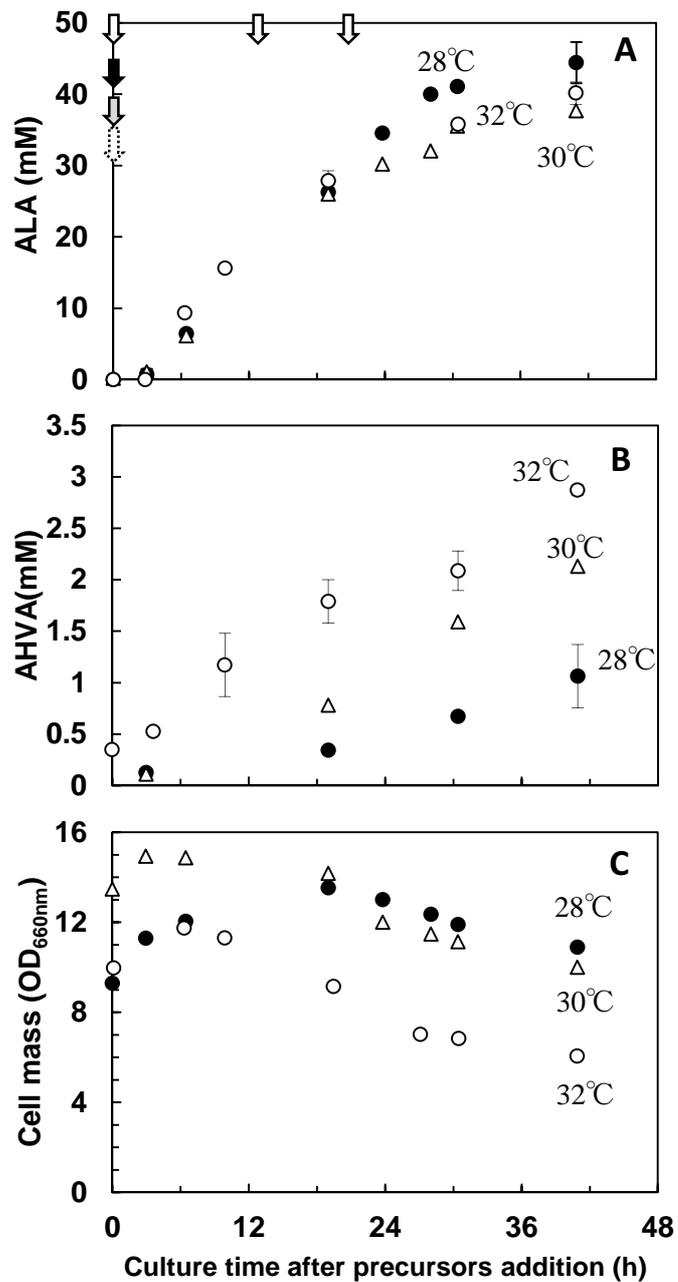


Fig. 6. Effects of temperature on AHVA and ALA production and cell mass of strain CR-720 in a 3-l jar fermenter with TT3 medium. Agitation and aeration were controlled at 350 rpm and 0.2 vvm, and pH was controlled at 6.3 ± 0.1 after addition of LA, glycine, yeast extract and glucose. (A) ALA production, (B) AHVA production, and (C) cell mass. ●, 28 °C; ○, 32 °C; △, 30 °C; ↓, LA addition (5 mM); ↓, glycine addition (60 mM); ↓, yeast extract addition (5 g/l); ↓, glucose addition (50 mM). The values represent the averages and standard deviations of triplicate experiments.

3. 3. 5 5 l 発酵槽用いた 28℃条件下での CR-720 株の ALA 生産濃度

現状の ALA 生産条件では、生産を開始させる際に、グリシン、レブリン酸、酵母エキス及びグルコース 4 種のプレカーサーを添加する。このまま工業プロセスに適用するには操作が煩雑になるうえ、コストアップ要因となるため ALA 生産の培地を簡略化した。すなわち酵母エキス(5 g/l)、及びグルコース(50 mM)を CR-720 株を、生育させる段階で培地に追加することとし、従来の TT2 培地から TT3 培地に変更した。これによりグリシンとレブリン酸の添加で、十分 ALA 生産が行えることとなった。また、5 l 発酵槽の酸素供給条件は、通気速度 0.02 vvm 条件下で攪拌速度により溶存酸素濃度(DO)を制御し、温度は 28℃で制御した。ALA, AHVA 生産及び菌体濃度の経時分析結果を Fig. 7 に示す。

CR-720 株は、通気速度 0.2 vvm 条件下で攪拌速度を 90~105 rpm に調節し、DO が 0.5 mg/l 以上残存する条件で生育させ、菌体濃度(OD₆₆₀)が OD = 13 に達した 24 時間後、攪拌速度を 90 rpm に低下した後、グリシン及びレブリン酸を添加して pH を 6.3 ± 0.1 に調整し ALA 生産を開始した。ALA の生産開始後は DO の上限値が 0.5 mg/l となるよう攪拌速度を調節した。生産開始から 39 時間までにグリシン(60 mM)を計 3 回添加し、このときの ALA 生産濃度は 59 mM、及び AHVA 生産濃度は 1.2 mM であった。また、生産開始から 39 時間までの ALA 生産速度は ALA 生産速度は 1.5 mM/h、菌体濃度(OD₆₆₀)は OD = 21 であった。さらに、グリシン(60 mM)を添加し培養を 12 時間継続したところ、ALA 生産濃度は 72 mM、及び AHVA 生産濃度は 1.9 mM となった。生産開始から 51 時間までの ALA 生産速度は 1.4 mM/h、菌体濃度(OD₆₆₀)は OD = 23 であった。グリシン消費量からの ALA 収率は約 30 % であった。生産開始から 32 時間後に DO が一時的に 0.7 mg/l を示したが、攪拌速度の調節によって生産を通じて DO は 0.5 mg/l 未満に調節できた。

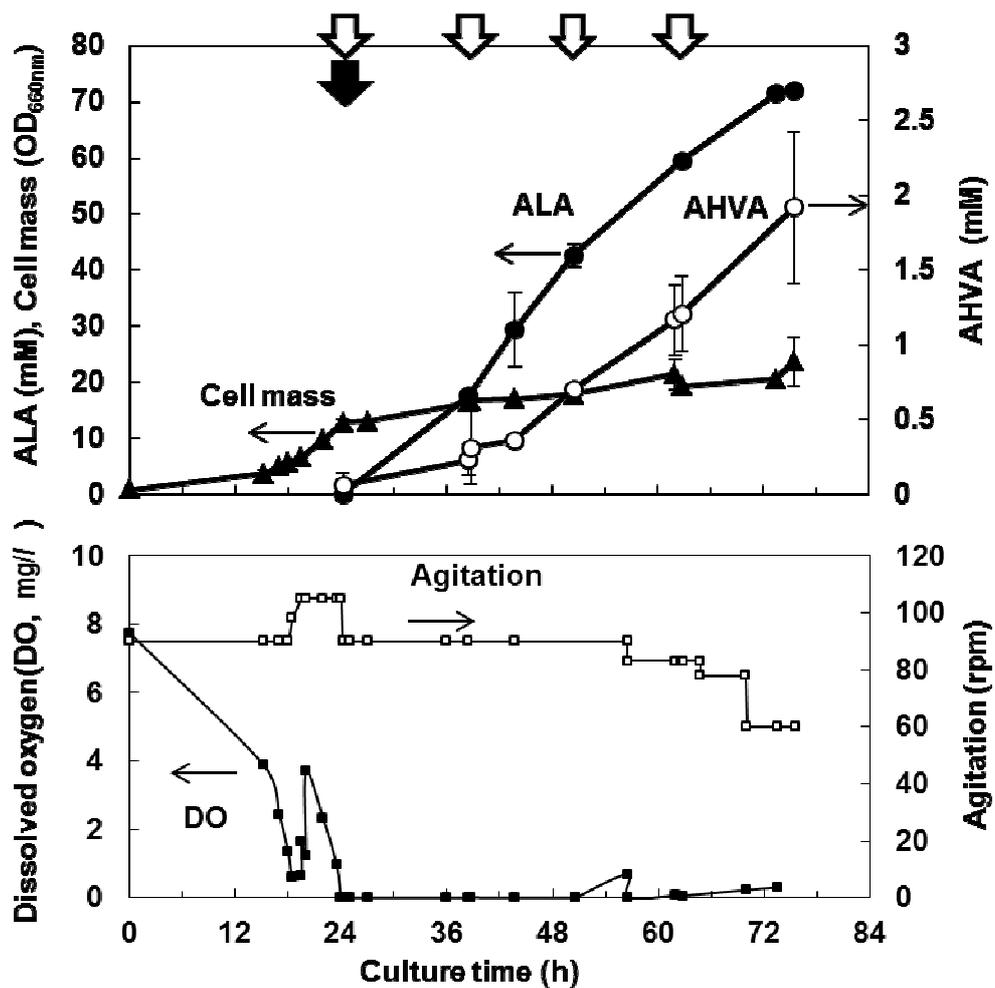


Fig. 7. ALA production from strain CR-720 controlled dissolved oxygen under 0.5 mg l^{-1} by agitation in a 5-kl jar fermenter containing TT3 medium. For ALA production, agitation and aeration were carried out at 60-90 rpm and 0.2 vvm, and pH was controlled at 6.3 ± 0.1 after addition of LA and glycine. ●, ALA production; ○, AHVA production; ▲, cell mass; ↓, LA addition (5 mM); ↓, glycine addition (60 mM). The values represent the averages and standard deviations of triplicate experiments.

3. 4 考察

今回, 5 l 発酵槽を用い CR-720 株によって得た ALA 生産濃度(72 mM)は, 最近の報告, *Rhodospseudomonas palustris* の *hemA* 遺伝子を含んだ *E. coli* による 39.3 mM¹³⁾, *Salmonella arizona* の *hemA* 遺伝子を含んだ *E. coli* による 31.5 mM¹⁶⁾ と比較して 1.8 倍以上, ならびに *E. coli* Rosetta(DE3)/pET28a(+)-*hemA* による 72 mM¹⁷⁾ と同等の結果であった. CR-720 株は遺伝子組換え体でないので, ALA 生産の安定性や実用性が高いと考えられる.

CR-720 株による 5 l 発酵槽での培養結果よりグリシン消費量は 210 mM となり, グリシンからの ALA の収率は 34 % であった, 前回の報告¹⁹⁾ と同等の結果となり, 遺伝子組み換え *E. coli* でのグリシンからの ALA 収率 54 % と比較して低かった. CR-720 株では 3 l 発酵槽でグリシンを合計 180 mM 添加した場合, ALA 生産時にアンモニアが約 100 mM 蓄積していることを確認しており, アンモニアなどの他の物質に代謝され, ALA 生産に用いられていないためと考えられる.

AHVA は, 光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* により ALA からの代謝産物として Shigesada らにより初めて報告された²⁴⁾. また, *Erythrobacter* 属の光合成細菌においても ALA からの代謝産物として AHVA が報告されている²⁵⁾. さらに *R. capsulatus* の菌体破碎抽出液を用いて ALA から AHVA が生成されることが報告されており, Biel らによって ALAD の関与が考察されている²¹⁾. CR-720 株は ALAD の競争阻害剤であるレブリン酸を添加しない場合, 添加した場合と比較して約 3 倍の AHVA が生成されることを 3 l 発酵槽で確認しており, CR-720 株においても AHVA の生成が ALAD と関与していると考えられる. CR-720 株では CR-520 株や CR-606 株と比較して ALAD 活性が約 2 倍になっており, AHVA の生成能は過去の変異株と比較して向上していたと考えられる. これまでの報告^{21,24-25)} では光合成細菌により生成される AHVA は鏡像異性体として特定されていなかったが, 今回, 筆者らは AHVA が光学異性体であり, CR-720 株が生産した AHVA は, (S)-(+)-AHVA であることを新たに確認した.

R. sphaeroides を用いた ALA 生産時の温度条件については, CR-520 株及び CR-606 株では 2 l 発酵槽を用いて 30°C で実施された報告¹⁸⁾ があり, CR-520 株, CR-606 株及び CR-720 株では 32°C 条件下で 2 l 発酵槽あるいは 3 l 発酵槽で実施してきた¹⁹⁾. CR-720 株を用いて, 試験管による ALA 生産試験にて ALA 生産時の温度条件を詳細に検討した結果, 32 °C 条件下 20 時間後では ALA 生産濃度が 30 mM のときに AHVA 生成濃度が 2.2 mM であったのに対して, 28 °C 条件下では ALA 生産濃度が 37 mM のときに AHVA 生成濃度が 0.81 mM を示し(Fig. 5), ALA 生産時の温度を 28 °C に変更することで AHVA の生成を抑制可能なことを確認し, さらに ALA 生産量を増大する可能性も見出すことができた.

R. sphaeroides による好気暗条件下での ALA 生産において通気速度及び攪拌速度の調節が効果的であり¹⁸⁾, CR-720 株では通気速度 0.2 vvm 条件下で ORP が -150 から -100 mV となる攪拌速度を設定し, 3 l 発酵槽において生産開始から 38 時間後に 52 mM 生産したことを報告した¹⁹⁾. ORP を指標にした生産制御についてはコエンザイム Q10 での例がある²⁶⁾. CR-720 株は, 好気暗条件下でグリシンとスクシニル CoA から ALAS を介して ALA を生産する能力

を有するが, ALAS が酸素に感受性をもつこととスクシニル CoA を供給するために十分に酸素供給が必要である点を両立させることが重要であった. 実生産規模の発酵槽でラボスケールの発酵槽と同等の ALA 生産濃度を実現するため, 酸素供給条件のスケールアップ指標を定めることが課題であった. ORP が-150 から-100 mV となる攪拌速度を 5 kl 以上の発酵槽で設定するためには, 同規模での複数の試験が必要となったためコストがかかる問題点があった. そこで筆者らは, 単位液量当たりの消費動力と k_{La} による検討を行った結果, 5 kl 発酵槽以上の発酵槽へのスケールアップには, $k_{La} = 24 \text{ h}^{-1}$ を満たす酸素供給条件の設定で小規模試験での ALA 生産力価と比較して 90% 以上の ALA 生産力価が得られることを確認した²⁷⁾. 一方, k_{La} 及び ALA 生産濃度と AHVA 生成量との関係を確認したが, いずれも明確な相関関係は見られなかった. Fig.5 に示す通り培養温度 28°C での AHVA 生成量に対し培養温度 30°C での AHVA 生成量は約 3 倍になっており, 培養温度の影響が k_{La} 及び ALA 生産濃度による影響より大きいと考えられる.

結果として, 本報では 5 kl 発酵槽を用いて ALA 生産時の攪拌速度の調節によって DO を 0.5 mg/l 未満に保つことで 1.4~1.5 mM/h の生産速度を保ち, 生産開始から 51 時間後にこれまでの報告と同等の ALA 生産濃度に相当する 72 mM の ALA 生産が可能となった. また, 生産開始から 26 時間後に ALA 生産濃度が 42 mM のときに AHVA 生成濃度は 0.7 mM, 生産開始から 51 時間後に 1.9 mM を示し, 培養温度 28°C 条件下で AHVA の生成を抑制できることを実生産規模の 5 kl 発酵槽でも確認できた.

3. 5 要約

光合成細菌変異株 *R. sphaeroides* CR-720 株は, 前駆体として 50 mM グルコース, 60 mM グリシン, ALA 脱水酵素阻害剤として 5 mM レブリン酸及び 5 g/l 酵母エキス存在下, 3 l 発酵槽で ALA を生産させたところ, ALA 生産に伴って増加する未知のアミノ酸を検出した. 未知のアミノ酸は 5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸(AHVA)と同定した. CR-720 株は培養温度 32°C 条件下で ALA を 41 mM 生産したとき AHVA を 2.9 mM 生産した. 光学異性体分離カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより, CR-720 株は(S)-(+)-AHVA を特異的に生産していることを確認した. 培養温度を検討した結果, 28°C で ALA を 44 mM 生産したとき, AHVA 生産量を 1.1 mM であった. さらに ALA 生産の培地を改良し, 5 kl 発酵槽を用いて培養温度 28°C および通気速度 0.02 vvm 一定条件下で攪拌速度を調節し溶存酸素濃度を 0.5 mg/l 以下に制御した結果, CR-720 株は最終的に AHVA の生成を 1.9 mM に抑制でき, ALA を 72 mM 生産し, 生産速度は 1.4 から 1.5 mM/h を得た.

3. 6 参考文献

- 1) Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., and Tanaka, T.: *App. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23-29(2002).
- 2) Mauzarall, D, and Granick, S.: *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-446(1956).

- 3) Rebiez, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H. J., and Wu, S. M.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 390-396(1984).
- 4) 田中 徹, 岩井一弥, 渡辺圭太郎, 堀田康司: 植物の化学調節, **40**, 22-29(2005)
- 5) 渡辺圭太郎, 船田茂行, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p.59(2008).
- 6) 船田茂行, 小堀寿浩, 藤田峰斎, 堂田正彦, 渡辺圭太郎, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p60(2008).
- 7) Awad, M. A.: *Sci. Hortic.*, **118**, 48-52(2008).
- 8) 渡辺圭太郎, 船田茂行, 小堀寿浩, 笛木正一, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会発表記録集, p.38(2007).
- 9) 船田茂行, 渡辺圭太郎, 田中 享, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p.39(2007).
- 10) 岩井一弥, 倉持仁志, 竹内安智: 芝草研究, **35**, 99-104(2007).
- 11) Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Tanaka, T., and Sugiyama, M.: *Nutrition*, **29**, 1030-1036(2013).
- 12) Komatsuya, K., Hata, M., Balogun, E. O., Hirosaka, K., Suzuki, S., Takahashi, K., Tanaka, T., Nakajima, M., Ogura, S., Sato, S., and Kita, K.: *J.Biochem.*, **154**, 501-504(2013).
- 13) Choi, H.-P., Lee, Y. -M., Yun, C. -W., and Sung, H. -C.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 1136-1140(2008).
- 14) Fu, W., Lin, J., and Cen, P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 777-782(2007).
- 15) Qin, G., Lin, J., Liu, X., and Cen, P.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 316-322(2006).
- 16) Kang, Z., Wang, Y., Gu, P., Wang, Q., Qi, Q.: *Metabol. Eng.*, **13**, 492-498(2011).
- 17) Yang J., Zhu, L., Fu, W., Lin, Y., Lin, J., and Cen, P.: *Chinese J. Chem. Eng.*, **21**, 1291-1295(2013).
- 18) Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 798-804(1999).
- 19) 田中 享, 西川誠司, 渡辺圭太郎, 田中 徹, 佐々木健: 生物工学, **88**, 455-462(2010).
- 20) 上山宏輝, 堀田康司, 田中 徹, 西川誠司, 佐々木健: 生物工学, **78**, 48-55(2000).
- 21) Biel, A. J., Canada, K., Huang, D., Indest, K., and Sullivan, K.: *J. Bacteriol.*, **184**, 1685-1692(2002).
- 22) Herdies, C.: *Synthesis*, **3**, 232-233(1986).
- 23) 安居嘉秀: 島津評論, 47, 365-372(1990).
- 24) Shigesada, K., Ebisuno, T., and Katsuki, H.: *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, **39**, 135-141(1970).
- 25) Shioi, Y., Doi, M., Tanabe, K., and Shinokawa, K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **266**, 478-485(1988).

- 26) Sakato, K., Tanaka, H., Shibata, S., and Kuratsu, Y.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **16**, 19-28(1992).
- 27) 船田茂行, 上田康信, 田中 享, 西川誠司: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.70(2006).

第 4 章

安定同位体標識グリシンを用いた光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* 変異株
CR-720 の 5-アミノレブリン酸生産におけるグリシン代謝解析

4. 1 緒言

5-アミノレブリン酸(ALA)は、ポルフィリン、ヘム、ビタミンB₁₂等、ポルフィリン誘導体生合成における最初の中間体として知られ、植物、動物、ヒトに広く分布している。チトクロムやヘモグロビンも全て ALA を経て合成され、全て生理的にも重要な物質である。ALA 生合成は、グリシンとスクシニル-CoA から ALA 合成酵素を経て生成される、いわゆる Shemin 経路(C-4 経路)と、グルタミン酸から生成される C-5 経路で主に行われる¹⁾。ALA は、ALA 脱水酵素(ALAD)により 2 分子が脱水縮合され、ピロール化合物であるポルフォビリノーゲン(PBG)を生成する。1950 年代に精力的に行われたポルフィリン誘導体生合成研究を通じて、細菌、動物、植物においてその最終産物であるポルフィリン誘導体の存在量に比べて、遊離の ALA や PBG の存在量が極めて少量であることが指摘され²⁾、多くの場合 ALA 合成がポルフィリン誘導体生合成における律速段階であることが知られている³⁻⁵⁾。

ALA は、Rebeiz らによって生分解性の農薬として報告された⁶⁾。ALA は毒性がなく分解性に優れており、現在は耐塩性などストレス条件下での植物に対する成長促進効果が報告され、農業分野で実用化されている⁷⁾。また、皮膚がんの光動学的治療⁸⁾や悪性神経膠腫の光動学的診断薬として実用化されており⁹⁾、最近では糖尿病予防薬としての効果¹⁰⁾や抗マラリア薬の可能性も報告されており¹¹⁾、医薬分野での開発が進んでいる。

ALA の生産については化学合成法が報告されている。しかし、化学合成法は収率が悪く、一部でしか実用化はされていない¹⁾。1970~1985 年までの微生物による ALA 生産研究では、光合成細菌、嫌気性菌、藻類などでほとんどが ALA 脱水酵素(ALAD)の競争阻害剤であるレブリン酸(LA)を培地に添加することで ALA 菌体外生産が認められているが、いずれも ALA 生産濃度は低かった¹⁾。最近では *Rhodobacter sphaeroides*, *Bradyrhizobium japonica* 及び *Agrobacterium radiobacter* の ALA 合成酵素遺伝子(*hemA*)を導入した *Escherichia coli* による ALA 生産に関する研究が行われており¹²⁻¹⁵⁾、溶存酸素濃度の制御を加えた培養条件下において、最大で 72 mM の生産が報告されている¹⁶⁾。

筆者らは、光合成能力ばかりでなく好気暗条件下でも呼吸により増殖でき、さらにポルフィリン生合成能を有する光合成細菌 *R. sphaeroides* を用いて、コスト的に優れる好気暗条件下でも ALA 生産が可能な菌の開発を進めた¹⁷⁾。その結果、*R. sphaeroides* 第 7 次変異株 (CR-720)による工業的な ALA 生産法を実用化した¹⁸⁾。

R. sphaeroides では C-4 経路が ALA 生合成の主経路とされる¹⁹⁾。しかし、CR-720 については ALA 生合成経路やグリシンの代謝経路はほとんど検討されていない。

今回は、グリシンの代謝に焦点を当て、安定同位体標識グリシン(グリシン-2-¹³C 及びグリシン-¹⁵N)を添加して、ALA 生産時の安定同位体 ¹³C 及び ¹⁵N の移行について GC/MS 分析によって検討した。

4. 2 実験方法

4. 2. 1 供試菌株と培地

R. sphaeroides CR-720 株は、著者らの実験室保有のものを使用した¹⁸⁾。菌体を生育させる培地はグルコース及び酵母エキスからなる TT2 培地を使用した¹⁸⁾。121°C, 20 分, 高压蒸気滅菌した後, 最終濃度が 150 mM となるよう別に滅菌した 2 M グルコース液を加えた。3 l 発酵槽の培地は, TT2 培地の酵母エキス濃度及びグルコース濃度を改変した TT3 培地を用いた。培地 1 l 当たりの組成は, グルタミン酸ナトリウム 1 水和物, 7.6 g; NaH₂PO₄·2H₂O, 4.37 g; Na₂HPO₄·12H₂O, 1.22 g; (NH₄)₂PO₄·2H₂O, 1.6 g; MgSO₄·7H₂O, 0.4 g; CaCl₂·2H₂O, 0.106 g; MnSO₄·5H₂O, 2.4 mg; FeCl₃, 3.24 mg; ニコチン酸, 2.0 mg; ビオチン, 0.02 mg; チアミン塩塩, 2.0 mg; 工業用酵母エキス(オリエンタル酵母工業社, 東京), 8 g; グルコース, 250 mmol から成る。酵母エキス以外の試薬は和光純薬工業社より購入した。

菌株は, 試験管(21 mmφ)では振幅幅 5 cm で 250 rpm, 仕込量 10 ml, 300 ml 容バツフル付三角フラスコでは, 回転半径 35 mm で 120 rpm でそれぞれ培養温度 32 °C で培養を行い生育させた。

4. 2. 2 ALA 生産条件

CR-720 株を TT2 培地 10 ml が入った 21 mmφ試験管に植菌し, 32°C で 48 時間培養を行った。試験管により培養後, 培養液を初期菌体濃度が濁度(OD₆₆₀) = 0.2 になるよう, 30 ml の TT2 培地が入った 300 ml 容バツフル付三角フラスコに植菌し, 32°C で 24 時間培養を行った。3 l 発酵槽(丸菱バイオエンジニアリング社, 東京)による菌体生育及び ALA 生産培養は, 培地を TT3 培地とし, フラスコ培養液を初期菌体濃度が OD₆₆₀ = 0.4 になるよう植菌し, 筆者らの方法に従って培養した¹⁸⁾。

試験管による ALA 生産試験は, 21 mmφ試験管を用いて培養液仕込量を 3 ml とし, 32°C で 20 時間培養を実施した。まず, フラスコ培養液を遠心分離(5,000 ×g, 10 分)により湿菌体を取得した。ALA の生産には酵母エキス添加量の増量が必要ならびに pH の上昇を抑制する必要があったため, GGY2 培地²⁰⁾を基にグルコース濃度を 100 mM に変更, ならびに酵母エキス(D-3, 和光純薬工業社, 大阪)の濃度を 10 g/l, Na₂HPO₄·12H₂O 濃度を 5.65 g/l 及び NaH₂PO₄·2H₂O 濃度を 5.35 g/l になるよう変更した培地(GGY10)を調製した。グルコース水溶液は 2 M で調整し酵母エキス, GGY10 培地とは別に 121°C, 20 分, 高压蒸気滅菌した。2.4 M グリシン水溶液を調製し, レブリン酸(和光純薬, 大阪)水溶液の濃度は 500 mM とし, pH が 6.5 になるよう NaOH 水溶液で調整し, 121°C, 20 分殺菌した。2.4 M グリシン水溶液は, 非標識グリシン(和光純薬工業社, 大阪), 2 位炭素に安定同位体 ¹³C が標識されたグリシン-²⁻¹³C 及びアミノ基の窒素に安定同位体 ¹⁵N が標識されたグリシン-¹⁵N(昭光通商社, 東京(現 SI サイエンス社, 埼玉))を用いて調製した。CR-720 株の湿菌体をフラスコ培養液の約 2 倍濃度(約 8 g dry cell weight/l)になるよう GGY10 培地に再懸濁し, この再懸濁液に対し酵母エキス水溶液を最終濃度が 10 g/l, レブリン酸水溶液を最終濃度が 1 mM, ならびにグリシン水溶液を最終濃度が 120 mM になるよう添加し, 21 mmφ試験管に 3 ml ずつ分注, 21 時間,

32°Cで振とう培養した。培養液は遠心分離を行い上清を取得し、上清を用いて各分析を行った。

4. 2. 3 ALA, アンモニア, コハク酸及びグリシンの分析

培養液のALA濃度は、Nishikawaらの方法に従って分析した²⁰⁾。コハク酸濃度は、F-キットコハク酸(TC succinic acid, ロシュ・ダイアグノスティック社, 東京)を用いて分析した。グリシン, アラニンおよびセリン濃度は、ポストカラム-オルトフタルアルデヒド法²¹⁾で分析した。

4. 2. 4 代謝物の誘導体化

CR-720株の代謝物を分析するため、試験管による培養液をMauzarallらの方法²⁾に従い、強酸性イオン交換樹脂IR-120B(オルガノ社製, 東京)13 mlを用いて、培養液30 mlを通液してALAを吸着させ、樹脂通過液を回収、有機酸や未吸着アミノ酸類の画分(スルー画分)として回収した。また、5%アンモニア水を用いて樹脂に吸着したALAを回収し、通過液をALA画分として回収した。

スルー画分及びALA画分中の成分を分析するため、Mackoらの方法²²⁾を参考にカルボン酸はブチル化、アミノ基はアシル化を行い成分の誘導体化を行った。

スルー画分及びALA画分それぞれ10 gを10 ml容ネジ口試験管に採取、窒素気流下で濃縮乾固し、1-ブタノール1 mlに塩化アセチル0.25 mlを加えた1-ブタノール溶液を添加し、試験管に栓をして100°Cで10分間反応させた。この反応液を窒素気流下で濃縮乾固し、0.25 mlのジクロロメタンを加え溶解させた後、トリフルオロ酢酸(TFAA)0.5 ml及びクロロホルム0.5 mlを加えて100°Cで10分間反応させた。さらに反応液を窒素気流下で過剰のTFAAを除去し、濃縮させた後にクロロホルムで再度溶解させ各0.5 mlの反応液を取得、当該反応液をGC/MS分析の試料とした。

同定のため、コハク酸, セリン, アラニン及びALA(和光純薬工業社, 大阪)を用いて同様の反応を行い、GC/MS分析試料を取得した。

4. 2. 5 誘導体化した代謝物の分析

GC/MS分析は、フェーズドシリカキャピラリーカラムDB1701(30 m x 0.25 mm, 0.25 mm膜厚; J&W Scientific, USA)を装着したガスクロマトグラフィーGC-7A(島津製作所社, 京都)を使用し、70 eVのイオン化電圧でQP-5000(島津製作所, 京都)を用いて実施した。25 kPaのヘリウムガスを用いてインターフェース温度を230°Cとし、スプリットレスでGC/MS分析試料を0.5 ml注入した。カラムは90°Cで15分間保持したのち、180°Cまで3°C/minで上昇させ、4°C/minで220°Cまで昇温、220°Cで20分間保持した。データは、Class5000(島津製作所社, 京都)を用いて収集した。選択したフラグメントイオンデータは、0.5 sのスキャンインターバルとした。サンプルは少なくとも3回分析した。コハク酸, アラニン, セリン及びALA反応液の分析結果から得たトータルイオンクロマトグラフィーのリテンションタイム及びマ

スペクトルデータを比較対照としてスルー画分及び ALA 画分中の代謝物の解析を行った。

4. 3 実験結果

4. 3. 1 ALA 生産時のアンモニア生成

CR-720 株は、3 l 発酵槽で 24 時間菌体を生育させた後にグリシン及びレブリン酸を添加した後、最終濃度 60 mM となるようグリシンを 2 回さらに添加して 68 時間培養した結果、ALA を 43 mM 生産した(Fig. 1)。培養中に生産を継続的に行うため pH を 6.4 に調整しながら培養を継続した結果、硫酸を常に添加する必要があるため、塩基性成分の増加が考えられた。塩基性成分の一つとして、アンモニアが考えられたため、アンモニアの経時的変化を確認するためアンモニアを分析した結果、グリシン添加後に急激に増加し始めた。培養 50 時間後にはアンモニア生成量は 98 mM に達し、さらに 18 時間培養を継続した結果、アンモニア生成量は 107 mM となり ALA 生産量は 43 mM でほぼ停止していた。

最終濃度として 180 mM 添加したグリシンが、アンモニア発生源と考えられ、ALA の生産に影響していると考えグリシンの代謝について検討した。

安定同位体 ^{13}C 及び ^{15}N で標識されたグリシンを用いて ALA 生産を実施し、培養上清を取得した上で ALA 及び ALA 以外の代謝産物についてカルボキシル基は 1-ブタノールによるブチル化、ならびにアミノ基は無水テトラフルオロ酢酸を用いて誘導体化し、GC/MS 分析によるグリシンの代謝解析を行った。

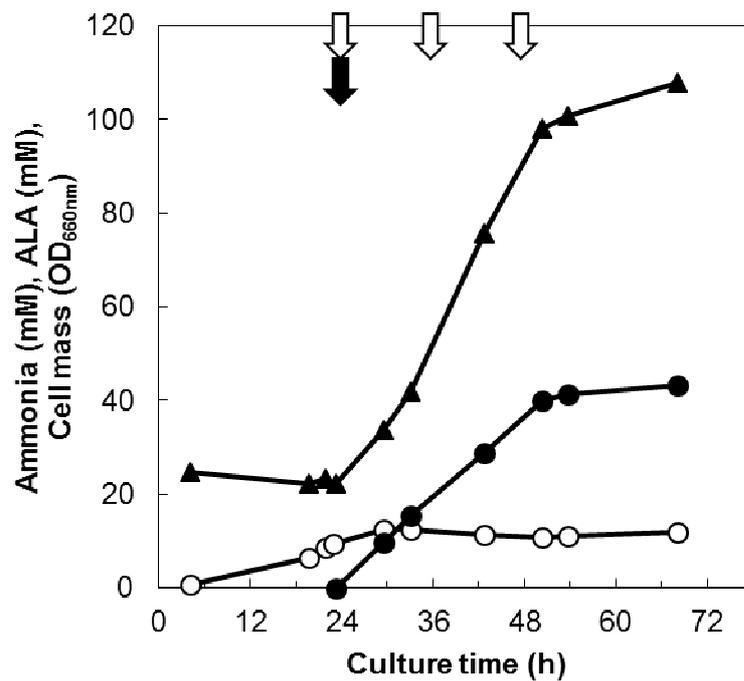


Fig. 1 5-aminolevulinic acid (ALA) and ammonia (NH_4^+) production of *R. sphaeroides* CR-720 in a TT3 medium at 32 °C using 3-l jar fermenter. ●, ALA production; ▲, NH_4^+ production; ○, Cell mass; ↓, levulinic acid (LA, 5 mM) addition; ↓, glycine (Gly, 60 mM) addition. The values represent the averages of triplicate experiments.

4. 3. 2 安定同位体(^{13}C 及び ^{15}N)の代謝産物への移行

グリシンの代謝に関与すると考えられたコハク酸、セリン及びアラニン、ならびに ALA のマススペクトルを解析した。トータルイオンクロマトグラム上でスルー画分及び ALA 画分に含まれる代謝産物を調べた結果、スルー画分にコハク酸をリテンションタイム 37 min に、セリンを 32 min に、アラニンを 23 min、グリシンを 26 min に検出した。また、ALA 画分には ALA を 47 min に主要ピークとして検出した。それぞれマススペクトルデータを取得し安定同位体の移行を調べた。

グリシン-2- ^{13}C を用いた培養液から取得したスルー画分に含まれるコハク酸誘導体のマススペクトルよりフラグメント($m/Z = 101$)を解析した結果、非標識グリシン由来の吸着スルー画分中のコハク酸と比較して、フラグメント($m/Z = 101+1$)の相対強度が 10 %増加した (Fig. 2 A)。 $m/Z = 101+2$ のフラグメントの相対強度も約 6%増加していたことから、コハク酸の 1 位炭素には約 10 %の ^{13}C が移行されていることが明らかとなった。

また、グリシン-2- ^{13}C を用いた培養液から取得したスルー画分に含まれるアラニンのフラグメント($m/Z = 140$)を解析した結果、非標識グリシン由来のスルー画分に含まれるアラニンと比較してフラグメント($m/Z = 140+1$)の相対強度に増加はなかったが、フラグメント($m/Z = 140+2$)の相対強度が 8 %増加した (Fig. 2 B)。さらに $m/Z = 140+3$ のフラグメントを 1.9 %検出し、 $m/Z = 140+4$ のフラグメントまで検出した。 $m/Z = 140+1$ のフラグメントには変化がなく、 $m/Z = 140+2$, $140+3$, 及び $140+4$ フラグメントが検出されたことは、アラニンの 2 位あるいは 3 位の炭素に部分的に ^{13}C が移行されているのではなく、2 位及び 3 位の炭素にほぼ同じ割合で ^{13}C が移行されていることを示し、 $m/Z = 140+2$ の増分からアラニンにもグリシン-2- ^{13}C 由来の ^{13}C が 8 %移行していることが明らかとなった。

一方、グリシン- ^{15}N 由来のスルー画分のアラニンでは、 $m/Z = 140+1$ のフラグメントの相対強度が非標識由来の相対強度の約 2 倍(69.5 %)を示していた (Fig. 2 B)。また、 $m/Z = 140+2$ のフラグメントの相対強度は非標識グリシンのフラグメントの約 8 倍(15.8 %)を示した。このことはアラニンにグリシン- ^{15}N 由来の ^{15}N が約 50 %移行されたことを示しており、グリシンからのアラニン生成が確認された。

グリシン-2- ^{13}C 及び非標識を用いた培養液から得たスルー画分のセリンのマススペクトルを解析した結果、グリシン-2- ^{13}C を用いた場合のセリンのフラグメント($m/Z = 139+1$)の相対強度は、非標識グリシンを用いた場合のセリンのフラグメント($m/Z = 139+1$)の相対強度の約 3 倍であった (Fig. 2 C)。また、 $m/Z = 139+2$ のフラグメントは、非標識グリシンを用いた場合では検出されなかったが、グリシン-2- ^{13}C を用いた場合のセリンからは 18 %の相対強度で検出された。

この結果は、グリシン-2- ^{13}C 由来の ^{13}C がセリンの 2 位及び 3 位の炭素に 2 つ移行されていることを示す。

一方、グリシン- ^{15}N を用いた培養液から得たスルー画分に含まれるセリンでは、 $m/Z = 139+1$ のフラグメントの相対強度は、非標識のグリシンを用いた場合の約 5 倍の相対強度を

示した この結果から、セリンにグリシン-¹⁵N 由来の ¹⁵N が約 80 % 移行された。

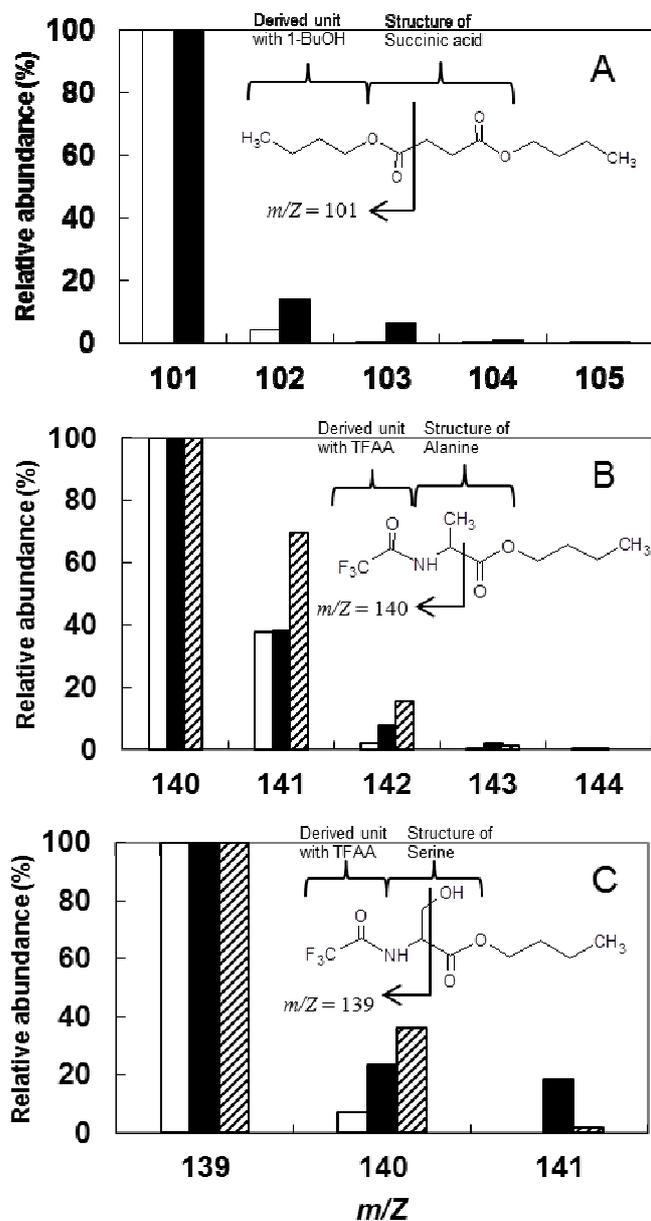


Fig. 2 Mass spectrum of succinic acid (SA), alanine (Ala) and serine (Ser) derivatives. GC/MS total ion chromatogram of a reaction mixture with 1-butanol, trifluoroacetic acid and a through-out fraction obtained from the culture medium of strain CR-720 with unlabeled glycine, glycine-2-¹³C and glycine-¹⁵N. (A), SA derivative; (B), Ala derivative; (C), Ser derivative; □, fragment ions of respective derivative of a compound in through-out fraction obtained from culture medium with unlabeled glycine; ■, with glycine-2-¹³C; ▨, with glycine-¹⁵N. TFAA, trifluoroacetic acid; 1-BuOH, 1-butanol. The values represent the averages of triplicate experiments.

4. 3. 3 安定同位体(¹³C 及び ¹⁵N)の ALA への移行

誘導体化した ALA のマススペクトルにおけるフラグメント($m/Z = 126$)を解析した結果、非標識グリシン由来の ALA の場合、 $m/Z = 126$ のフラグメントを 100%として、 $m/Z = 126+1$ のフラグメントを 40%検出、また $m/Z = 126+2$ のフラグメントを 2.2%を検出した。グリシン-¹⁵N 由来の ALA の場合は、主要なフラグメントが $m/Z = 126+1$ となり、 $m/Z = 126+2$ のフラグメントの相対強度は 35%を示した (Fig. 3 A)。この結果はグリシン由来の殆どのアミノ基の窒素が ALA のアミノ基の窒素に移行されたことを示した。また、グリシン-2-¹³C 由来の ALA も同様に解析され、 $m/Z = 126+2$ のフラグメントが相対強度 38%で検出された。この結果は ALA の 5 位炭素にグリシン由来の ¹³C が移行されたことを示す。

一方、誘導体化した ALA のフラグメント($m/Z = 101$)を解析した結果、グリシン-2-¹³C を用いて得られた ALA ではフラグメント($m/Z = 101+1$)が、非標識グリシンを用いて得られた ALA のフラグメント($m/Z = 101+1$)の相対強度 4.2% に対して約 4 倍の相対強度 (17.6%) を示した (Fig. 3 B)。 $m/Z = 101+2$ のフラグメントの相対強度も 13% 検出されており非標識グリシン由来の ALA に対して約 10 倍の相対強度を示した。さらに $m/Z = 101+3$ までフラグメントが検出されていた。この結果は、 $m/Z = 101+1$ のフラグメントの相対強度差から ALA の 1 位の炭素に ¹³C がおよそ 13% 移行されたことを示す。

また、フラグメント($m/Z = 182$)を解析した結果、非標識グリシン由来の ALA では $m/Z = 182$ のフラグメントの相対強度を 100%とした場合、 $m/Z = 182+1$ のフラグメントが相対強度 9.8%で検出され、 $m/Z = 182+2$ のフラグメントは検出されなかった (Fig. 3 C)。グリシン-¹⁵N 由来の ALA では、 $m/Z = 182+1$ のフラグメントが主要であり $m/Z = 182+2$ のフラグメントが相対強度 7.2%で検出された。この結果は Fig. 3 A と同様、グリシン由来の ¹⁵N の殆どが ALA に移行したことを示す。また、非標識グリシン由来の $m/Z = 182+1$ のフラグメントの相対強度とグリシン-¹⁵N 由来の $m/Z = 182+2$ の相対強度差より ¹⁵N の移行割合には約 3%の差があることがわかり、ALA のアミノ基窒素には添加したグリシン-¹⁵N 由来の ¹⁵N がおよそ 97% 移行された。

グリシン-2-¹³C を用いて得られた ALA でも、フラグメント($m/Z = 182+1$)が主要なフラグメントとなった (Fig. 3 C)。この結果は、Fig. 3 A の結果と併せグリシン-2-¹³C 由来の ¹³C の殆どが ALA の 5 位の炭素に移行したことを示す。一方、非標識グリシンを用いて得られた ALA では全く検出しなかった $m/Z = 182+2$ のフラグメントは、グリシン-2-¹³C 由来の ALA では 31%の相対強度を示した。この結果は非標識グリシンを用いた場合の ALA の $m/Z = 182+1$ のフラグメントの相対強度 9.8%との差異から、5 位の炭素以外に 21%さらに ¹³C が移行されていることを示す。また、 $m/Z = 182+3$ のフラグメントを相対強度 11%で検出し、さらに $m/Z = 182+4$ にもフラグメントを 2%の相対強度で検出した。この結果は、Fig. 3 A に示した ALA の 5 位炭素に加えて 2~4 位の炭素に 2 つの ¹³C が移行されたことが明らかとなった。

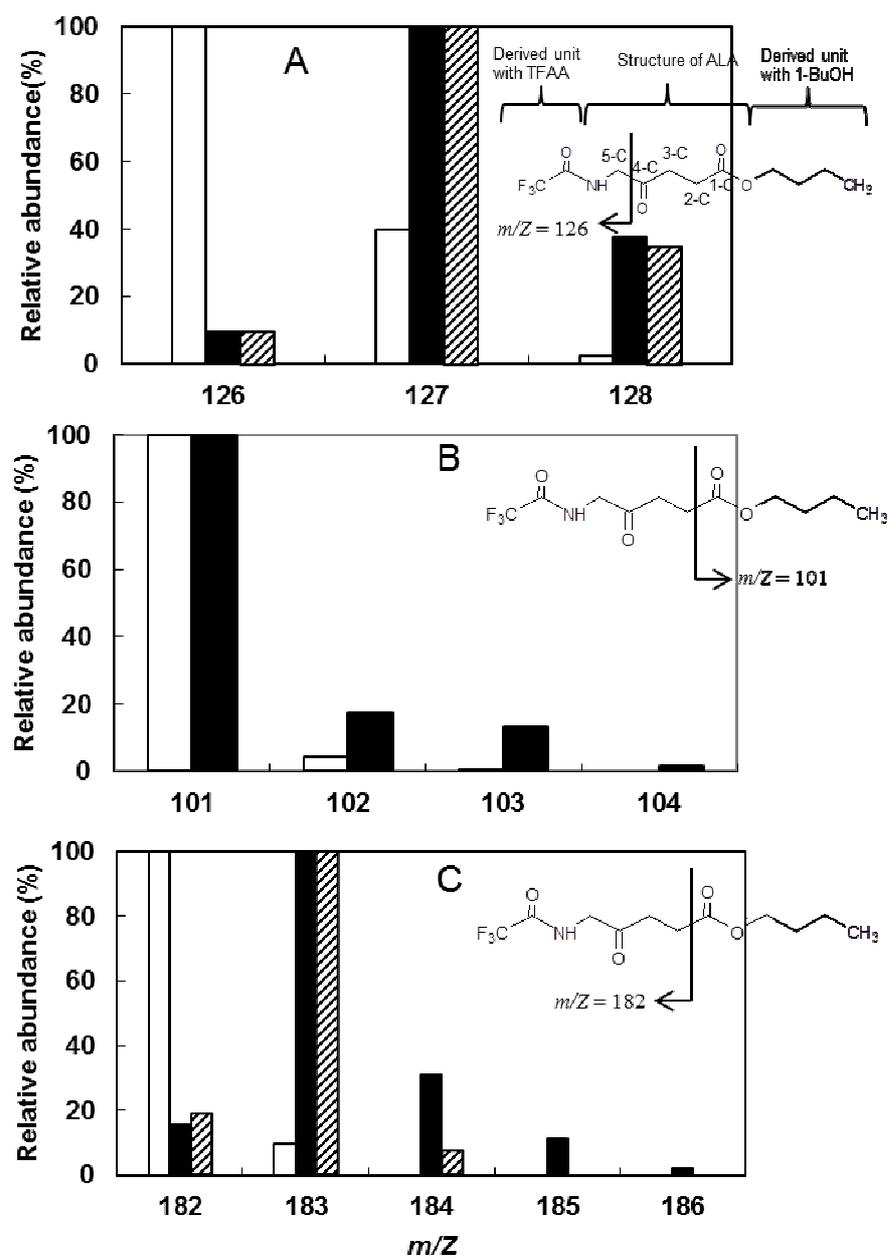


Fig. 3 Mass spectrum of ALA derivative. GC/MS total ion chromatogram of a reaction mixture with 1-butanol, trifluoroacetic acid and an ALA fraction obtained from the culture medium of strain CR-720 with unlabeled glycine, glycine-2-¹³C and glycine-¹⁵N. (A), fragment ion ($m/Z = 126$); (B), fragment ion ($m/Z = 101$); (C), fragment ion ($m/Z = 182$) of derived ALA; □, fragment ions of derived ALA in ALA fraction obtained from culture medium with unlabeled glycine; ■, with glycine-2-¹³C; ▨, with glycine-¹⁵N. TFAA, trifluoroacetic acid; 1-BuOH, 1-butanol. The values represent the averages of triplicate experiments.

4. 3. 4 安定同位体の代謝産物及び ALA への回収率

培養液に含まれる残存グリシン, コハク酸, セリン, アラニン, ALA 及びアンモニアの濃度分析結果, ならびにアンモニア以外の各成分について, 安定同位体(^{13}C 及び ^{15}N)の移行割合結果(Fig. 2 及び Fig. 3)から各安定同位体の回収率を算出した結果を Table 1 に示す. グリシンの ^{13}C 及び ^{15}N 回収率は, マススペクトルより残存グリシンの安定同位体の含有割合がほぼ 100%であったことから, 消費したグリシンについての回収率として 100%とした.

Fig. 2 A の結果から, コハク酸への ^{13}C 移行割合はおよそ 10%であったことから, 培養液に含まれる濃度の 10%に ^{13}C が含まれることになり, 0.63 mM のコハク酸に ^{13}C が移行していた. 添加した安定同位体グリシンは 120 mM, 及び残存グリシン濃度が 30.7 mM であったことから, CR-720 が利用したグリシン濃度は 89.3 mM となり, 利用したグリシンからのコハク酸中の ^{13}C 回収率は 0.7%となった.

同様に, Fig. 2 B の結果からグリシン-2- ^{13}C からのアラニンへの ^{13}C の回収率は 0.11%, グリシン- ^{15}N からのアラニンへの ^{15}N 回収率は 0.33%となった. なお, アラニンの 2 位及び 3 位の炭素に ^{13}C が移行していたことから, 2 分子のグリシン-2- ^{13}C の ^{13}C が 1 分子のアラニンに導入されたことを考慮し算出した.

また, Fig. 2 C の結果からセリンへ ^{13}C が 2 位及び 3 位に回収されていたことから, グリシン-2- ^{13}C からの ^{13}C の回収率は 0.45%, グリシン- ^{15}N からのセリンへの ^{15}N の回収率は, 0.98%となった.

一方, Fig. 3 B の結果から, ALA の 1 位炭素に ^{13}C が 13%移行していたことから, ALA 濃度 34.7 mM のうち, ALA の 1 位炭素にはグリシン-2- ^{13}C 由来の ^{13}C が 5.1%回収された. また, Fig. 3 C の結果から ALA の 2~4 位の 2 個の炭素にグリシン-2- ^{13}C 由来の ^{13}C が 21%移行していたことから, ALA の 2~4 位にグリシン-2- ^{13}C 由来の ^{13}C が 16%回収されていることが明らかとなった.

Fig. 3 A の結果からは, グリシン-2- ^{13}C から ALA の 5 位炭素に ^{13}C が 98%移行していたことから, グリシン-2- ^{13}C からの ALA の 5 位炭素への ^{13}C の回収率は 38%となった. グリシン- ^{15}N から ALA のアミノ基の窒素に ^{15}N が 95%移行していたことから, ^{15}N 回収率は 37%となった.

今回の結果から, CR-720 が消費したグリシン-2- ^{13}C の ^{13}C は, コハク酸, セリン, アラニン 及び ALA の炭素に 60%回収され, グリシン- ^{15}N の ^{15}N は, アンモニアを除き 38%回収された.

Table 1 Fate of labeled glycine with ^{13}C and ^{15}N stable isotopes during ALA production of *R. sphaeroides* CR-720 using TT3 medium after 21 h culture.

Compounds in culture medium	Concentration (mM)	Recovery of ^{13}C (%)	Recovery of ^{15}N (%)
Glycine	30.7 ± 4.3	100 ^{*1}	100 ^{*1}
Succinic acid	6.3 ± 0.8	0.71 ^{*2}	-
Serine	1.1 ± 0.0	0.45 ^{*2}	0.98 ^{*2}
Alanine	0.6 ± 0.1	0.11 ^{*2}	0.33 ^{*2}
ALA	34.7 ± 0.9	38(5 th - ^{13}C) ^{*2} 5.1(1 st - ^{13}C) ^{*2} 16(2 nd -4 th - ^{13}C) ^{*2}	37 ^{*2}
NH_4^+	52.0 ± 2.8	-	N.D. ^{*3}

*1 Recovery of stable isotopes after the consumption of glycine (total additional glycine(120 mM) - residual glycine(30.7 mM) = 89.3 mM).

*2 Calculated recovery from the rate of stable isotope incorporation of respective compounds based on the consumption of glycine (e.g., concentration of succinic acid; 6.3 mM \times incorporation of ^{13}C label to succinic acid; 10% (Fig. 2 A) / consumption of glycine \times 100).

*3 N.D., not determined

4. 4 考察

R. sphaeroides は、グリシンとスクシニル CoA から、いわゆる C4 経路で ALA を合成するといわれており¹⁹⁾, CR-720 による安定同位体を用いた培養と GC/MS 分析により、生産された ALA はグリシンの 2 位炭素がほぼ全て 5 位炭素に移行され、グリシンのアミノ基窒素も ALA のアミノ基にはほぼ全て移行されていたことから、C4 経路で ALA を生産することを確認した。グリシン-2-¹³C から ALA の 5 位炭素への ¹³C 回収率が 38%, ならびにグリシン-¹⁵N からの ALA のアミノ基窒素への ¹⁵N 回収率が 37% となったことは、既に報告した発酵槽による ALA 生産での CR-720 株におけるグリシンからの ALA 回収率 30%²³⁾と比較して 7% 程度高い数値となった。今回の条件は生産開始時のグリシン添加条件が 120 mM, 1 回に対し、既報告では 60 mM であり、発酵槽では 3 回に分けて合計 240 mM 添加し、培養を 72 時間実施している。発酵槽では培養後半にグリシンの消費速度に変化は無いが、ALA の生産速度が低下する傾向にあることから、グリシンから ALA の回収率は培養を継続するにつれて低下する傾向にあると考えられる。

一方で、*Escherichia coli* 由来の酵素によるセリンからグリシンの生合成について報告されており、この反応はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(SHMT)を触媒とした反応であり可逆であることが知られている²⁴⁾。SHMT は C₁ 輸送体としてのテトラヒドロ葉酸を介したセリンとグリシンとの可逆的な反応を触媒し、この反応にはグリシンからテトラヒドロ葉酸へのメチレン供与に伴って炭酸ガスとアンモニアを発生する反応系(グリシン開裂系)を含む²⁵⁾。

CR-720 株では、グリシンからセリンが合成されていることが確認できた(Fig. 4)。CR-720 株でもグリシンの代謝に SHMT が関与していると考えられ、アンモニア発生源の一つとなっているものと考えられる。光合成細菌変異株(*R. sphaeroides* CR-286, CR-386, CR-450, CR-520 及び CR-606 株) もまた ALA 生産に伴いアンモニアを生成することから、SHMT を有すると考えられる(data not shown)。

ALA の 1 位炭素に ¹³C が移行された結果(Fig. 3A)から、セリンからピルビン酸が生成されたのちトリカルボン酸回路(TCA 回路)を経てスクシニル CoA(Suc-CoA)が生成(Fig. 4)、ALA 合成酵素(ALAS)により ALA が生成されたと考えられた。また、セリンの 2 位及び 3 位炭素にグリシン-2-¹³C 由来の炭素が移行された結果(Fig. 2 C)より、ALA の 2 つの炭素(1 位及び 2 位の炭素、あるいは 4 位の炭素)に移行されたものと推測される。TCA 回路におけるクエン酸から cis アコニット酸への変換で安定同位体の標識位置が異なる cis アコニット酸が生成し、 α ケトグルタル酸(α -KG)から Suc-CoA への変換は脱炭酸を伴うため、一部の ¹³C はこの反応により炭酸ガスになったものと考えられる。Table 1 の結果から ALA の 1 位及び 2 位の炭素にグリシン-2-¹³C 由来の ¹³C が 5.1% 回収され、2~4 位炭素への回収率が 16% であったことから 5.1% を差し引いた 11% の ¹³C が ALA の 4 位の炭素に回収されたと考えられる。この結果から少なくとも 11% の ¹³C が α -KG から Suc-CoA が生成される過程で炭酸ガスとして抜けていったものと考えられる。消費されたグリシン-2-¹³C からコハク酸、セリン、アラ

ニン及び ALA への ^{13}C 回収率は 60% であり (Table 1), 11 % が Suc-CoA 生成による脱炭酸としても残りの 29 % (25.9 mM) は不明である.

グリシンからセリンへの変換は, ^{15}N の移行でも確認できた (Fig. 2 C). *Corynebacterium glutamicum* の遺伝子組換え体での変換は報告されている²⁶⁾が, *R. sphaeroides* による報告例はない. 今回の結果から, CR-720 において新規にグリシンからセリンへの変換が確認できた. グリシンからのセリン合成はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT) とグリシン開裂系が関与することが考えられ, CR-720 株では ALA 生産におけるグリシン代謝は, SHMT とグリシン開裂系が重要な役割を果たしていると考えられる.

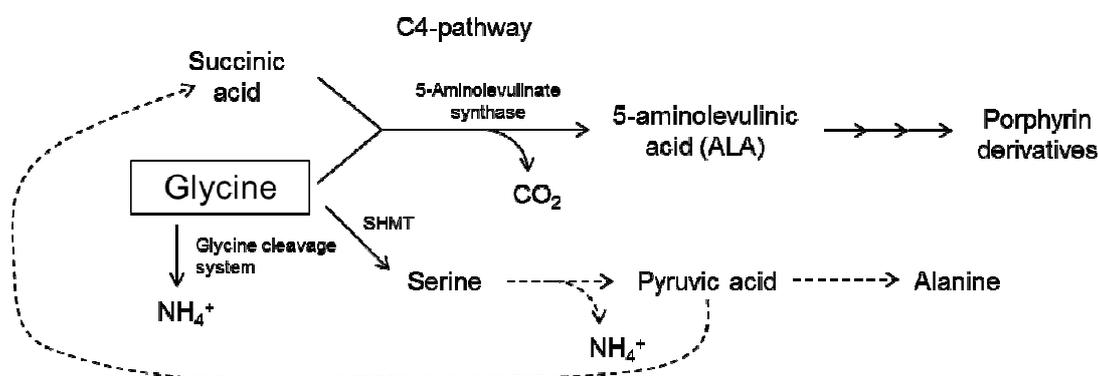


Fig. 4 Estimated fate of glycine- ^{13}C and glycine- ^{15}N to ALA and NH_4^+ and metabolites (succinic acid, serine and alanine) in strain CR-720. SHMT, serine hydroxymethyltransferase.

4. 5 要約

光合成細菌変異株 *Rhodobacter sphaeroides* CR-720 株は, 前駆体として 60 mM グリシン及び 5-アミノレブリン酸 (ALA) 脱水酵素阻害剤として 5 mM レブリン酸存在下, 3 l 発酵槽で 68 時間培養後に ALA を 43 mM 生産した. CR-720 株を用いた ALA 生産では pH 上昇を伴うため硫酸による継続的な 6.3 ± 0.1 での pH 調整が必要であった. アンモニアは ALA の生産に伴って増加し, 68 時間後に 108 mM に達した. さらに CR-720 が 50 時間後にアンモニア生成が 100 mM に達したとき, ALA の生産はほぼ停止していた. ALA の前駆体としてグリシンを合計 180 mM 添加しており, 添加直後より経時的にアンモニアが増加していたことから, グリシンがアンモニアの主要な発生源と考え, 安定同位体(グリシン- ^{13}C 及びグリシン- ^{15}N)を用いて試験管による ALA 生産を行い, 代謝産物をトリフルオロ酢酸及び 1-ブタノールを用いて誘導体化した後, GC/MS によって誘導体化した代謝産物を分析し解析を行った. CR-720 は 21 時間後に ALA を 34.7 mM 生産し, 代謝産物としてコハク酸を 6.3 mM, セリンを 1.1 mM 及びアラニン を 0.6 mM 生成し, アンモニアを 52 mM 生成した. 代謝産物への安定同位体(^{13}C 及び ^{15}N)の移行を調べるため, 培養液の代謝産物をトリフルオロ酢酸及び 1-

ブタノールを用いて誘導体化したのち GC/MS 分析した。その結果、コハク酸の 1 位炭素に ^{13}C が 10 % 移行していた。アラニンの 2 位及び 3 位の炭素には ^{13}C が 8 %, アラニンの窒素には ^{15}N が 50 % 移行していた。また、セリンの 2 位及び 3 位の炭素には ^{13}C が 18 %, セリンの窒素には ^{15}N が 80 % 移行していた。さらに ALA では ^{13}C が 5 位の炭素に 98 %, 1 位炭素に 13 % ならびに 2-4 位の炭素に 21 % 移行し, ^{15}N が窒素に 95 % 移行していた。今回, CR-720 株はグリシンからセリンを生成することを確認した。グリシンからのセリン合成はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(SHMT)とグリシン開裂系が関与することが考えられ, CR-720 株では ALA 生産におけるグリシン代謝は, SHMT とグリシン開裂系が重要な役割を果たしていると考えられる。

4. 6 参考文献

- 1) Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., and Tanaka, T.: *App. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23-29(2002).
- 2) Mauzarall, D, and Granick, S.: *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-446(1956).
- 3) Sasikara, C. H., and Ramana, C. H.: *Advances Appl. Microbiol.*, **41**, 227-228(1995).
- 4) Ellen L.,KaplanS.: *J. Bacteriol.*, **175**, 2292-2303(1993).
- 5) Lascelles J.:The photosynthetic bacteria Plenum Press, New York, 795-808(1978).
- 6) Rebeiz, C. A., M-Zouhoor, A., Hopen, H. J., and Wu, S. M.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 390-401(1984).
- 7) 田中 徹, 岩井一弥, 渡辺圭太郎, 堀田康司: 植物の化学調節, **40**, 22-29(2005).
- 8) Kennedy, J. C., Pottier, R. H., and Pross, D. C.: *J. Photochem. Photobiol.*, **6**, 143-148(1990).
- 9) Kaneko, S., Aoki, T., Nanao, H., Miyoshi, N., Houki, S., and Fukuda, Y., *Iwamizawa-shiritu Sougou Byouin-shi*, **24**, 71-79(1998).
- 10) Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Tanaka, T., and Sugiyama, M.: *Nutrition*, **29**, 1030-1036(2013).
- 11) Komatsuya, K., Hata, M., Balogun, E. O., Hirosaka, K., Suzuki, S., Takahashi, K., Tanaka, T., Nakajima, M., Ogura, S., Sato, S., and Kita, K.: *J. Biochem.*, **154**, 501-504(2013).
- 12) Choi, H.-P., Lee, Y. -M., Yun, C. -W., and Sung, H. -C.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 1136-1140(2008).
- 13) Fu, W., Lin, J., and Cen, P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 777-782(2007).
- 14) Qin, G, Lin, J., Liu, X., and Cen, P.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 316-322(2006).
- 15) Kang, Z., Wang, Y., Gu, P., Wang, Q., Qi, Q.: *Metabol. Eng.*, **13**, 492-498(2011).
- 16) Yang J., Zhu, L., Fu, W., Lin, Y., Lin, J., and Cen, P.: *Chinese J. Chem. Eng.*, **21**, 1291-1295(2013).
- 17) 上山宏輝, 堀田康司, 田中 徹, 西川誠司, 佐々木健: 生物工学, **78**, 48-55(2000).
- 18) 田中 享, 西川誠司, 渡辺圭太郎, 田中 徹, 佐々木健: 生物工学, **88**, 455-462(2010).

- 19) Yubisui, T., and Yoneyama, Y.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 77-85(1972).
- 20) Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 798-804(1999).
- 21) 安居嘉秀: 島津評論, **47**, 365-372(1990).
- 22) Macko, S. A., and Uhle, M. E.: *Anal. Chem.*, **69**, 925-929(1997).
- 23) 田中 享, 西川誠司, 渡辺圭太郎, 田中 徹, 新川英典, 佐々木健: 生物学, 93, in press(2015)
- 24) Stover, P., and Schirch, V.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 14227-14233(1990).
- 25) Kikuchi G., Motokawa Y., Yoshida T. and Hiraga K.; *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **84**, 246-263(2008).
- 26) Stoltz, M., Peters-Wendrisch, P., Etterich, H., Gerharz, T., Faurie, R., Sahm, H., Ferrera, H., and Eggeling, L.: *Appl. Environm. Microbiol.*, **73**, 750-755(2007).

第 5 章
結 言

光合成細菌変異株 *Rhodobacter sphaeroides* を用いた ALA 大量生産では、工業的生産方法を確立されたことについて報告されているが、グリシンやレブリン酸の添加条件、ALA 生産時の pH や酸素供給条件については厳密な検討内容について報告されておらず、生産の安定性や低コスト化には問題が残されていた。

R. sphaeroides CR-720 株は好気暗条件下でも通常の空気を通気することで生育でき、さらにスクシニル CoA と、グリシンとから ALA を著量に合成する。工業的な発酵生産は通気攪拌が可能な発酵槽を用いて、好気暗条件下で実施される。ALA 生産は光照射で大量にされることは明らかであったが、光照射はコスト高となり、実用的でないからである。本報では、より安定的に低コストで ALA を生産可能とする技術開発を行うため、グリシンやレブリン酸などの添加条件、ならびに培養温度、pH 及び酸素供給条件の検討を詳細に行い、実用可能となる 5 l 発酵槽での ALA 生産を実施した。

さらに、CR-720 株での ALA 生産においてその原料であるグリシンの代謝に関し、安定同位体で標識したグリシンを用いて培養を行い、その培養液に含まれる GC/MS 分析により解析を行い、グリシンの代謝について生化学的および代謝工学的立場からの検討を行った。

第 1 章においては、光合成細菌の性質と排水処理や農業分野への利用の状況、ならびに ALA の医薬分野、農業分野や健康分野などの研究動向を総説した。さらに微生物による ALA の生産研究や ALA の合成研究に関し総説した。現在でも化学合成では収率の低さや反応が多段階で複雑であり、実用化された方法は限られていること、ならびに光合成細菌を利用した ALA の生産研究においてさらに安定的に低コストで行う必要性について述べた。

第 2 章においては、ALA 生産に対するレブリン酸添加、pH、および酸化還元電位について検討した。遺伝子組換え *Escherichia. coli* を用いた Choi らによる ALA 生産研究により、pH を 6.5 に調節することで ALA 生産が上昇することが報告されており、また Burnham らにより *R. sphaeroides* の ALA 合成酵素 (ALAS) に対する至適 pH 範囲は 7.8~8.0 と報告され、また我々によって酸化還元電位と ALA 生産の関係については CR-520 株で既に報告されている。しかしながら、CR-720 株により発酵槽を用いた ALA 生産 に対するレブリン酸濃度、pH および酸化還元電位の至適値を検討した報告はこれまでにない。そこで CR-720 株を用いた発酵槽での ALA 生産について、レブリン酸添加、pH および酸化還元電位の至適条件の検討を行い、さらに、酸素供給を制御し、-150~100 mV を維持した酸化還元電位で、ALA を 52 mM ほど著量に生産可能なことを明らかにした。

酸化還元電位を極めて低いレベルに制御した好気発酵での光照射を行わない ALA 生産は、これまで知られていない新規で高度な発酵技術であり、ALA 生産の実用性を大きく増大させるものであった。光を必要とせず、完全好気培養での ALA 大量発酵生産が可能となったものである。

第 3 章においては、ALA 生産時の副産物を検討し、ALA 生産の増大を検討した。*R. sphaeroides* を用いた ALA 生産における培養温度は、CR-720 株の親株である CR-520 株及び CR-606 株を用いて 2 l 発酵槽により 30°C で実施されている。一方、CR-720 株は生育の至適温

度が 32°C であるが, ALA 生産においては 27°C 以上の培養温度では, 培養温度の上昇に伴って未知の副産物の生成が増加する傾向が認められ, ALA 生産量も 32°C 以上の培養温度では減少する傾向が認められた. CR-720 株による ALA 生産時において経時的に増大する副産物の化学構造を決定し, 5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸(AHVA)と同定した. 培養温度を詳細に検討し 28°C の条件下で ALA 生産を行うことで AHVA の生成を抑制でき, さらに ALA 生産が増大することを見出した. さらに, CR-720 株を用い実製造設備(5 kl 発酵槽)での ALA 生産のさらなる増大を試みた結果, 72 mM まで生産可能なことを明らかにした.

微生物による発酵生産で 72 mM の ALA 生産量は Yang らの研究による遺伝子組み換え *E. coli* での生産量とほぼ同等であるが, 光合成細菌変異株 CR-720 による 5 kl 発酵槽を用いた ALA 発酵生産で ALA のバイオ技術による生産の実用化が可能となった. 現在でもコスト的に化学合成法を凌いでいることは意義深い.

第 4 章においては ALA 生産の代謝経路とグリシンの代謝を検討した. *R. sphaeroides* ではいわゆる Shemin 経路と言われてきた C-4 経路が ALA 生合成の主経路とされているが, CR-720 については ALA 生合成経路やグリシンの代謝経路はほとんど検討されていない. そこで主にグリシンの代謝に焦点を当て, 安定同位体標識グリシン(グリシン-2-¹³C 及びグリシン-¹⁵N)を添加して, ALA 生産時の安定同位体 ¹³C 及び ¹⁵N の移行について GC/MS 分析によって代謝経路について検討を行った.

その結果, ALA の 5 位炭素には ¹³C が 98% 移行しており, またアミノ基の窒素には ¹⁵N が 95% 移行していたことから, CR-720 株が C4 経路で ALA を生成していることを明らかにした. さらに, セリンの 2 位及び 3 位の炭素に ¹³C が移行していたことから, CR-720 株ではグリシンの代謝がセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ及びグリシン開裂系と深く関わっていることを明らかにした.

この様に新規に開発した CR-720 株による ALA の実用的生産に関して, ALA 代謝経路を明らかにした. さらにセリン代謝が関与していることも新規に解明され, 今後の ALA 生産量の増大, 生産の低コスト化に対し, 重要な示唆を与える結果が得られたことは意義深い.

第 5 章では, 第 2 章から第 4 章までの結果をまとめ, 光合成細菌変異株による ALA の実用的な大量生産に必須となる諸条件についてまとめた.

以上, 本研究により, CR-720 株を用いて実用レベルである 5 kl 発酵槽における ALA 生産条件を最適化し, 現在の研究では世界でも最高力価である 72 mM の生産を達成した. さらに CR-720 株の ALA 代謝経路とグリシンの代謝について明らかにした. 以上の知見は, さらなる ALA 生産の安定化やコスト低減に利用できるものと考えられる.

主論文リスト

1. 田中 享, 西川誠司, 渡辺圭太郎, 田中 徹, 佐々木健(2010): 光合成細菌変異株を用いたレブリン酸濃度, pH の最適化, および酸化還元電位の制御による 5-アミノレブリン酸の大量生産, 生物工学会誌, 88, 455-462.
2. 田中 享, 西川誠司, 渡辺圭太郎, 田中 徹, 新川英典, 佐々木健(2015): 光合成細菌変異株を用いた 5-アミノレブリン酸生産における副産物の生成と培養温度の制御による 5-アミノレブリン酸の大量生産, 生物工学会誌, 93, 24-31.
3. Tanaka, T., Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Shinkawa, H., and Sasaki, K. (2015): Analysis of glycine metabolism during 5-aminolevulinic acid production by a mutant of photosynthesis bacteria (*Rhodobacter sphaeroides* strain CR-720) with glycine- ^{13}C and glycine- ^{15}N , ALA-Porphyrin Science, in press.

参考論文

Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., and Tanaka, T. (2002): Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23-29.

謝辞

本研究を進める上で、研究開始時から本論文作成まで、終始ご指導ご鞭撻を賜りました広島国際学院大学 主査 新川英典 教授、副査 竹野健次 准教授及び佐々木健 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、グリシンの代謝研究を進める上で、ご指導ご鞭撻賜りました元大阪大学 室岡義勝教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進めること、また、本論文の発表を許可いただきましたコスモ石油株式会社に感謝いたします。特に、研究を温かく見守り、かつ適切なご指導を賜りました株式会社コスモ総合研究所 元顧問 堀田康司 博士、コスモ石油中央研究所（故）湯本 貢 元所長、大塚宏明 所長、コスモ石油研究開発部 熊谷仁志 部長には大変お世話になりました。

本研究における実験および実証試験の実施において大変苦勞された、SBI ファーマ株式会社 CEO 田中 徹 博士、コスモ石油 ALA 事業部 渡辺圭太郎 博士、コスモエンジニアリング株式会社 宮地伸也氏、株式会社コスモ総合研究所 鈴木貴也氏、コスモ石油中央研究所元研究員 船田茂行氏を始め、関係者各位に心より感謝致します。

最後に、本研究を進めるにあたり、日々支えていただいた妻、子供に感謝します。