

1 (1) 論文タイトル (「今日の話題」の方はサブタイトルをつけてください)

2 (和) コリネ型細菌による脂肪酸生産

3 (サブタイトル) アミノ酸生産菌で脂肪酸やビオチンをつくれるか?

4 (英) Fatty acid production by *Corynebacterium glutamicum*

5 (サブタイトル) Can amino acid bacteria produce fatty acids and biotin?

6 (2) 著者名

7 (和) 池田 正人

8 (英) Masato IKEDA

9 (3) 著者ご所属

10 信州大学学術研究院農学系

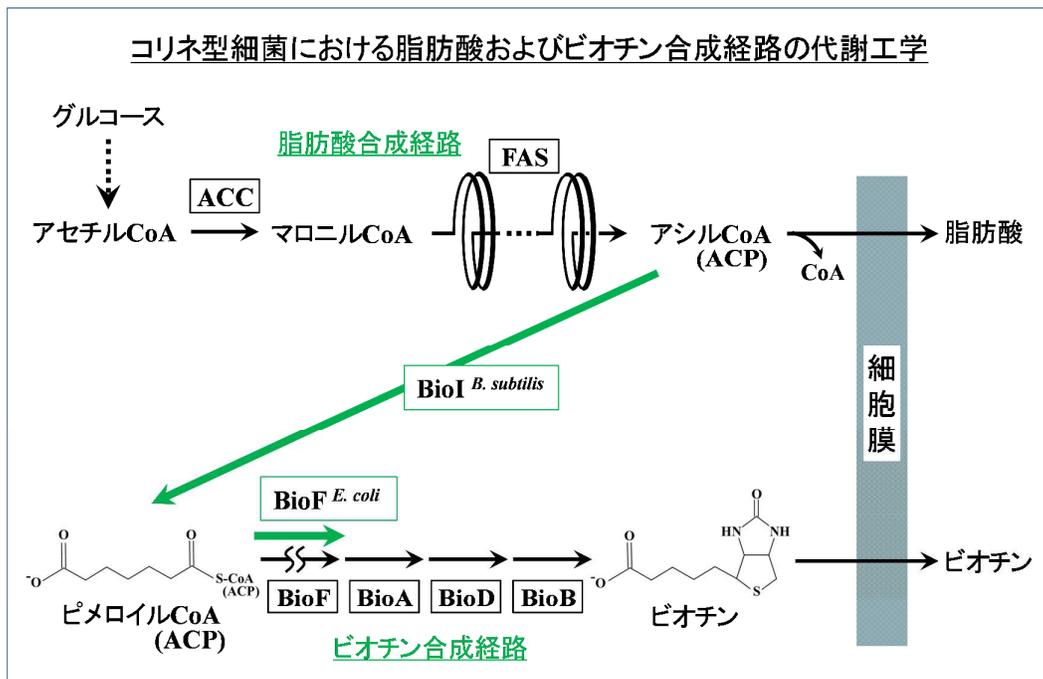
11 (4) 要旨

12 (和 : 100 字程度) アミノ酸生産菌として知られるコリネ型細菌は、脂肪酸の生
13 産宿主としてのポテンシャルも有することを見出した。さらに、脂肪酸へと流
14 れるカーボンをビオチンにまで向ける代謝工学により、本菌種のビオチン要求
15 性を解除してビオチン生産も可能になることがわかった。

16 (英 : 30 語程度) We demonstrated that the amino acid-producing bacterium
17 *Corynebacterium glutamicum* can be a production platform not only for
18 fatty acids but also for biotin.

19

20 (graphical abstract) ※図表を本ファイルに貼りつけてください



21

22 ※以上の文章は、本誌・学会ホームページでの紹介に利用しますので必ずご記入ください。

23 また、内容を紹介する図 (graphical abstract) も必ず提供してください。本文中に使

24 っておられる図、あるいは、図の一部を利用して頂いて構いません。

25 【本文】（「解説」の方は 300 語以内の序文をお書きください）

26 グルタミン酸生産菌として半世紀前にわが国で見出されたコリネ型細菌は、
27 その後、多くのアミノ酸の有用な生産菌として実用に供されてきた。近年では、
28 大腸菌に幾つかのアミノ酸の工業的生産菌としての座を譲るも、グルタミン酸
29 やリジン、アルギニンやグルタミン等、大型のアミノ酸ではなお主役を務めて
30 いる。現在ではアミノ酸を超えて、核酸や有機酸、アルコール、更にはバイオ
31 ポリマーやタンパク質等、広く物質生産の宿主としても有用であることが報告
32 されている⁽¹⁾。しかしながら、油脂や脂肪酸等、脂質に限っては例外で、コリ
33 ネ型細菌での報告例は一つも見当たらなかった。そもそも、脂質の発酵生産は、
34 カビや酵母、藻類が中心で、アミノ酸や核酸等、水溶性物質生産の主役である
35 細菌はなぜかマイナーである。自然界から脂質を蓄積している微生物をスクリ
36 ーニングしてきた結果に過ぎないのかもしれないが、脂質発酵では、アミノ酸
37 発酵とは異なり、その能力を持たない微生物からの汎用的な育種技術が確立さ
38 れていないのも事実であろう。従って、筆者らの狙いとするところは、細菌に
39 よる脂質発酵の基盤技術をつくることである。もし、細菌では脂質生産が難し
40 いとするならば、その理由がどこにあるのかも興味深い。ターゲットは脂肪酸
41 に設定した。脂肪酸の生合成は、脂質代謝において中心的な役割を担っている
42 からである。既に大腸菌では米国を中心に脂肪酸生産の試みが始まっていたの
43 で、差別化する意味でも、わが国で見出されたコリネ型細菌を出発宿主と決め
44 た。

45 本題に入る前に、生物における脂肪酸生合成の多様性に触れておきたい。ま
46 ず、脂肪酸の鎖長を伸ばしていく脂肪酸合成酵素（FAS）には I 型と II 型の二
47 つのタイプがある。大腸菌や枯草菌など細菌がもつ II 型 FAS は、複数の触媒反
48 応が別々の酵素に担われる酵素群である（図 1 左の Fab 群）。これに対し、カ
49 ビや酵母、動物など真核生物がもつ I 型 FAS は一つのポリペプチドに担われる
50 多機能酵素である。どちらの脂肪酸合成酵素も炭素数 18（C18）を超えるよう
51 な長い脂肪酸をつくることはできず、それ以上に鎖長を伸ばすにはエロンガー
52 ゼという延長酵素が必要になる。これを有するカビや海洋細菌では C20 を超え
53 た長鎖脂肪酸が合成されるが、それを持たない大腸菌や枯草菌では C18 までと
54 なる。不飽和化の仕組みにも違いがある。II 型 FAS の細菌では一般に C10 に
55 なるとき二重結合が付加されるのに対し、I 型 FAS を使う真核生物ではもっぱ
56 らデサチュラーゼという不飽和化酵素がそれを行う。ヒトでは 12 位や 15 位に
57 二重結合をもつ多価不飽和脂肪酸が必須であるが、その位置に働くデサチュラ
58 ーゼがないので、予め、その位置に二重結合をもつリノール酸やリノレン酸を
59 食物から摂取しなければならない。いわゆる必須脂肪酸である。

60 さて、本題のコリネ型細菌であるが、本菌種には大腸菌とは異なる 2 つの特
61 徴がある。一つは、例外的に真核型の I 型 FAS をもつ点である（図 1 右）。も
62 う一つは、脂肪酸の分解代謝系（ β 酸化経路）を持たない点である。これらの
63 特徴が脂肪酸生産にどう影響するのかが興味の一つである。我々は、本菌種の
64 野生株から自然変異でオレイン酸の分泌株が容易に得られることを見出した⁽²⁾。

65 さらに、同分泌株がもつ変異点を特定し、本菌種が脂肪酸を生産するメカニズ
66 ムを明らかにしてきた⁽²⁾。基本的に、アミノ酸発酵と同じ概念、すなわち、フ
67 ィードバック調節の解除で脂肪酸生産が起こるが、興味深いのは1変異により
68 脂肪酸の「過剰合成」と「分泌」の二つのイベントが同時に起こることである。
69 同様な育種を大腸菌の脂肪酸分解欠損株でも行ったが、脂肪酸分泌株は得られ
70 なかった。そこから見えてきたことは、大腸菌とコリネ型細菌における脂肪酸
71 代謝の違いである。大腸菌の脂肪酸生産に共通する技術は、イリノイ大・クロ
72 ーナンらが最初に報告した「脂肪酸分解経路を遮断した宿主でチオエステラー
73 ゼ (TES) を高発現させると脂肪酸生産が起こる」というものである⁽³⁾。TES
74 は、アシル ACP (CoA) から ACP (CoA) を外して脂肪酸を遊離させる酵素で、
75 大腸菌ではペリプラズムに存在する (図 1 左)。これを細胞質で高発現させて、
76 フィードバック阻害のエフェクターであるアシル ACP を遊離脂肪酸に換えれ
77 ば、フィードバック阻害が回避されて脂肪酸が過剰合成するという仕組みであ
78 る。我々は当初、クローナン博士から材料をいただいて同様な検証を行ったが、
79 大腸菌では再現したものの、コリネ型細菌ではネガティブであった。その後、
80 我々は、コリネ型細菌は TES を操作しなくても、レギュレーター遺伝子 FasR
81 の欠損のみで脂肪酸を過剰生産するようになるとの知見を得た。その違いは何
82 を意味するのであろうか。

83 脂肪酸は一般に生理に悪影響をもたらすことが知られる。が、大腸菌は脂肪
84 酸の分解系を有するため、仮に脂肪酸合成の代謝調節が何らかの変異で外れて

85 も、過剰合成されたアシル ACP (CoA) を分解経路へと流して、その細胞内蓄
86 積を防ぐことができる (図 1 左) . しかし、コリネ型細菌には脂肪酸の分解系
87 がないため、そのような解毒ができない. ここで注目したいのは、コリネ型細
88 菌は大腸菌と違って、細胞質に TES の高い活性を有しているという点である⁽²⁾.
89 これらのことを念頭に置いて、我々は以下の仮説を立てた. すなわち、「コリ
90 ネ型細菌は過剰合成されたアシル ACP (CoA) を分解できない代わりに、TES
91 活性によって遊離脂肪酸にし、それを細胞外に排出することで解毒するのでは
92 ないか」という仮説である (図 1 右) . この仮説が正しいとすると、コリネ型
93 細菌では脂肪酸合成の代謝調節を解除する変異のみで脂肪酸の分泌株が得られ
94 るはずであるが、実際、その通りになった. 一方、大腸菌の脂肪酸分解系遮断
95 株からは同様な自然変異育種によって目的株は得られなかったが、これは、大
96 腸菌では細胞質の TES 活性が低いため、遊離脂肪酸が分泌するほどには生成し
97 ないと説明できる. すなわち、「分解系を遮断する」のと、「もともとそれを
98 有しない」のとは違うということであろう.

99 ところで、アミノ酸の場合と同様、脂肪酸の分解系を持たないコリネ型細菌
100 は、その排出系を発達させている可能性がある. ヒトで脂溶性物質の輸送を担
101 うとされる ABC 輸送体の類似遺伝子がコリネ型細菌のゲノムにも多数存在す
102 ることから、これらに焦点をあてて発現解析を行ったところ、脂肪酸生産にリ
103 ンクして高発現する遺伝子が数種見出された (未発表) . これらのいずれか一
104 つ、あるいはその複数が本菌種において脂肪酸の排出を担う目的遺伝子である

105 と考えられ、その特定を進めているところである。

106 さて、上記オレイン酸生産菌の生産量は、グルコース 10 g/L から 300 mg/L
107 程度である。これを今後どう展開するかについて我々の考えを述べてみたい。
108 まず、バイオ燃料を狙うのであれば、対糖収率をアミノ酸発酵並に高める必要
109 がある。しかし、それができさえすれば、コリネ型細菌には 250 g/L もの糖を
110 30 時間以内に代謝できる能力があるので、高生産性プロセスが期待できる。一
111 方、機能性脂質への展開も考えられよう。本菌種には、大腸菌同様、デサチュ
112 ラーゼやエロンガーゼはなく、多価の C18 を超える長鎖脂肪酸をつくることは
113 できないが、外来遺伝子の導入により、それがどの程度可能になるのかは興味
114 深い。とは言え、わが国にはモルティエレラ・アルピナというカビによる機能
115 性脂質の優れた生産技術がある。ラビリンチュラという海洋性藻類やある種の
116 海洋細菌にもそれらの合成能力が備わっており、産業利用に向けた検討が始ま
117 っている。これらの先行技術は念頭におかなければならない。ところで、もし
118 オレイン酸へと流れるカーボンを付加価値の高い物質に向けることができれば、
119 現状のレベルでも産業的な価値が生まれる。これに関連して、我々は最近、興
120 味深い報告を見つけた。それは、大腸菌でビオチン（ビタミン B₇）が脂肪酸合
121 成経路を拝借して合成されるというものである⁽⁴⁾。これまでビオチン合成の出
122 発基質である C7 のピメロイル CoA がどうやって生合成されるかの詳細はわか
123 っていなかったが、枯草菌では、長鎖のアシル ACP (CoA) から P450 酵素 (Biol)
124 による酸化的開裂によって生成するというモデル (Biol ルート) が 2000 年を

125 前後して提唱されていた (図 2) ⁽⁵⁾. 今回, 大腸菌で, それとは異なるモデル
126 (BioC-BioH ルート) が発表されたわけである (図 2). その両知見を合わせ
127 れば, ピメロイル CoA は, 菌種により仕組みは異なるものの, 脂肪酸合成経路
128 を利用して合成されるという点で共通しているとみなすことができる. 以上か
129 ら, 我々は, ビオチンを脂肪酸生産研究の出口の 1 つとして位置づけることに
130 した.

131 ビオチンは現在, 化学合成法により製造されている. ビオチン発酵に関して
132 は, 1980 年代から 1990 年代にかけて, 資生堂や田辺製薬 (現, 田辺三菱製薬)
133 等, 大手の企業を中心に生産菌の育種が盛んに行われた経緯があるが, 高生産
134 菌の取得には至らず, いずれも研究を中断している. しかし, 市場価格は依然
135 として高値であり, 発酵法を検討する意義はなお残っている. しかし, 改めて
136 ビオチン発酵に臨むには, 従来と違うアプローチが求められる. その一つが発
137 酵特性に優れたコリネ型細菌の利用である. これまで, 本菌種のビオチン要求
138 性の解除には誰も成功していなかったため, 同菌種を利用できなかった. 我々
139 は, 本菌種に, 大腸菌由来の *bioF* 遺伝子と枯草菌由来の *biol* 遺伝子を導入す
140 るとビオチン要求性が解除され⁽⁶⁾, さらにある変異を導入するとビオチンを過
141 剰合成できるビオチン生産菌が得られることを見出した (未発表). 本結果は,
142 コリネ型細菌が BioF と Biol の両機能を欠損しており, 両者を外来遺伝子で補
143 えば, 糖からビオチンに至る全経路がつながることを示している (図 2). 一
144 方, 脂肪酸合成系も, 従来の育種では目を向けられてこなかった視点である.

145 これに関連し、我々は、最近、脂肪酸合成経路の代謝を高める分子育種がビオ
146 チン生産に反映するとの結果を得た（未発表）。脂肪酸合成経路の改良が新し
147 いアプローチになることを確認できたわけである。これにより、コリネ型細菌
148 でビオチン発酵に臨む基盤が整った。余談ながら、ビオチンは脂肪酸合成経路
149 からできるのに、脂肪酸合成にはビオチンが必要である。このパラドックスが
150 また面白い。

151 話題が再びアミノ酸発酵に戻るが、ビオチンはグルタミン酸発酵の規定要因
152 であるとともに、リジン等、他のアミノ酸発酵の成績を左右するキーファクタ
153 ーでもある。ビオチン酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼがアミノ酸合成
154 の律速酵素の1つになっているためである。ビオチンを自前で過剰合成できる
155 コリネ型細菌を育種できたことで高価なビオチンを培地に添加する必要がなく
156 なれば、アミノ酸発酵にも一石を投じることになるのではないかと思われる。

157

158 謝辞： 本稿は、協和発酵バイオ（株）からのご支援のもと、筆者の研究室の
159 竹野誠記准教授、ならびに学生と共に行なった研究成果をまとめたものである。
160 各位に感謝申し上げます。

1 【文献】

- 2 1) J. Becker & C. Wittmann: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 631 (2012).
- 3 2) S. Takeno, M. Takasaki, A. Urabayashi, A. Mimura, T. Muramatsu, S. Mitsuhashi
4 & M. Ikeda: *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 6776 (2013).
- 5 3) H. Cho & J. E. Cronan: *J. Biol. Chem.*, **270**, 4216 (1995).
- 6 4) S. Lin, R. E. Hanson & J. E. Cronan: *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 682 (2010).
- 7 5) J. E. Stok & J. J. De Voss: *Arch. Biochem. Biophys.*, **384**, 351 (2000).
- 8 6) M. Ikeda, A. Miyamoto, S. Mutoh, Y. Kitano, M. Tajima, D. Shirakura, M.
9 Takasaki, S. Mitsuhashi & S. Takeno: *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**,4586 (2013).

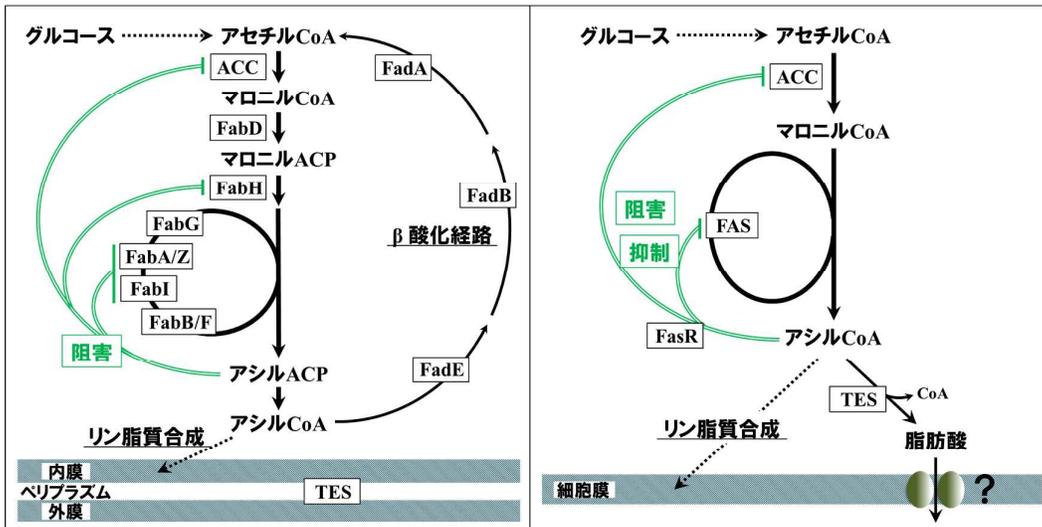


図1 大腸菌 (左) とコリネ型細菌 (右) における脂肪酸の合成
 大腸菌では、β酸化経路を遮断し、同時にペリプラズム酵素のチオエステラーゼ (TES) を細胞質で高発現させると脂肪酸の分泌が起こる。一方、コリネ型細菌では FasR の欠損のみで脂肪酸分泌が起こる。本菌種は細胞質に高い TES 活性を有しており、代謝調節が解除されると過剰合成されたアシル CoA が TES の作用を受けて遊離脂肪酸となり排出されると説明できる。脂肪酸の分解系に代わる一種の解毒機構とみなすことができる。

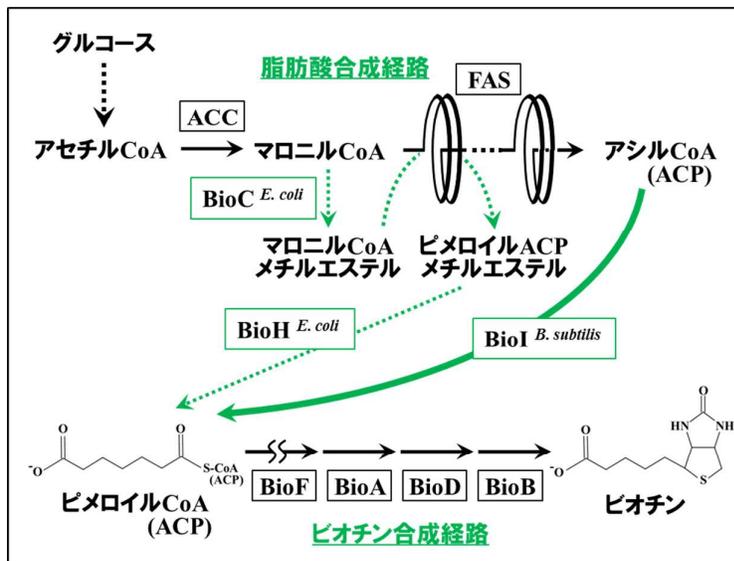


図2 コリネ型細菌におけるビオチン合成経路の代謝工学
 コリネ型細菌のビオチン合成経路は不完全で、BioFに加えて、ピメロイル CoA を供給する経路がない。ピメロイル CoA の供給ルートには2つのモデルが提唱されている。大腸菌の BioC-BioH ルートと枯草菌の BioI ルートである。コリネ型細菌に BioF と BioI の両機能を導入すると糖からビオチンに至る全経路が繋がり、ビオチンをデノボ合成できるようになる。

キーワード

Corynebacterium glutamicum, Fatty acid production, Biotin production