

# アミノ酸発酵を変革するゲノムからのアプローチ

池田 正人

信州大学農学部 応用生命科学科 生物機能化学講座

**要 約** 微生物発酵法によるL-アミノ酸の生産は、世界に先駆けて日本で開発され工業化された我が国の独創的な産業である。今や、L-アミノ酸は、生産量・価値ともにバイオテクノロジーを代表する製品になっている。しかし、昨今ではグローバル化や技術拡散の影響を受け、コスト競争力が著しく低下している。ゆえに、産業界では技術革新が切実な課題となっている。本稿では、アミノ酸発酵の伸長をもたらした生産菌の育種技術に焦点をあて、まず、その流れを振り返る。次いで、リジン発酵をモデルに、ゲノム情報を活用した新しい育種の方法論について紹介する。

**キーワード**：アミノ酸発酵，代謝工学，変異育種，ゲノム科学，コリネ型細菌

## 1. はじめに

L-アミノ酸は、生命の素材としての重要性に加え、それ自体にも、興味深い生理作用や薬理作用<sup>1)</sup>、あるいは呈味効果や栄養効果を示すものが多い。それゆえ、広い分野で様々な用途が開発され、既に食品、飼料、医薬など多方面で有効な活用が図られている。しかし、その用途面での広がりを下支えしてきたのが生産技術である<sup>2,3)</sup>。

近年、量産技術の進展により各種L-アミノ酸を大量かつ安価に入手できるようになった。これにより、化成品や光学活性医薬品など有用化合物の合成原料としての用途が広がっている<sup>4)</sup>。有用な生理活性を有する医薬品の中には、その分子内に、窒素原子を含むものが数多くみられ、生理活性の発現に大きな役割を果たしていると考えられている。これらの窒素原子を含む化合物ユニットの多くは光学活性体である。その中には、L-アミノ酸を含むものが多く、光学活性医薬品の増加に伴って、その用途でのL-アミノ酸の需要が高まりつつある。

L-アミノ酸を微生物発酵法により生産するという革新的な技術は、世界に先駆けて日本で開発され工業化された。その歴史は、まさにバイオテクノロジーの歴史と言っても過言ではないであろう。半世紀にわたり継続され大きな進歩を遂げてきたこのテクノロジーが、今、ゲノム科学の急速な進歩によって、旧来とは育種の方法論として大きく異なる時代を迎えることになった。本稿では、まず、アミノ酸

生産菌の旧来の育種技術を振り返る。次いで、この分野がゲノム時代を迎えてどのような展開を見せるのか、我々の取り組みを例に、この分野の更なる発展の可能性について論ずる。

## 2. これまでの育種技術

アミノ酸発酵の歴史は、1956年に協和発酵工業(株)の研究陣が多量のグルタミン酸を培養液中に分泌する土壌細菌 *Corynebacterium glutamicum* を見出したことで幕を開けた<sup>5,6)</sup>。その翌年には、*C. glutamicum* によるグルタミン酸の工業生産が開始され、立て続けに、リジンの工業的製造法も開発された。以来、約半世紀にわたってこのコリネ型細菌の育種研究が続けられ、今では多くのアミノ酸がその種の微生物を用いて発酵生産できるまでになっている。一方で、*C. glutamicum* によるアミノ酸生産研究は、「代謝制御発酵」という概念を生み、学問的な観点からも微生物学の発展に大きく貢献してきた<sup>7)</sup>。

アミノ酸生産菌の育種技術の第一期は、変異育種である。そこでは、紫外線の照射やニトロソグアニジン (NTG) などの変異剤による処理で染色体上の至る所に突然変異を誘起し、次いで栄養要求性やアナログ耐性といった表現型を指標にアミノ酸生産収量の高まった目的株を選抜する。このランダム変異と選択に基づく変異育種法は、これまでに、フィードバック制御が解除された代謝調節変異株や、アミノ酸が生産されても体内に過剰に蓄積しない膜輸送変異株といった多くのアミノ酸生産菌を生み出してきた<sup>2,3,8)</sup>。例えば、オルニチン発酵では、オルニ

受理日 2005年12月2日

採択日 2005年12月6日

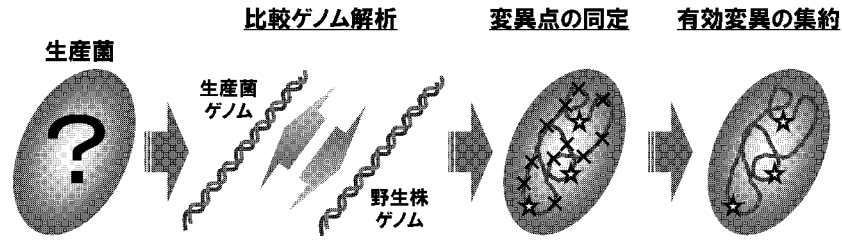


図1 ゲノム育種の方法

☆印はアミノ酸生産に寄与する有効変異を、×印は発酵に不要な変異を示している。

チンへの代謝を制御するアルギニンのレベルを下げるためにアルギニンの要求性変異株が、一方、リジン発酵では、リジン生合成経路に存在する種々の代謝調節を解除するためにアナログ耐性変異を積み重ねた代謝調節変異株が用いられている<sup>7)</sup>。さらにスレオニン発酵やトリプトファン発酵では、代謝調節の解除は充分ではないものの、同アミノ酸の取り込み系に変異を有するため、目的とするアミノ酸が生産されても菌体内に過剰に蓄積することがない膜輸送系変異株が知られている<sup>8)</sup>。現在、工業プロセスで使用されている実用菌株の多くは、それらの性質を組み合わせた変異株である。その実績からアミノ酸メーカーでは今なお、この古典的な手法による改良が進められている。

1979年、三菱化学(旧、三菱化成)の金子と坂口により、コリネ型細菌における細胞融合技術が開発され、菌株間での遺伝子の交配が可能になった。さらに、1980年代半ばには、協和発酵を初めとする幾つかのグループが、本菌種の宿主-ベクター系を相次いで開発した<sup>9)</sup>。これにより、より合理的な育種が可能になり、育種技術は第二期を迎えることになる。さらに1990年代に入ると、コリネ型細菌を遺伝子操作するための種々のツールが開発され、生合成酵素や排出機能の活性強化、あるいは代謝調節のより高度な解除などに応用されている<sup>2,3)</sup>。トリプトファン発酵がその代表例で、遺伝子組換え手法により、生産能力が大幅に改善された高生産菌株が育成されている<sup>10)</sup>。

新ミレニウムの年、*C. glutamicum* の全ゲノム配列が協和発酵によって決定された (Accession number BA000036)<sup>11,12)</sup>。本菌の全ゲノム配列は、産業上の重要性から、地球環境産業技術研究機構 (RITE) や、ドイツのデグッサ社、BASF 社など、他のグループによっても相次いで解読された<sup>13,14)</sup>。さらに、*C. glutamicum* よりやや高い温度で生育できる別のL-グルタミン酸生産微生物 *Corynebacterium efficiens* の全ゲノム配列も味の素(株)らのグルー

プにより決定された (Accession number BA000035)<sup>15)</sup>。これらの成果を受け、ゲノム情報およびゲノム科学のテクノロジーをアミノ酸発酵に生かすための方法論の開発も始まり、育種研究は新しいステージを迎えることになった。以下、リジン発酵をモデルに、ゲノム情報を活用した新しい育種の方法論について紹介する。

### 3. ゲノムからのアプローチ

本題に入る前に、従来の育種技術の欠点を整理しておく。前述したように、発酵工業に用いられている生産菌の多くは、変異育種を繰り返すことによって育種されている。この方法の欠点は不要または有害な変異の導入を避けることができないことである。このため、生産菌はゲノムがいわば傷だらけで、生育が遅くストレスに弱い虚弱体質になっている。加えて、アミノ酸を多量に生産する仕組みもブラックボックスにならざるを得ず、合理的な育種も阻まれている。もし、不要な変異を全て取り除くことが出来れば、生産菌の性質を抜本的に改善でき、発酵プロセスを大きく変えられる可能性がある。従来育種の限界を超える技術になろう。

それを目指すのが「ゲノム育種」である。この育種法では、生産菌のゲノム情報を解析してアミノ酸生産に有効な変異を特定し、それらを野生株ゲノム上で組み合わせる (図1)。これにより、有効変異のみからなる菌株の育種と発酵の仕組みの理解が同時に可能になる。従来の育種が表現型で優良菌株を選択していたのに対し、意図した遺伝子型の変異導入を行う点で、従来法と明確に区別されよう。

#### 3-1. ゲノム情報でリジン生産菌を再構築する

リジン生産菌のゲノム育種は次のような手順で行う。まず、リジンの生合成に関わる遺伝子をゲノム

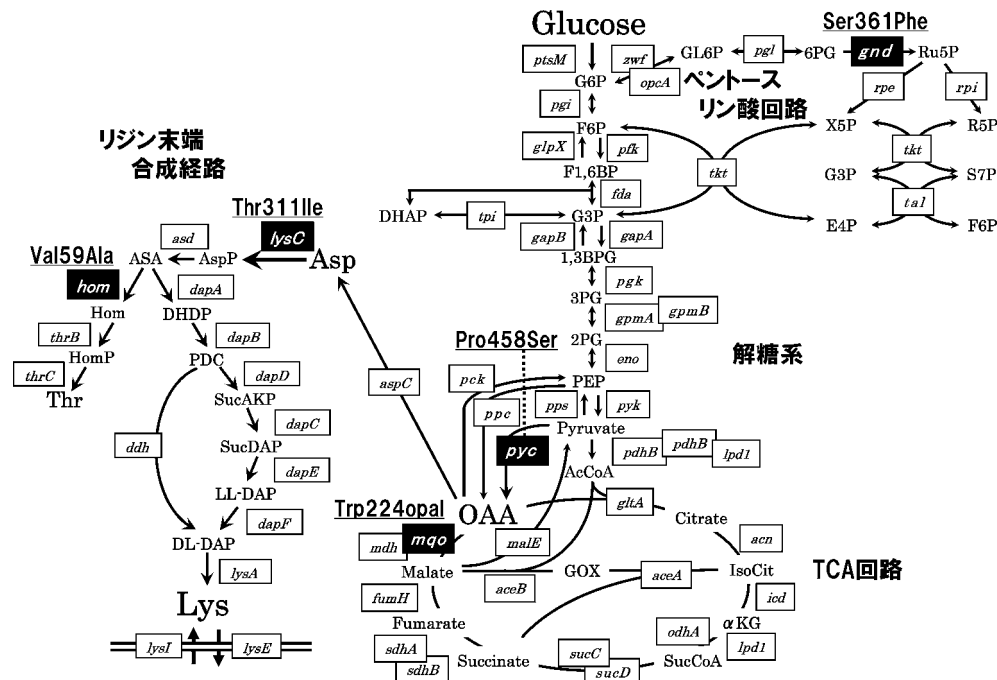


図2 リジン生合成経路と関連遺伝子

変異点評価で同定された5つの有効変異を、対応する遺伝子シンボル上に示した。

から拾い上げ、代謝地図上に貼り付ける(図2)。ついで、従来法で育種されたリジン生産菌のゲノムを野生株のゲノムと比較して、リジンの生合成に関わる遺伝子に導入された変異を同定する。これらの変異点を、代謝経路の下流から上流に向けて、順次、野生株のゲノムに導入し、リジン生産への効果を調べる。生産に寄与する変異点のみをゲノム上に保存し、これを親株として次の変異点の評価を行う。このサイクルを繰り返すことで、有効変異のみからなる菌株を創製する。このアプローチでは、生合成経路の下流に律速点があると、上流の変異の有効性を評価できない場合があるので、変異の評価は下流から順次、行っていくことが望ましい。以下に、育種の実例を示す。

#### (1) リジン末端合成経路を整備する

従来型リジン生産菌のゲノム解析により、アスパラギン酸(Asp)以降の代謝経路(図2)に計6種の変異点と同定された。それら変異を個別に野生株に導入してリジン生産への影響を調べた。その結果、*hom*(ホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子)と*lysC*(アスパルトキナーゼ遺伝子)に見出されたアミノ酸置換を伴う変異(各々、V59A, T311I)が、それぞれホモセリンの部分要求性とリジンアナログであるアミノエチルシステインの耐性をもたらす、共にリジン生産能を与える有効変異であることがわ

かった。次いで、これら変異点を順次、野生株ベースに組み上げる育種を行った(図3)。*hom*変異または*lysC*変異を有する1点変異株は、グルコース培地でジャー培養するとそれぞれ、約10g/L、約50g/Lのリジンを生産したのに対し、両変異を組み合わせた2点変異株では力価は相乗的に向上して70g/Lに達した<sup>16)</sup>。

#### (2) 中央糖代謝を整備する

末端経路が整備されると、次のターゲットはアスパラギン酸の供給に関わる中央糖代謝である(図2)。比較ゲノム解析によって中央糖代謝に同定された変異を、1つずつ、前述の2点変異株に導入し、リジン生産への影響を調べた。その結果、補充経路の*pyc*(ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子)<sup>16)</sup>、ペントースリン酸回路の*gnd*(6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子)<sup>17)</sup>、そしてTCA回路の*mgo*(マレート:キノンオキシドレダクターゼ遺伝子)<sup>18)</sup>に見出された変異(各々、P458S, S361F, W224opal)がリジン増産をもたらす有効変異であることを突き止めた(図2)。これら3つの有効変異を2点変異株ベースに再構成して、糖からリジンに至るまでの有効変異を集約した5点変異株を創製すると、培養時間の遅延なく一段と高レベルのリジン発酵が実現した(図3)。

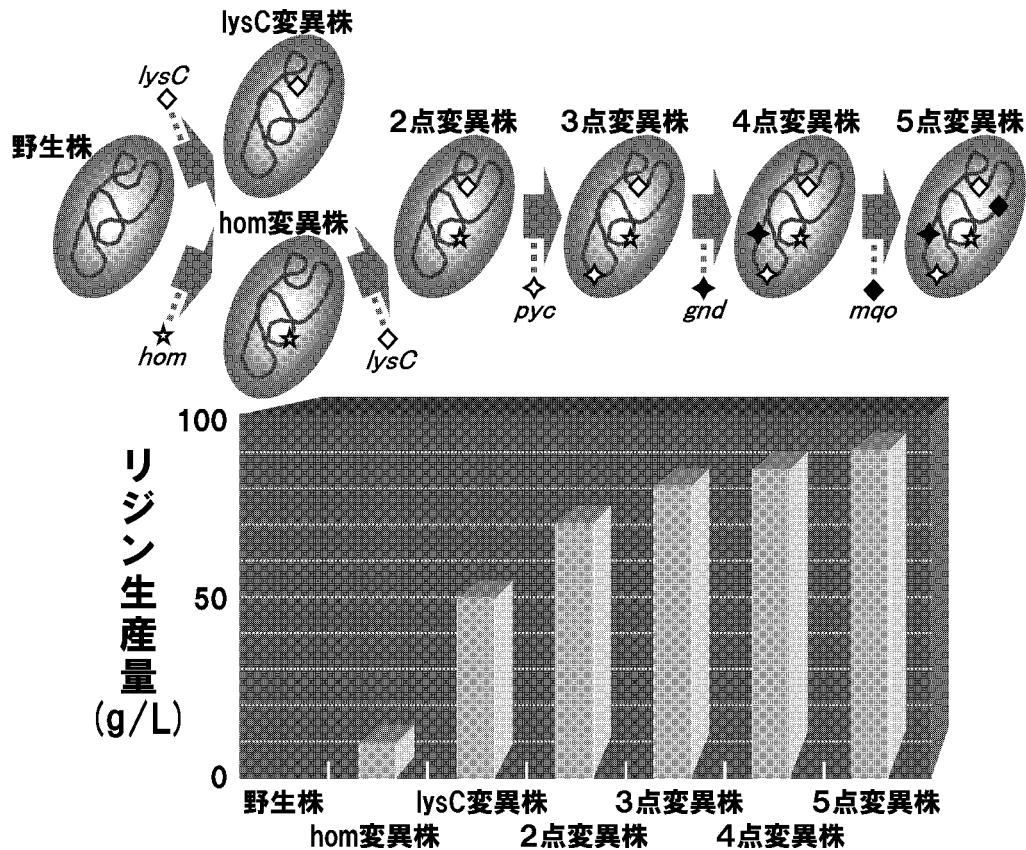


図3 リジン生産菌のゲノム育種の模式図とリジン発酵能

リジン生産試験はグルコース培地（糖総量25%）を用いた5 Lジャー培養により行った。

### 3-2. リジン生産のしくみを考察する

*lysC* 変異がリジン生産をもたらすのは、リジン生合成の鍵酵素であるアスパルトキナーゼのリジンとスレオニンによる協奏阻害が部分的に解除されるためである。一方、*hom* 変異は細胞内のスレオニンを低下させるので、アスパルトキナーゼの協奏阻害が起りにくくなってリジンが蓄積する。両変異を組み合わせると相乗的にリジン生産が向上するのは、アスパルトキナーゼの協奏阻害がより高度に解除されるためと説明できる<sup>16)</sup>。

*pyc* 変異に関しては、酵素学的な裏付けはなされていないものの、ピルビン酸からオキサロ酢酸への反応が促進されることでピルビン酸がリジン合成に有利に利用できるようになったと解釈できる<sup>16)</sup>。

*gnd* 変異は、NADPH、グリセルアルデヒド3-リン酸、フルクトース1, 6-ビスリン酸、ATP等によるアロステリック制御を弱める脱感作変異であることが酵素解析で明らかになった<sup>17)</sup>。この効果により、同変異を有する生産菌はペントースリン酸回路への代謝が親株に比べ約8%高まっていることが

代謝フラックス解析から示されている<sup>17)</sup>。リジン合成に必要なNADPHは、主にペントースリン酸回路から賄われているので、リジン増産の仕組みはNADPHの供給効率の増加で説明できる。

一方、*mgo* 変異はナンセンス変異なので、この反応を遮断することがリジン生産に有効なことが示唆される。実際、*mgo* 内部を欠失させても同様な効果が得られた。本遺伝子がコードするマレート：キノン オキシドレダクターゼ (MQO) は、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) と同一反応 (リンゴ酸 $\leftrightarrow$ オキサロ酢酸) を触媒するが、MDHがNADを電子受容体とするのに対し、MQOはキノンを電子受容体とする。Molenaarらは、*C. glutamicum* においてキノン型のMQOとNAD型のMDHの両酵素が存在する生理的意義を調べ、次のことを報告している<sup>19,20)</sup>。すなわち、①両酵素は共役してリンゴ酸 $\leftrightarrow$ オキサロ酢酸の間でサイクルを形成することが可能で、それによりNADHの正味の酸化をもたらすことができる。②従って、細胞はMQOとMDHの両者をうまく働かせることでレドックスバランス (NADH/NAD比) を調節することができ、ひいては、レドックスバランスとは無関係にTCA

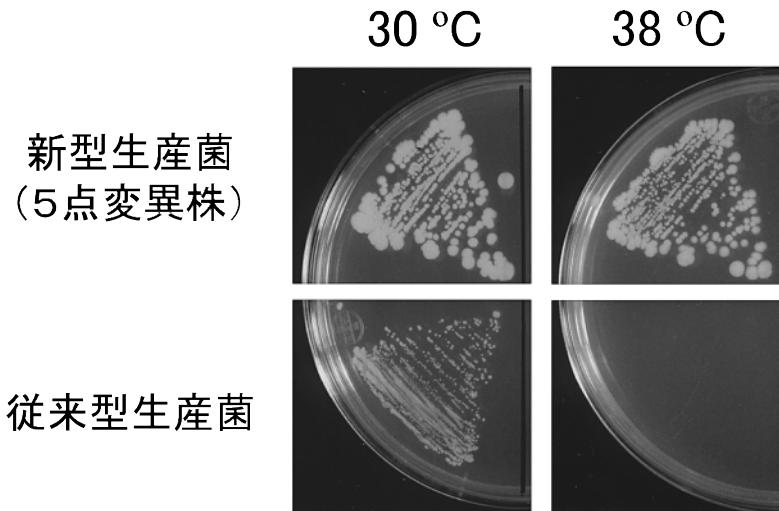


図4. 新型リジン生産菌と従来型リジン生産菌の生育比較  
両株を最少寒天培地に塗布し、指示された温度で2日間培養したときの生育を示す。

回路の高フラックスを維持することが可能になる。以上の知見に基づけば、MQOが欠損するとTCA回路のフラックスは抑制される方向に働くのが妥当であろう。我々のDNAアレイ解析ではMQOの欠損株ではTCA関連酵素の活性低下を示唆する結果が得られていることから、MQOを遮断するとレドックスバランス維持のためにTCAの代謝が抑制され、その分、オキサロ酢酸からリジン方向への代謝が増進したと考察される。

### 3-3. ゲノム育種株の性能を検証する

以上のようにして育種したゲノム育種株は、タフな野生株の特色を受け継いでいるので、従来の変異育種株と比べ、次のような利点を有する。一つは、増殖・糖消費の速さである。野生株と変わらない旺盛な増殖・糖消費は、従来に比べ培養時間半減という高速リジン発酵を可能にする<sup>19)</sup>。この特性は、時間当たりの生産性という観点で工業的に大きなメリットが期待される。二つ目は、ストレスに強い性質で、例えば、より高温条件での発酵を可能にする。実際、従来の菌株を用いたリジン発酵は35°C以上では成立しないが、ゲノム育種株では40°Cと高めに設定しても生産性は落ちない<sup>21)</sup>。工業プロセスでは、発酵熱による温度上昇を抑えるのに冷却コストがかかるため、発酵の高温化は有利となる。

図4は、ゲノム育種法で育種した5点変異株の30°Cおよび38°Cでの生育を従来型リジン生産菌と比較したものである。従来型生産菌の30°Cでの生育は弱く、また38°Cでの生育はみられないのに対し、ゲ

ノム育種株は30°Cのみならず38°Cの高温でも速やかに生育し、たくましさの違いは一目瞭然である。

## 4. 課題と展望

上記5点変異株は、糖あたりの収率という観点でみると、今回、変異点解析に供した従来型リジン生産菌にまだ及んでいない。このことは、本稿で示した経路以外にも有効変異がなお存在することを示唆している。今回は紙面の関係で割愛したが、DNAアレイ解析を交えることによって、実際に他の代謝系にも有効変異が見出されており、新規な発酵の仕組みが浮かび上がりつつある<sup>22)</sup>。

一方、従来型リジン生産菌をゲノム科学で読み解いてみると、ここで述べた不要な変異の蓄積以外にも、変異育種法の限界を示す幾つかの興味深い事実が浮かび上がってきた。その一つに、変異の偏りがある。育種に用いられたニトロソグアニジンのようなアルキル化剤はDNAに様々な化学変化を起こし、その結果、塩基対置換としてトランジションもトランスバージョンも誘起されると教科書に記されている。しかし、従来型リジン生産菌のゲノム上に同定された塩基対置換はトランジションのみであり、しかも、その大部分はGC→ATであった。変異の起こり方にそのような偏りがあるということは、有効変異といってもベストの変異が得られているわけではないことを示唆している。有効変異の改良による更なる発展の可能性を示す知見であり、今後、検討していく価値があろう。

## 5. おわりに

ここで紹介したリジン生産菌のゲノム育種は、ゲノム科学の成果をアミノ酸発酵に結びつけるための方法論をいち早く示した事例である。この方法論に則り、生産菌の遺伝情報を明らかにしてから発酵に有用な遺伝形質のみを野生株ゲノム上に集めていくというコンセプトで育種を行うと、生産菌の性質を抜本的に改善し、発酵プロセスを大きく変えられることが例証された。今後、有用変異に関する情報が蓄積し、これまでブラックボックスであったアミノ酸高生産の仕組みが解き明かされていけば、新たな視点での代謝工学に発展していくであろう。ゲノム育種が代謝工学のテクノロジーと補完的に融合することにより、育種技術はますます進化を遂げるに違いない。

## 参考文献

- 1) 惣中一郎：アミノ酸の新しい薬理作用，*ファルマシア*，**35**，1141-1145，1999.
- 2) 池田正人：L-アミノ酸の工業的製法，新開一朗監「キラル医薬中間体のプロセス技術」，pp.245-256，技術情報協会，2001.
- 3) Ikeda, M.: Amino acid production processes, Edited by Faurie, R. and Thommel, J., "Adv Biochem Eng Biotechnol vol. 79. Microbial production of L-amino acids", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1-35, 2003.
- 4) 関 雅彦，松本和男：アミノ酸化学と医薬品開発，*BIO INDUSTRY*，**12**，5-19，1995.
- 5) 木下祝郎：アミノ酸発酵の発見と進歩，アミノ酸・核酸集談会編「発酵からニューバイオテクノロジーへ」，pp.7-18，(財)バイオインダストリー協会，1988.
- 6) 鶴高重三：グルタミン酸生産菌の発見について，*発酵と工業*，**41**，37-43，1983.
- 7) 相田浩ほか編：アミノ酸発酵，学会出版センター，1986.
- 8) 池田正人，勝亦瞭一：深まるアミノ酸発酵—膜輸送系への展開，*化学と生物*，**38**，240-246，2000.
- 9) 中森 茂，勝亦瞭一：アミノ酸生産への組換えDNA技術の応用，*発酵と工業*，**44**，1032-1042，1986.
- 10) Ikeda, M.: L-Tryptophan production, Edited by Eggeling, L. and Bott, M., "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*", CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 489-509, 2005.
- 11) 中川 智：アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* のゲノム解析，*化学と生物*，**40**，610-614，2002.
- 12) Ikeda, M. and Nakagawa, S.: The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological process, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 99-109, 2003.
- 13) Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mockel, B., Pfeifferle, W., Puhler, A., Rey, D. A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I., and Tauch, A.: The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins, *J. Biotechnol.*, **104**, 5-25, 2003.
- 14) <http://www.rite.or.jp/Japanese/home-frame.html>
- 15) Nishio, Y., Nakamura, Y., Kawarabayashi, Y., Usuda, Y., Kimura, E., Sugimoto, S., Matsui, K., Yamagishi, A., Kikuchi, H., Ikey, K., and Gojobori, T.: Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*, *Genome Research*, **13**, 1572-1579, 2003.
- 16) Ohnishi, J., Mitsushashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K., and Ikeda, M.: A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 217-223, 2002.
- 17) Ohnishi, J., Katahira, R., Mitsushashi, S., Kakita, S., and Ikeda, M.: A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **242**, 265-274, 2005.
- 18) 池田正人：ゲノム科学を統合した育種法の開発，2004年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p.380，2004.
- 19) Molenaar, D., Van Der Rest, M. E., Drysch, A., and Yücel, R.: Functions of membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*, *J. Bacteriol.* **182**, 6884-6891, 2000.
- 20) Molenaar, D., Van Der Rest, M. E., and Petrović, S.: Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*, *Eur.*

- J. Biochem.*, **254**, 395–403, 1998.
- 21) Ohnishi, J., Hayashi, M., Mitsuhashi, S., and Ikeda, M.: Efficient 40°C fermentation of L-lysine by a new *Corynebacterium glutamicum* mutant developed by genome breeding, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 69–75, 2003.
- 22) Hayashi, M., Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Yonetani, Y., Hashimoto, S., and Ikeda, M.: Transcriptome analysis reveals global expression changes in an industrial L-lysine producer of *Corynebacterium glutamicum*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press, 2006.
- 

## A Genome-based Approach to Innovate Amino Acid Fermentation

Masato IKEDA

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture  
Shinshu University

### Summary

With the exploitation of new uses and the growing markets of amino acids, amino acid production technology has made large progress during the latter half of the 20th century. Fermentation technology has played crucial roles in this progress, and currently, the fermented amino acids represent chief products of biotechnology in both volume and value. This amino acid fermentation has been developed chiefly in Japan and has now become a big industry in the world. However, this area is highly competitive in the world market and process economics are of primary importance. For cost-effective production, innovation of fermentation technologies has become an urgent problem in industry. The present review describes a new technology of strain development employing genome information by using L-lysine fermentation as a model.

**Key word:** amino acid fermentation, metabolic engineering, classical mutagenesis, genomics, *Corynebacterium glutamicum*