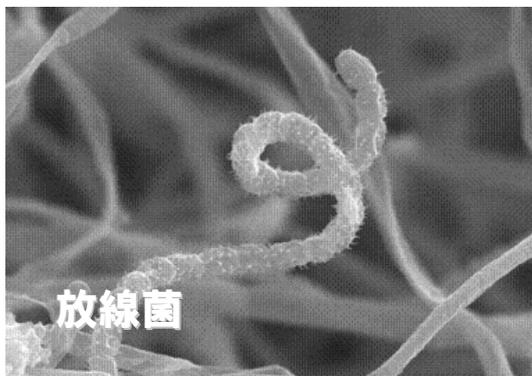
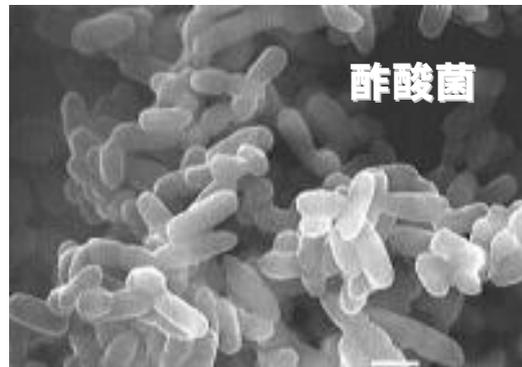
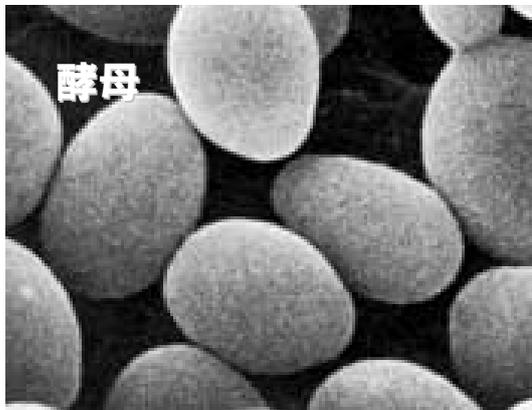




日本農芸化学会 中部支部 第 157 回例会  
若手シンポジウム

# ものつくりの微生物たち

—その潜在力を拓く—



日時：平成 21 年 11 月 14 日（土曜） 13:00～17:15  
場所：信州大学農学部 30 番教室（総合実験実習棟 2 階）

主催：日本農芸化学会中部支部 共催：信州大学農学部



# プログラム

- 13:05-13:10 開会の辞 支部長 小林哲夫（名大院・生命農）
- 【特別講演】 座長 小林哲夫  
13:10-13:40 「酢酸菌と酸化発酵：その生理学から見えてくる産業利用の新展開」  
山口大学農学部 松下一信
- 13:40-14:10 「コエンザイムQの微生物生産の実例と課題」  
島根大学生物資源科学部 川向 誠
- 【一般講演】 座長 松下一信  
14:10-14:40 「アミノ酸生産菌による異種タンパク質分泌生産系」  
味の素(株)ライフサイエンス研究所 菊池慶実
- 14:40-15:10 「ジペプチド発酵技術の進展～排出系の同定と利用」  
協和発酵バイオ(株)バイオプロセス開発センター 林 幹朗
- 15:10 休憩
- 座長 川向 誠  
15:40-16:10 「バイオプロパノール生産を目指した大腸菌の分子育種」  
京都大学大学院農学研究科 ○浦野信行、片岡道彦、清水 昌
- 座長 池田正人  
16:10-16:40 「放線菌の潜在的な抗生物質生産力を活性化する  
RNAポリメラーゼ変異とリボソーム変異」  
信州大学国際若手研究者育成拠点 保坂 毅
- 16:40-17:10 「アミノ酸生産菌を用いた脂質発酵へのアプローチ」  
信州大学農学部 竹野誠記
- 17:10-17:15 閉会の辞 副支部長 山口庄太郎（天野エンザイム）
- 17:30-19:00 懇親会 生協食堂（無料）

## 酢酸菌と酸化発酵:その生理学から見えてくる産業利用の新展開

山口大学農学部 松下一信

酢酸菌は、高濃度の糖やアルコールを糖酸・有機酸に酸化的に変換し培地中に高濃度に蓄積する。その後、蓄積したこれらの糖酸・有機酸を緩やかに資化・利用して生育することができる。そのため、酢酸菌は一般に特徴的な二段階生育をする。酢酸菌のこの一段階目の生育で行われる糖やアルコールを有機酸にまで変換する反応は、「酸化発酵」と呼ばれ、基質の「不完全酸化」(CO<sub>2</sub>までの完全酸化を行わない)による生産物蓄積反応であり、これまで酢酸発酵やソルボース発酵としての産業利用がなされてきた。この「酸化発酵」は、酢酸菌の細胞膜の外表層に結合した様々な酸化還元酵素に依存した呼吸鎖反応である。酢酸菌の呼吸鎖では、これらの酸化還元酵素がユビキノンを介して、その呼吸鎖末端オキシダーゼであるユビキノール・オキシダーゼに電子伝達することで機能している。そのため、酸化発酵を利用した「ものづくり」を考えると、関与する酸化還元酵素の機能を理解することとともに、その酵素がリンクする呼吸鎖、特にその末端オキシダーゼの機能を理解することが必要である。

### ■ 酸化発酵に関与する PQQ 酵素と FAD 酵素

酢酸菌は、その酸化発酵能に関連して、細胞質膜外表層に様々な膜結合型の酸化還元酵素を有している。それらは、アルデヒド脱水素酵素を例外として、PQQ を補酵素とするキノプロテイン (PQQ 酵素) と FAD を補酵素とするフラボプロテイン (FAD 酵素) に分けられる。

これまでの研究から、PQQ 酵素の多くは、量的に少なく誘導的に生成される FAD 酵素に比して、量的にも多く構成的であり、酸化発酵の主力を担っていることが示されている。また、

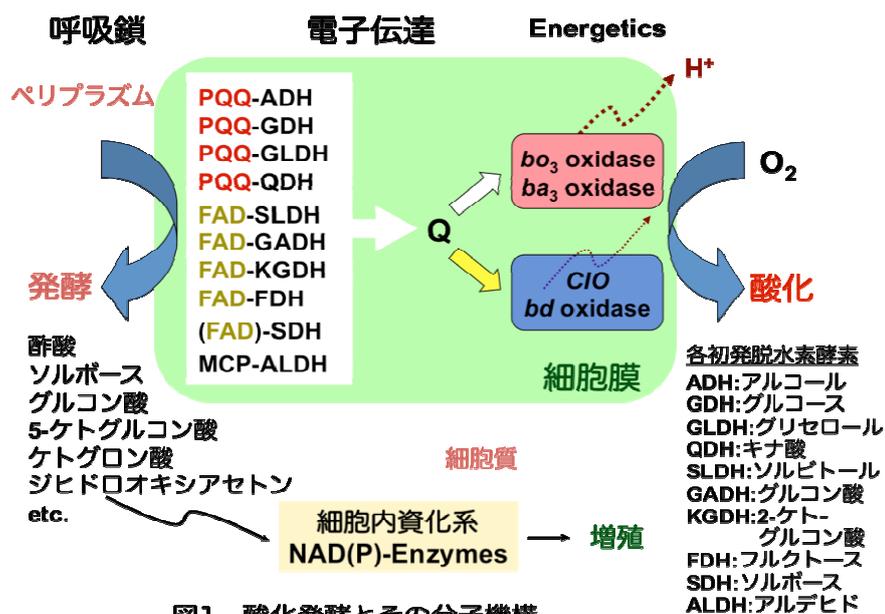


図1. 酸化発酵とその分子機構

その特徴的な構造（バレル構造）からも予想されるように、PQQ 酵素は、立体特異性は高いが、一般に基質特異性が緩やかである。その典型がグリセロール脱水素酵素（GLDH）であり、グリセロールだけでなく、R 配座をもつ 2 級アルコールすべてを基質とすることができ、そのため広範の糖アルコール（アラビトール、ソルビトール、マンニトールなど）に含まれる「2 級アルコール」やグルコン酸の 5 位の「2 級アルコール」をも酸化できる。そのため、GLDH は、ジヒドロキシアセトン発酵、ソルボース発酵および 5-ケトグルコン酸 (5-KGA) 発酵など多くの酸化発酵に関与していることがわかってきた。加えて、その他の PQQ 酵素である酢酸菌のグルコース脱水素酵素やアルコール脱水素酵素なども同様にその基質特異性の多様性から多くの有用な物質変換に利用できることがわかってきた。

#### ■ 酸化発酵と呼吸鎖

酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の「酸化発酵」呼吸鎖の末端には、シアンに感受性でエネルギー生成能を有するユビキノール  $bo_3$  オキシダーゼに加えて、シアンに強い耐性を示す末端オキシダーゼが存在している。*G. oxydans* ゲノムに見いだされるチトクロム *bd* は、比較的シアン耐性の弱い大腸菌チトクロム *bd* と違い、強いシアン耐性を示す緑膿菌酵素・シアン非感受性オキシダーゼ (CIO) に配列的に相同性が高い。この酢酸菌 CIO 遺伝子の破壊によって、この遺伝子が本菌のシアン耐性ユビキノール・オキシダーゼの実体であることが明らかになった。そのため、酸化発酵呼吸鎖においては、チトクロム  $bo_3$  がその基質酸化およびエネルギー生成において主力であると考えられるが、CIO も酸化発酵の制御に何らかの役割を果たしていると考えられる。そこで、CIO の過剰発現株を作成し、その酵素を精製してその構造と機能を調べるとともに、それらの「酸化発酵」生産能への影響を調べている。この CIO は、チトクロム *bd* と同様に、2 つのペプチドからなり、分子内に 2 分子のヘム B と 1 分子のヘム D を有しているが、その活性発現にシアンを要求するという特異な性質を示すことが明らかになってきた。また、ソルボース発酵およびケトグルコン酸発酵における解析から、CIO が FAD 酵素であるソルビトール脱水素酵素やグルコン酸脱水素酵素と、チトクロム  $bo_3$  が GLDH と、より強くリンクして機能していることを示唆する結果も得られてきている。

#### ■ 高温酸化発酵系の開発

酢酸菌はその「遺伝的不安定性」から「適応進化能」に優れていると予想される。事実、私たちはタイとの共同研究の中でその熱帯環境から多くの耐熱性酢酸菌を分離することができた。さらに、それらの耐熱性酢酸菌のいくつかからさらなる高温適応株を育種することに成功している。そこで、それらを利用した高温酸化発酵系の開発についても時間が許せば、触れてみたい。

# コエンザイム Q の微生物生産の実例と課題

島根大学 生物資源科学部 川向 誠

コエンザイム Q (CoQ) はユビキノンとも称される脂溶性成分であり、生体内において電子伝達系の必須成分として重要な機能を果たしている。コエンザイム Q の側鎖部分が 10 個のイソプレノ単位からなるものを CoQ10 と言い、最近サプリメントとして絶大な人気を受けている。CoQ10 はヒト自身も合成できるが、ビタミン様成分と位置づけられ、ビタミン E のような脂溶性抗酸化物質としての役割も重要である。その一方で、コエンザイム Q 生合成の基礎的な研究は立ち後れており、コエンザイム Q 生合成の全容はまだ明らかになっていないのが現状である<sup>1)</sup>。

膨大なゲノム解析が進行している中で、機能未知の遺伝子が多数それぞれの生物種に存在している。それら機能未知の遺伝子には代謝に関わる遺伝子も多数存在し、代謝研究が進まないで個々の遺伝子の機能が判明しないケースも多い。遺伝子の配列だけでは、その機能の実態はわからないことから、未知の遺伝子や遺伝子産物の機能解明には結局のところ地道な遺伝学的、生化学的知見の積み重ねが必要になる。

## ゲノム情報を利用した CoQ 生合成の解明

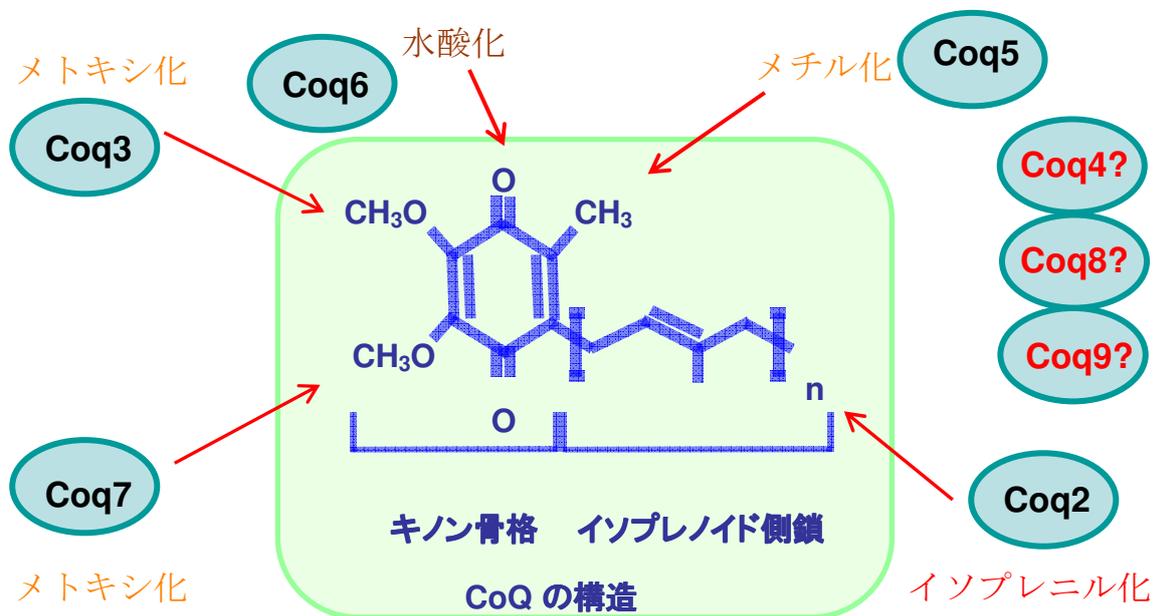
微生物で CoQ10 生産を考える上では、生合成の知見が必須である。これまでの出芽酵母の変異体や生化学的研究からコエンザイム Q の生合成には最低 8 種類の酵素が必要である。そのうち 6 種類の酵素は判明しているが 2 種類の酵素は未同定である。我々のグループでは、分裂酵母で推定される 8 種類の酵素に対応する遺伝子を破壊して、コエンザイム Q の生合成との関与を調べた<sup>2)</sup>。知られている 8 種類の遺伝子はすべてコエンザイム Q 合成に関与していたが、それ以外に分裂酵母に新たに 1 種類コエンザイム Q 合成に関わる新規の遺伝子が存在していた。しかもその遺伝子はヒトに存在しており、出芽酵母と分裂酵母で生合成の違いを示す 1 つの例であった<sup>3)</sup>。さらにコエンザイム Q に結合するタンパク質も見だし、これまでに教科書で書かれているようにコエンザイム Q は膜に浮遊している状態ではなく、実際にはタンパク質に結合している状態なのかもしれないと考えている<sup>4)</sup>。またコエンザイム Q を生合成できない分裂酵母は硫化水素を発生するという興味深い表現型を示し、コエンザイム Q と硫黄代謝との関連性を明らかにしている。

## ヒトの遺伝子の酵母破壊株での相補性

遺伝病との関連において特にヒトのコエンザイム Q 合成系遺伝子の解析が重要になる。ヒトのゲノム配列が公開にともない、酵母で見いだされているコエンザイム Q 合成酵素と相同性の高いものを検索して、それら遺伝子を手に入れた。基本的にはコエンザイム Q の生合成に関わると考えられるヒトの酵素を酵母内で発現させると相補的に働くことがわかった。そのことは酵母での解析を進めていくことがヒトを含めた生合成のアウトラインをつかむのに適していることを意味する<sup>5)</sup>。最近コエンザイム Q の生合成に異常があり、腎臓病や脳筋症を引き起こしている症例が続々と報告されつつあり、我々が進めてきた研究が非常に役立っている。

## 高発現系によるコエンザイムQ生産への利用

コエンザイムQは生物種によってそのイソプレノイド鎖長が違い、出芽酵母ではCoQ6、大腸菌ではCoQ8、ラットやイネではCoQ9、分裂酵母やヒトではCoQ10である。CoQ10生産においては、本来CoQ10を生産する微生物の育種を行なうか、もともとCoQ10を生産しない微生物に生産能力を付与するかの選択がある。これまでに側鎖のイソプレノイドを合成する酵素がコエンザイムQの側鎖長を決定しているということを証明している<sup>5)</sup>。すなわち、各生物が持つポリプレニル2リン酸合成酵素がコエンザイムQの側鎖長を決定している。この知見を利用して、これまでに大腸菌や出芽酵母でCoQ10を生産させることに成功しており、さらに、お米でCoQ10を生産させることに成功している<sup>6)</sup>。分裂酵母は元来CoQ10を合成するので、分裂酵母の遺伝子機能を解析すると同時にそれらを用いたCoQ10生産を考えることが有効であると考え、さらに研究を進めているところである。



## 参考文献

1. Makoto Kawamukai. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 53:217-226 (2009)
2. R. Miki, R. Saiki, Y. Ozoe, and M. Kawamukai. Comparison between *coq7* mutant and other respiration defective mutants in fission yeast. *FEBS J.* 275:5309-5324 (2008)
3. M. Zhang, J. Luo, Y. Ogiyama, R. Saiki, and M. Kawamukai. Heteromer formation of a long-chain prenyl diphosphate synthase from fission yeast *Dps1* and budding yeast *Coq1*. *FEBS J.* 275:3653-3668 (2008)
4. R. Saiki, A. Nagata, T. Kainou, H. Matsuda, and M. Kawamukai. Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans. *FEBS J.* 56:5606-5622 (2005)
5. T.-Z. Cui, and M. Kawamukai. Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS J* 276, 748-759 (2009)
6. 川向 誠、ユビキノンの生合成と新しい生理的機能 化学と生物 40, 172-178 (2002)
7. 川向 誠、コエンザイム Q10 の多彩な生理機能と新生産法の開拓、バイオサイエンスとインダストリー65, 463-465 (2007)

# アミノ酸生産菌による異種タンパク質分泌生産系

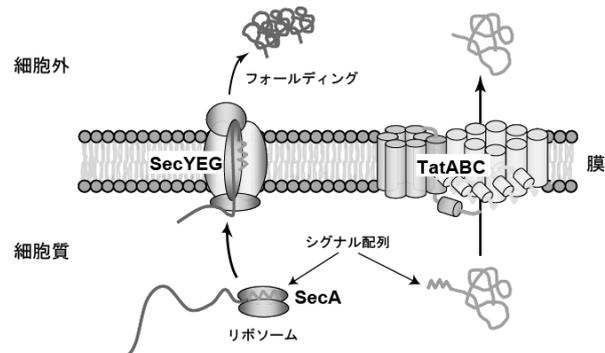
味の素(株) ライフサイエンス研究所 菊池慶実

1957年に木下らによってグルタミン酸生産菌として分離された、グラム陽性細菌である *Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸やリジンをはじめとする、各種アミノ酸の工業生産株として50年以上にわたり利用されてきた。そのため、各種アミノ酸の生産性を向上させる目的で、代謝生理学、遺伝学、培養技法に関する数多くの基礎的知見が積み上げられ、更に近年には全ゲノム配列の決定もなされてきた<sup>1)</sup>。一方、その他の応用的側面から見ると、アミノ酸生産以外、とりわけアミノ酸の重合体であるタンパク質の生産に関する報告はこれまでほとんど無かった。我々は *C. glutamicum* を用いた異種タンパク質分泌生産系の構築を試みた結果、食品加工分野で広く利用されているトランスグルタミナーゼ、或いはヒト由来生理活性タンパク質である Epidermal Growth Factor を高分泌発現させる事に成功してきた<sup>2-4)</sup>。 *C. glutamicum* を用いる異種タンパク質分泌生産系の最大の利点として挙げられるのは、宿主由来の分泌タンパク質が培養上清中に非常に少ないため、“きれい”な状態で目的タンパク質を生産できる点である。また、培養上清中にはプロテアーゼ活性が無く、他の多くのタンパク質分泌系で問題となっている様な目的タンパク質の分解が無い点、そして分泌された異種タンパク質が正常な高次構造を取っている点も利点として挙げられた。更に、 *C. glutamicum* は50年にわたりアミノ酸の工業生産株として使用されてきたため、単純な培地を使用した数百 kL スケールでの培養法が確立しているという、菌株の大量培養の容易さも利点の一つとして挙げることができる。以上の様な点から、我々はこの系が医薬用タンパク質の様に高度な精製を必要とする場面から、産業用酵素の様に大量生産を必要とする場面まで、幅広く利用可能な優れた系であると考え、この系を CORYNEX<sup>TM</sup> と名付け、更なる改良研究を継続している。

これまでに CORYNEX<sup>TM</sup> の有利な点を述べてきたが、この CORYNEX<sup>TM</sup> が「異種タンパク質を生産する上で万能な系か？」と言うと現在では必ずしもそうとは言えない。それは既存の異種タンパク質分泌生産系に当てはまる問題であるが、あらゆるタンパク質を分泌生産できるわけではない点である。我々はこの問題を解決する一つの手段として、新しいタンパク質分泌経路(Tat系)を利用することを考えた。一般的なタンパク質分泌経路は、原核生物から真核生物まで広く進化的に保存されている Sec系と呼ばれる経路である(下図左)。この経路は菌体内で翻訳されたタンパク質が、折り畳まれることなく紐状で輸送さ

れ、膜透過後に折り畳まれる。近年、この経路とは全く異なる新しい分泌経路である Tat 系が原核生物に広く存在していることが確認されてきた<sup>5)</sup>。Sec 系と比べたこの経路の一番の相違点は、下図右に示した様に、菌体内で翻訳されたタンパク質が折り畳まれた状態で膜輸送されることにある。この様な輸送過程の相違から、我々はこれまでで分泌させることができなかったタンパク質を、この Tat 系を利用することで分泌させることができるのではないかと考えた。その結果、*C. glutamicum* に於いても Tat 系が機能している事<sup>6)</sup>、そして Sec 系においては分泌させる事ができなかったタンパク質の中には、この Tat 系を利用する事により効率良く生産できるものもある事を確認した<sup>7,8)</sup>。

本演題ではこれら知見を中心に CORYNEX™ の概略に関し紹介する。



## 参考文献

- 1) M. Ikeda, S. Nakagawa, The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 99-109.
- 2) Y. Kikuchi, M. Date, K. Yokoyama, Y. Umezawa, H. Matsui, Secretion of active-form *Streptovercillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a co-secreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 358-366.
- 3) M. Date, M. K. Yokoyama, Y. Umezawa, H. Matsui, Y. Kikuchi, High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamononeus* transglutaminase, *J. Biotechnol.* 110 (2004) 219-226.
- 4) M. Date, H. Itaya, H. Matsui, Y. Kikuchi, Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*, *Lett. Appl. Microbiol.* 42 (2006) 66-70.
- 5) B. C. Berks, F. Sargent, T. Palmer, The Tat protein export pathway, *Mol. Microbiol.*, 35 (2000) 260-274.
- 6) Y. Kikuchi, M. Date, H. Itaya, K. Matsui, L.-F. Wu, Functional Analysis of the Twin-Arginine Translocation Pathway in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 7183-7192.
- 7) Y. Kikuchi, H. Itaya, M. Date, K. Matsui, L.-F. Wu, Production of *Chryseobacterium proteolyticum* Protein-glutaminase using the Twin-arginine Translocation Pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 67-74.
- 8) Y. Kikuchi, H. Itaya, M. Date, K. Matsui, L.-F. Wu, TatABC overexpression improves Tat-dependent protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 603-607.

# ジペプチド発酵技術の進展:排出系の同定と利用

協和発酵バイオ株式会社

バイオプロセス開発センター 林 幹朗

ジペプチドは2分子のアミノ酸がペプチド結合で連結した一群の化合物である。このジペプチドは2つの特徴を持つ。1つは優れた物性であり、アミノ酸の有用な生理機能を保持しながら溶解性や安定性などの物性を改善することができる。もう1つはアミノ酸よりもはるかに多様な生理機能を示すことである。物性改善の例として L-グルタミン(Gln)と L-アラニン(Ala)のジペプチド、L-アラニル-L-グルタミン(Ala-Gln)について紹介する。Gln は優れた生理機能を持つアミノ酸だが、熱安定性が低く加熱殺菌ができない、水溶液は不安定で長期保存できないなどの理由から、輸液などの臨床応用が進んでいない。一方、Ala-Gln は加熱殺菌に対して安定であり、水に対する溶解度も大幅に改善され、輸液や培地成分に用いられている。

我々が枯草菌から見出した L-アミノ酸リガーゼ(L-Amino acid Ligase、以下 LAL と略す)は無保護のアミノ酸2つを基質として ATP 依存的に  $\alpha$  位のカルボキシル基とアミノ基を結合し、ジペプチドを合成する活性を有している。この反応はジペプチドの合成方向にのみ進み、生成物の鎖長は厳密で鎖長の長いトリペプチドは生成しない。基質特異性は比較的広く Ala と Gln から Ala-Gln を生成する活性も有している。このように LAL はジペプチド生産に適したいくつもの性質を持つ酵素であり、この活性を利用することで画期的なジペプチドの新規工業製法の開発が可能になると考えられた。我々は LAL を用いることでアミノ酸発酵と同じように、グルコースとアンモニアを原料としたジペプチドの発酵生産が可能になるのではないかと考え、大腸菌を用いた Ala-Gln 発酵を題材として、この可能性に挑戦した。種々の検討を重ねた結果、ジペプチド発酵を成立させるための育種のポイントを2つ見出した。1つは菌の持つジペプチドの分解・取り込み活性を弱めることであり、もう1つは基質となるアミノ酸2つの生産能を菌に付与することである。このような育種を行った菌で LAL を発現させることで、グルコースとアンモニアを原料に Ala-Gln を発酵生産することに成功した。

育種の過程でジペプチドの分解活性を弱めた菌で LAL を過剰に発現すると菌の生育が著しく阻害されることが明らかになった。また、ジペプチドの分解活性を有するペプチダーゼを多重に欠失させた大腸菌はある種のジペプチドを添加した条件で生育が阻害

されることが分かった。これらの結果は LAL の過剰発現による生育の阻害はジペプチドが菌体内に過剰に蓄積することが原因であることを示唆している。

1996 年にドイツの研究グループから代表的なアミノ酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* において細胞膜の外側に積極的に L-リジンを排出する L-リジン排出系遺伝子 *lysE* のクローニングが報告された。それ以降、大腸菌においても種々のアミノ酸排出系遺伝子の同定、発酵生産への利用が報告されている。ジペプチドにも排出系が存在するならば、その活性を強化することでジペプチドの菌体内蓄積による生育阻害を回避し、生産性を向上できると考えられた。そこで大腸菌のゲノム解析の結果から薬剤排出トランスポーターと予測されている遺伝子を個別にペプチダーゼ多重欠失大腸菌で高発現させ、ジペプチド添加条件で生育を回復させる遺伝子を探索した。その結果、これまで機能未知とされてきた 2 種を含む 5 種の薬剤排出トランスポーター遺伝子にその作用を見出した。これらの中には環状ジペプチド構造を持つジケトピペラジン抗生物質 bicyclomycin の耐性蛋白質と報告されている Bcr が含まれていた。ペプチダーゼ多重欠失大腸菌を宿主にこれら 5 種の遺伝子を高発現させた株では培地中に Ala-Gln を添加した場合、菌体内の Ala-Gln 量が減少していることが分かった。さらに、Ala-Gln 生産菌で高発現させると培地中の Ala-Gln 蓄積量は有意に向上した。以上の結果からジペプチドの発酵生産において排出の強化が有効であることが明らかになった。

#### 参考文献

- (1) Tabata K, Ikeda H, Hashimoto S (2005) *ywfE* in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase. J Bacteriol 187:5195-5202
- (2) Hashimoto S (2006) Occurrence, biosynthesis, and biotechnological production of dipeptide. Microbiol Monogr 5:328-348.
- (3) Tabata K, Hashimoto S (2007) Fermentative production of L-alanyl-L-glutamine by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain expressing L-amino acid  $\alpha$ -ligase. Appl Environ Microbiol 73:6378-6385

# バイオプロパノール生産を目指した大腸菌の分子育種

○浦野信行、片岡道彦、清水 昌

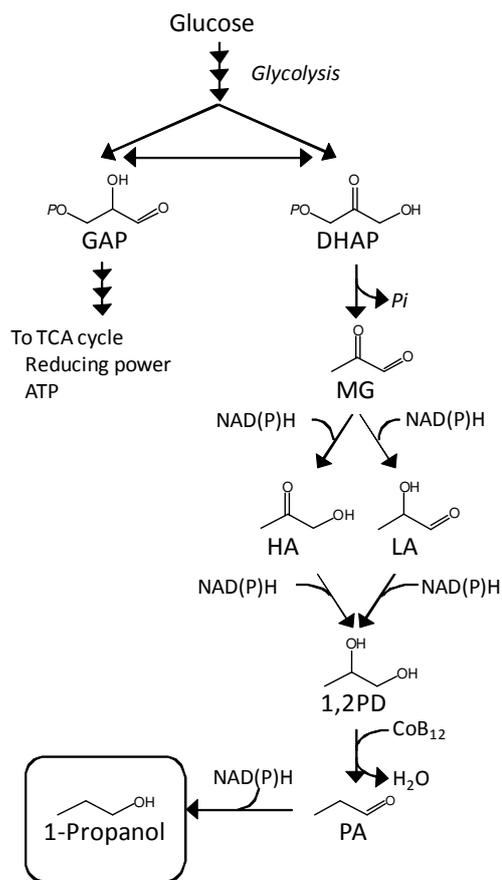
(京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻)

## はじめに

近年、石油枯渇問題や CO<sub>2</sub> 増加に対する懸念等から、これまでその原料を化石資源のみに依存していた燃料類や各種化成品を、再生可能な資源であるバイオマスから得る試みが盛んになっている。代表的汎用ポリマーであるポリプロピレンの原料となるプロピレンは、依然として化石資源から製造されており、バイオマスを原料とするプロピレン製造システムの構築は未だ達成されていない。そこで本研究では、プロピレンに容易に変換できる化合物の候補として 1-プロパノールに着目し、グルコースを原料とする人工合成経路の設計と、これを組み込んだ遺伝子組換え大腸菌を育種することで、1-プロパノール発酵生産を実現することを目指した。

## 1-プロパノール人工合成経路の設計

1-プロパノール人工合成経路としては、グルコースより解糖系を経て生じるジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)を利用し、1,2-プロパンジオール(1,2PD)を中間体とする右図に示す経路を設計した。本経路を利用した 1-プロパノール発酵生産では、菌体の生命維持活動や各酵素反応に必要なエネルギー及び還元力等は、解糖系によって生じるグリセルアルデヒド 3-リン酸(GAP)の代謝によって得ることを想定している。



1-プロパノール人工合成経路

## 1,2PD 生産株の育種

想定経路上において DHAP より 1,2PD に至る各反応を触媒する酵素の探索・評価を行った。その結果、DHAP をメチルグリオキサール(MG)へ変換する酵素として *E. coli* 由来のメチルグリオキサール合成酵素を選抜した。同様に、MG をヒドロキシアセトン (HA) へと変換する酵素として *Sporobolomyces salmonicolor* 由来アルデヒド還元酵素 II (ARII) を、HA を 1,2PD へ変換する酵素として *E. coli* 由来グリセロール脱水素酵素(GlyDH)を選抜

した。加えて、GlyDHはMGをラクトアルデヒド(LA)へ、ARIIはLAを1,2PDへと変換する活性もまた有していた。これらの酵素遺伝子をそれぞれ単独で導入した組換え *E. coli* を作成し、グルコースを含む培地で生育させたところ、全ての菌株の培養液中に1,2PDの蓄積が認められた。また、これら酵素遺伝子2種、あるいは3種を組み合わせると *E. coli* 体に導入したところ、単独で導入したものよりも多量の1,2PDが蓄積し、これら酵素はいずれも1,2PDの生産に有用であることが明らかとなった。

### 1-プロパノール生産菌の育種

1,2PDを1-プロパノールへ変換する酵素系は *Klebsiella pneumoniae* や *Escherichia blattae* 等、数種の腸内細菌において知られており、それらは dha 酵素群、あるいは pdu 酵素群に含まれている。グリセロール脱水酵素(GD)は dha 酵素群に含まれ、1,2PDをプロピオンアルデヒド(PA)へ変換する補酵素 B<sub>12</sub> 依存性酵素であるが、反応の進行に伴い酵素及び補酵素が不活性化化する。そのため、本反応を連続的に効率よく行うためには本酵素の再活性化因子と補酵素の再生系が必要となる。そこで *E. blattae* の dha オペロンより GD 及びその再活性化因子、補酵素の再生に必要な酵素遺伝子をクローニングし、*E. coli* に導入した。補酵素 B<sub>12</sub> の存在下において本組換え菌株は、GD 遺伝子のみを導入したものとは比べ、多くの1,2PDをPAへと変換した。さらに本菌株にPAを1-プロパノールに変換する酵素(1,3-プロパンジオール酸化還元酵素)遺伝子を導入することにより、PAの蓄積は確認されなくなり、1,2-PDを効率的に1-プロパノールへ変換することが可能となった。

続いて、この組換え菌株に前述のDHAPを1,2PDへと変換する3種の酵素遺伝子を導入し、想定経路上の各酵素反応を触媒する酵素遺伝子をすべて保持する組換え *E. coli* を作成した。グルコース及び補酵素 B<sub>12</sub> を含む培地で本菌株を培養したところ、1-プロパノールの生産が確認できた。本菌株を用いたバッチ培養での1-プロパノール発酵生産は、培養144時間において消費グルコース量132.6 mM (23.9 g/L)、1-プロパノール生成量19.9 mM (1.2 g/L)、対グルコース変換率0.15 モル/モル (0.050 g/g)であった。

### おわりに

本研究では、バイオマスからの1-プロパノール発酵生産を目的とし、その新規生合成経路を司る酵素遺伝子を集約した組換え微生物の構築に成功した。さらに、本組換え微生物による、グルコースを出発基質とする1-プロパノール生産に成功し、その発酵生産プロセス開発の可能性を示した。バイオマスを原料とする化石代替燃料あるいは化成品原料の生産プロセス開発は現在国内外においてもっとも重要な研究領域となっており、その中でバイオエタノールやポリ乳酸の商用生産はすでに始まっている。これらは基本的に酵母や乳酸菌が本来持っている発酵能を利用したものである。一方で本研究は、微生物が本来生合成し得る物質をその生合成系を利用・改良して生産させるものとは異なり、新たに設計した人工生合成経路を組み込んだ微生物を構築することにより、本来生合成できない物質を生産させる試みであり、その点においてこれまでにない画期的な物質生産技術と位置づけられる。

## 放線菌の潜在的な抗生物質生産力を活性化する RNA ポリメラーゼ変異とリボソーム変異

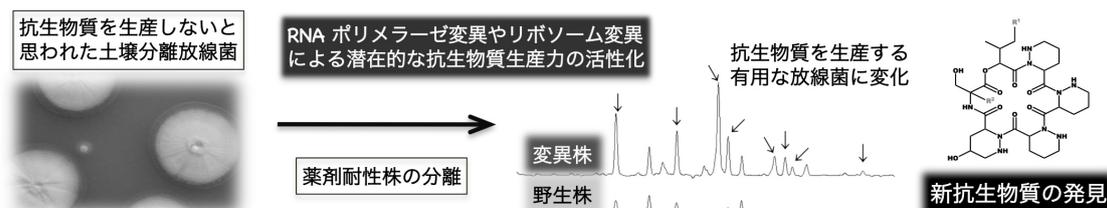
保坂 毅 (信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点)

放線菌は、抗生物質に代表される有用な二次代謝産物の宝庫として、医薬品の生産現場で古くから活躍している微生物群である。近年、*Streptomyces coelicolor* や *Streptomyces avermitilis* (エバーメクチン生産菌)、さらには *Streptomyces griseus* (ストレプトマイシン生産菌) などの放線菌研究における代表菌株の全ゲノム配列が決定され、実際には、放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子の大半が眠ったまま (通常の培養条件では検出には到らない微弱な発現レベル) の状態にあることが判ってきた [1-4]。この事実から、放線菌には我々の予想をはるかに超えた高い潜在的な利用価値があることが新たに見えてきた。放線菌の潜在的な二次代謝産物生合成遺伝子を効率よく活性化できれば、抗生物質をはじめとする有用な二次代謝産物の発見に繋がる。従って、このような放線菌の潜在遺伝子を如何にして目覚めさせ利用するかという点は、放線菌による有用物質探索研究を今後も益々発展させる上で重要な課題となっている。我々は、最近の研究成果から、放線菌に特定のリファンピシン耐性変異 (RNA ポリメラーゼ $\beta$ -サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子の変異) あるいはストレプトマイシン耐性変異 (リボソームタンパク質 S12 をコードする *rpsL* 変異) を持たせると、RNA ポリメラーゼやリボソームの機能が変化して、潜在的な抗生物質生産力が劇的に増大するという現象を見出した [5]。本講演では、抗生物質を生産しないと思われた土壌分離放線菌の潜在遺伝子を目覚めさせ、実際に新しい抗生物質を発見することに成功した事例に基づき、RNA ポリメラーゼ変異やリボソーム変異を活用した放線菌の潜在遺伝子活性化技法の概略 (図 1) を紹介する。

**土壌分離放線菌の潜在的な抗生物質生産力の活性化** 通常の培養条件では抗菌物質を生産しない 353 菌株の土壌分離放線菌にリファンピシン耐性あるいはストレプトマイシン耐性を持たせると、66 菌株で潜在遺伝子が目覚め、何らかの抗菌物質を生産していた。このうち、*Streptomyces* sp. 631689 の薬剤耐性株が生産する抗菌物質は、ピペリジン 4 分子を包含する新奇な構造を持つ抗生物質と分かり「ピペリダマイシン」と名付けた。放線菌の潜在遺伝子を目覚めさせ、従来にない新しい抗生物質を生産させることに世界に先駆けて成功した。

**RNA ポリメラーゼ変異やリボソームの変異による潜在遺伝子活性化メカニズム** 土壌分離放線菌 *Streptomyces* sp. 631689 において、ピペリダマイシン生産力を獲得したリファンピシン耐性株は *rpoB* 遺伝子に、また、ストレプトマイシン耐性株は *rpsL* 遺伝子に特定の変異を持つことが明らかになった。興味深いことに、定常期におけるピペリダマイシン高生産 *rpoB* 変異株の RNA ポリメラーゼは、特定遺伝子のプロモーターへの結合力が野生型 RNA ポリメラーゼのそれとは大きく異なり増大していることが判明した。直接的な証明には至っていないが、このような変異型 RNA ポリメラーゼは、ピペリダマイシン生合成遺伝子の発現を制御するプロモーターへの高い親和力を獲得しており、結果的に遺伝子発現を活性化するものと推察された。一方、特定の

*rpsL* 変異を有する変異型リボソームは、定常期においても高いタンパク質合成能を保持していることが明らかになった。多くの二次代謝産物合成遺伝子は、定常期にその転写が開始される。変異型リボソームはそのような遺伝子の転写産物を効率よく翻訳できるため、ピペリダマイシン合成遺伝子の発現にとって有利な状況を作り出せるものと考えられた。以上のように、*rpoB* 変異や *rpsL* 変異の特異な能力がもたらす RNA ポリメラーゼやリボソームの機能変化が、放線菌の潜在的な抗生物質生産力を活性化する基本原理である。



**図 1 潜在遺伝子活性化による放線菌からの新抗生物質探索** 潜在遺伝子を目覚めさせることで、抗生物質を生産しないと思われた放線菌からも、新しい抗生物質を見つけ出すことが可能である。

放線菌には、抗生物質を生産する菌株と生産しない菌株がある。一般的に、後者は有用な放線菌ではないと判定され、活躍の場がなく研究の対象とはならない。我々は、このような菌株であっても、実際には抗生物質生産に関わる二次代謝産物合成遺伝子を持っており、潜在遺伝子を活性化できるならば、優れた探索ソースとなり得ることを証明した。潜在遺伝子活性化により生産される二次代謝産物が必ずしも有用物質とはならないが、通常のスクリーニング方法よりも効率的に新物質を捉えることができるに違いない。新型インフルエンザや多剤耐性菌の出現により、新薬の開発は我々人類にとって重要な関心事となっている。その反面、微生物から新しい有用物質を発見することは年々難しさを増している。つまり、20 世紀初頭のペニシリンの発見以来続いてきた微生物による有用物質探索研究が限界に近づいているのが現状である。我々のアプローチは、このような窮状を打破し、微生物からの新薬発見に新しい道を切り拓く有効な技法となり得ることが考えられる。

**References:**

[1] Bentley, S.D. et al. *Nature* 417: 141-147 (2002)  
 [2] Ikeda, H. et al. *Nat. Biotechnol.* 21: 526-531 (2003)  
 [3] Bode, H.B. & Muller, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 6828-6846 (2005)  
 [4] Ohnishi, Y. et al. *J. Bacteriol.* 190: 4050-4060 (2007)  
 [5] Hosaka, T. et al. *Nat. Biotechnol.* 27: 462-464 (2009)

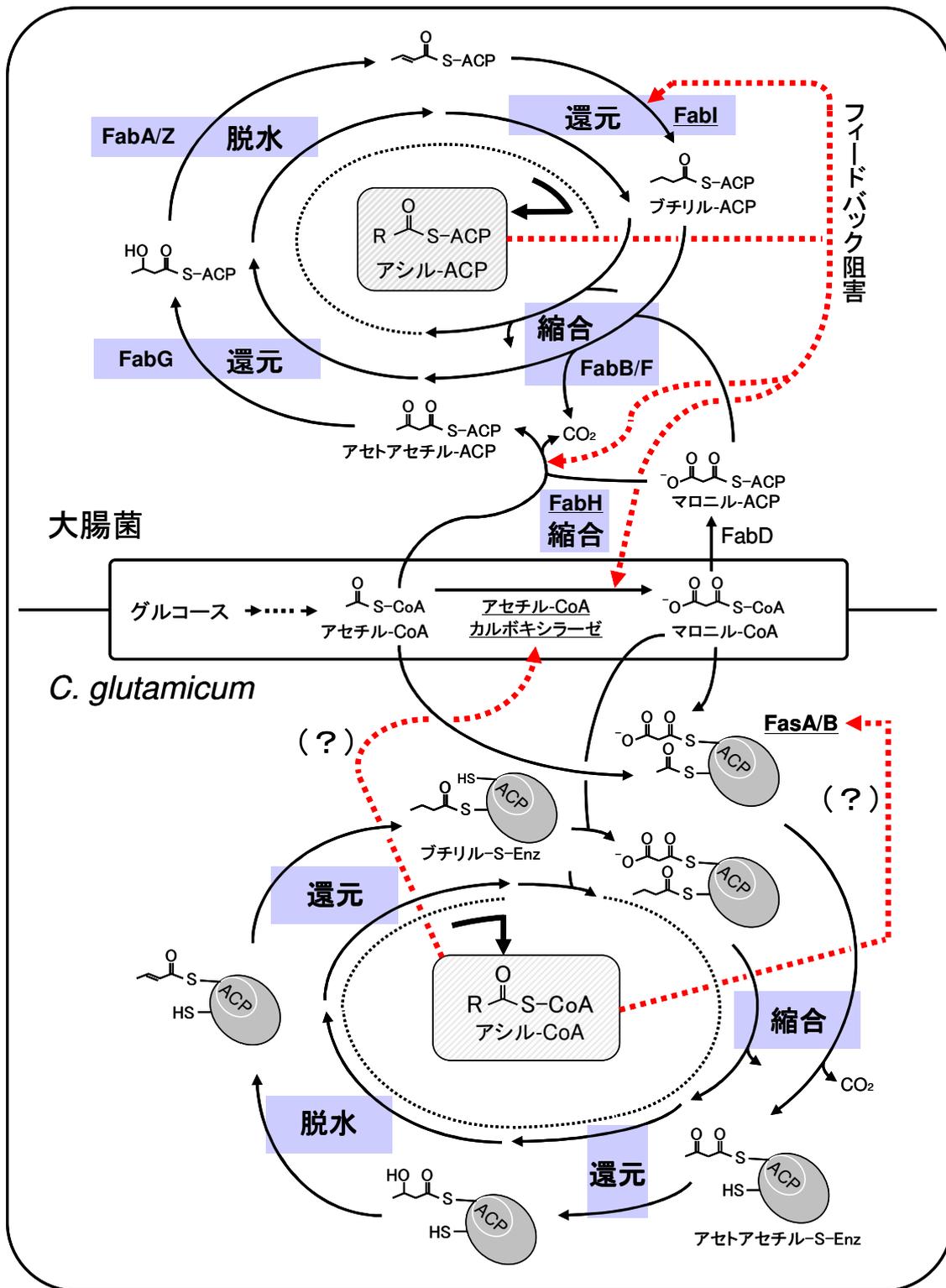
# アミノ酸生産菌を用いた脂質発酵へのアプローチ

信州大学農学部 応用生命科学科 竹野 誠記

現在の脂質発酵に目を向けると、糸状菌・酵母・微細藻類のような真核生物を用いた例は多く見られるが、細菌を利用した例は意外にも少ない。細菌の利用には発酵期間の短さや分子育種の容易さが利点として挙げられるにもかかわらず、そのような現状に留まっているのはなぜであろうか。脂質として脂肪酸に注目すると、糸状菌 *Mortierella alpina* による高度不飽和脂肪酸発酵が真っ先に挙げられる。このカビは元来、アラキドン酸等、希少で有用な脂肪酸を生産するだけでなく、生産能・蓄積能も高い<sup>1)</sup>。それに対し、アミノ酸や核酸等、水溶性物質生産の主役である細菌は一般的に、植物油・動物油に見られるような自然界によくある脂肪酸を細胞膜成分として少量合成するだけである。この元々の性質が細菌の利用例が少ない理由の一つと考えられる。だが近年、バイオディーゼル生産を目的に、脂肪酸を分泌生産する組換え大腸菌の育種が行われている<sup>2)</sup>。その蓄積量はまだまだ微量で実用には程遠いものの細菌による脂質発酵の可能性を窺わせる。

細菌による脂質発酵を実現するためには、第一に、そこに潜む障害を明らかにし、それを克服するための基盤技術を開発することが必要である。我々は、脂質生産の報告がない *Corynebacterium glutamicum* を題材に、非水溶性の脂肪酸の分泌生産が果たして可能かどうかの検証を開始した。同菌の脂肪酸合成経路は大腸菌と同じであるものの、以下の三つの点が異なる。すなわち、①脂肪酸合成が多機能酵素によってなされること、②アシルキャリアープロテイン(ACP)が多機能酵素上にドメインとして存在すること、③アシル-CoA を最終産物とすることである(図)<sup>3)</sup>。脂肪酸の分泌生産には少なくとも、「脂肪酸合成能力の強化」と「細胞内に蓄積した脂肪酸の細胞外への排出」の両条件を満たさなければならない。前者の要件は、アミノ酸の生合成と同様な代謝調節という概念で考えることができるのか、後者の要件もまた、アミノ酸の能動排出系のような仕組みで対応できるのか、など不明な点が多い。従って、育種においては、確立された水溶性物質の発酵生産のメカニズムに囚われないアプローチが求められる。

本シンポジウムでは、まず、私が関わってきた糸状菌 *Mortierella alpina* による高度不飽和脂肪酸発酵の概要を紹介し、同技術の長短所に触れる。次いで、*C. glutamicum* による脂肪酸の分泌は可能か？その初めてのチャレンジに向けて、私たちの考える方針と現状を紹介し、議論のたたき台としたい。



### 参考文献

- 1) S. Shimizu, H. Yamada (1990) Production of dietary and pharmacologically important polyunsaturated fatty acids by microbiological process. *Comments Agric. Food Chem.* **2**: 211-235.
- 2) X. Lu, H. Vora, C. Khosla (2008) Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production. *Metab. Eng.* **10**: 333-339
- 3) E. Radmacher, L. J. Alderwick, G. S. Besra, A. K. Brown, K. J. C. Gibson, H. Sahm, L. Eggeling (2005) Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, **151**: 2421-2427

## 2009年度 中部支部維持会員（五十音順）

アサヒビール(株) 名古屋工場	旭松食品(株) 食品研究所	アステラス製薬(株) 生物工学研究所
アピ(株) 長良川リサーチセンター	天野エンザイム(株) 岐阜研究所	イチビキ(株) 研究開発部
(株)伊藤園 中央研究所	伊藤忠製糖(株)	科研製薬(株) 生産技術研究所
加藤化学(株) 技術部	カネハツ食品(株) 技術部	(株)岐阜セラック製造所 技術部
キリンビール(株) 名古屋工場	金印(株)	サンエイ糖化(株) 研究開発部
サンジルス醸造(株)	(株)サンビシ	(株)三和化学研究所 三重研究所
(株)J-オイルミルズ	敷島スターチ(株) 技術開発部	新日本化学工業(株)
太陽化学(株)	大和製罐(株) 清水研究所	竹本油脂(株) 情報調査室
東海物産(株) 食品研究所	東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所	中日本冰糖(株)
名古屋製酪(株)	物産フードサイエンス(株)	(株)ニッシ 名古屋工場
(株)ニッポンジーン	日本食品化工(株) 研究所	フジ日本製糖(株)
(株)ポッカコーポレーション	三井農林(株) 食品総合研究所	(株)ミツカングループ本 社 中央研究所
(株)宮崎本店	名糖産業(株) 食品開発部	盛田(株) 小鈴谷工場
焼津水産化学工業(株)	ヤマモリ(株)	養命酒製造(株) 中央研究所

# *Speakers*



Dr. Matsushita



Dr. Kawamukai



Dr. Kikuchi



Dr. Hayashi



Dr. Urano



Dr. Hosaka



Dr. Takeno



問合せ先： 信州大学農学部応用生命科学科

池田正人・竹野誠記 (E-mail : stakeno@shinshu-u. ac. jp)

交通アクセス情報 : <http://karamatsu.shinshu-u. ac. jp/access/index. htm>