

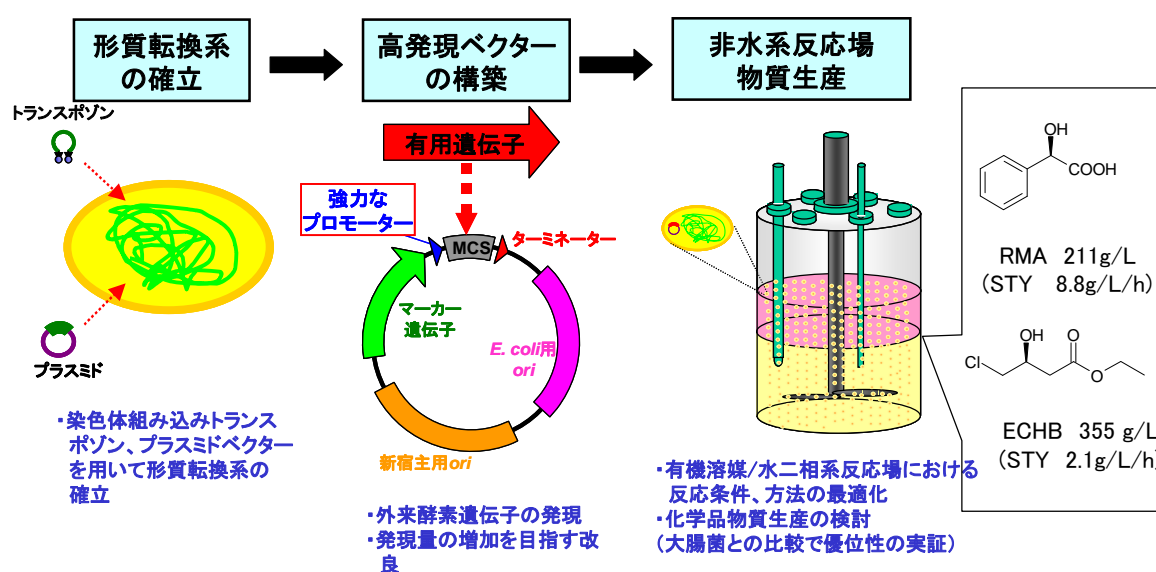
2. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

2. 2. 1 非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学工業株式会社)

2. 2. 1. 1 *Kocuria rhizophila* DC2201 等宿主細胞開発と有機溶媒耐性機構の研究(ダイセル化学工業)

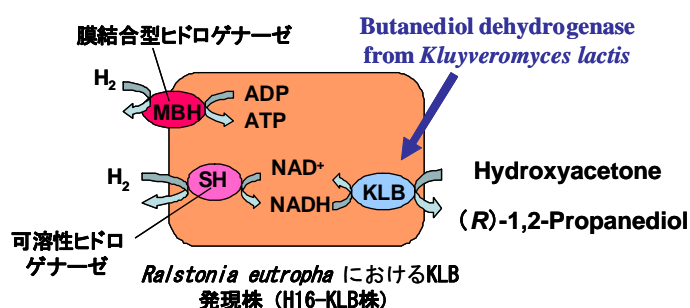
有機溶媒中で細胞構造が変化しにくい *Kocuria rhizophila* DC2201 株(以下、DC2201)を宿主とする発現系を開発し、水/有機溶媒の二相系反応場を用いた光学活性化合物の生産を実施した。まず、DC2201 を宿主として、遺伝子を発現できる系を確立するために、プラスミドベースの発現ベクター系を開発した。これまでに *Kocuria* で利用できる複製起点は報告されていなかったため、近縁種からプラスミドをスクリーニングすることにより、DC2201 において複製できる複製起点を取得した。次に、外来遺伝子を高発現するためのプロモーターとして、DC2201 において定常期に高生産されるタンパク質を分離、同定することにより、構成的に高発現できる *sodA* プロモーター (P_{sodA}) を取得した。 P_{sodA} を用いて *Arthrobacter* 由来のニトリラーゼ遺伝子を発現させた場合には、大腸菌と同程度の発現量が得られた。以上の結果より得られた複製起点およびプロモーターを利用して、新規の *Kocuria* 用の高発現ベクターを構築した。

開発した DC2201 を宿主とするベクター系を用いて、水/有機溶媒の二相系反応場での物質生産の検討を実施し、その有用性を検証した。その結果、(*R*)-マンデル酸の生産においては、211 g/L(水相)の世界最高濃度で蓄積できること、また、4-クロロ-3 ヒドロキシアセト酪酸エチルの生産においては、補酵素を添加することなく 355g/L(酢酸ブチル相)の濃度で蓄積できることを実証した。



2. 2. 1. 2 水素利用微生物触媒の開発と反応に関する研究開発(茨城大学)

水素利用微生物触媒の開発では水素酸化細菌宿主として *Ralstonia eutropha* H16 株および *Rhodococcus opacus* MR11 株を使用した。親水性化合物の変換反応に適する酵素として *Kluyveromyces lactis* 由来のアルコール脱水素酵素(KLB)、有機溶媒系での疎水性化合物変換反応に適する酵素として *Rhodococcus erythropolis* 由来のアルコール脱水素酵素(ReADH)を選抜し、可溶性ヒドロゲナーゼ・プロモーター制御下にて H16 株での機能的発現に成功した。MR11 株ではニトリラーゼ・プロモーター制御下に KLB 遺伝子を導入し、イソバレロニトリルを誘導剤として有機培養にて KLB を顕著に発現することができたが、誘導剤の添加が独立栄養的生育を顕著に阻害したため、ヒドロゲナーゼと KLB の共発現に至らなかった。得られた H16 株における KLB 発現株を微生物触媒とし、水素を反応駆動力としたヒドロキシアセトンの (*R*)-1, 2-プロパンジオールへの変換(水系)を検討した。ジャー反応により、76h で 67.7 g/l (0.89 g/l/h) の生成物が得られ、R 体過剰率は 99.85% *e. e.* であった。また、10%以上の水素分圧の存在で最大反応速度が得られること、水素ガス閉鎖循環系でも高い反応速度が得られ、消費水素と反応生成物のモル比はほぼ 1:1 であることなど、反応が効率よく進行することが示された。さらに ReSADH 発現株を用いて 4-クロロアセト酢酸エチルの (*R*)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルへの変換を試みたところ、フタル酸ジブチルを有機溶媒層とした二層系反応が基質と生成物の毒性軽減に有効で、水系での反応の約 22 倍の生成量が得られた。



2. 2. 1. 3 非水系生体触媒への水素酸化能付与に関する研究(東京大学)

有機溶媒耐性株あるいは大腸菌に *Ralstonia eutropha* 由来の NAD還元型ヒドロゲナーゼを発現させ、物質生産に資することを目標に研究を進めた。*Ralstonia eutropha* 由来 NAD還元型ヒドロゲナーゼの構造遺伝子 *hoxFUYH* とアクセサリ遺伝子 *hoxW* とをプラスミドに組み込み、当該プラスミドで大腸菌を形質転換したところ、嫌気条件あるいは微好气的条件で培養した菌体において、NAD還元型ヒドロゲナーゼの発現が確認された。なお、好気条件で培養した菌体においては、発現は確認されなかった。ここで、*Ralstonia eutropha* においては、*hoxFUYHWI* なる遺伝子構造をとっていることが分かっているが、*hoxI* については必須性は認められなかった。NAD還元型

ヒドロゲナーゼの機能的発現には、その活性中心を形成するためのアクセサリ遺伝子 (*hypABCDE*)が必要であるが、大腸菌ゲノム中にはそれぞれに対応する遺伝子が存在している。そこで1遺伝子破壊株を入手し、大腸菌中のそれぞれのアクセサリ遺伝子の必須性を調べたところ、基本的に全ての遺伝子に必須性が認められた。溶媒耐性株におけるヒドロゲナーゼの発現は、発現に必要な断片を含んだプラスミドの調製まで終了したものの、形質転換株を得ることができず、成功していない。

2. 2. 1. 4 酵素タンパク質の有機溶媒耐性機構と疎水性化合物変換酵素の研究(岐阜大学)

本研究課題に対して、「酵素タンパク質の有機溶媒耐性機構の研究」「水酸化反応、酸素添加反応を触媒する酵素の探索」「炭素-炭素結合反応(炭酸固定)を触媒する酵素の探索」を実施した。

(1) *Arthrobacter* F73 のニトリラーゼをとりあげ、ランダム変異導入による有機溶媒耐性が向上した強化変異体の取得を行なった。エラープローンPCR法でニトリラーゼに変異を導入し、特定のアミノ酸残基の置換、およびC末端領域のアミノ酸配列の改変が有機溶媒耐性の向上に影響を与えることを見いだした。その構造特性を明らかにするために、野生型ニトリラーゼの高純度で精製した。凝集体の形成し易さが結晶化に向けての問題点であり、精製ステップ等の改良を進めた。

(2) 難水溶性の基質であるアダマンタンおよびイソオイゲノールに作用する微生物酵素の探索を実施した。アダマンタンに水酸基を3つまで導入する微生物反応を放線菌に見だし、反応条件を最適化した。イソオイゲノールをバニリンへと変換する新規酵素イソオイゲノールモノオキシゲナーゼを *Pseudomonas* 属細菌に見だし、反応特性および遺伝子クローニングを行なった。大腸菌および *Kocuria rhizophila* DC2201 に遺伝子を導入して変換活性を比較し、イソオイゲノールの変換には有機溶媒耐性宿主が適することを示した。

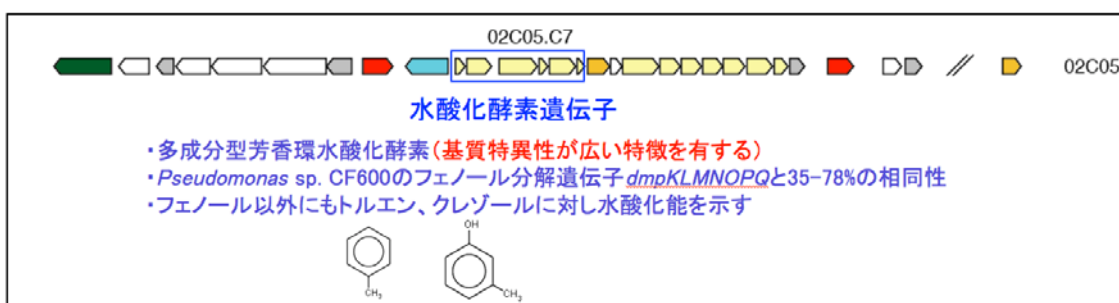
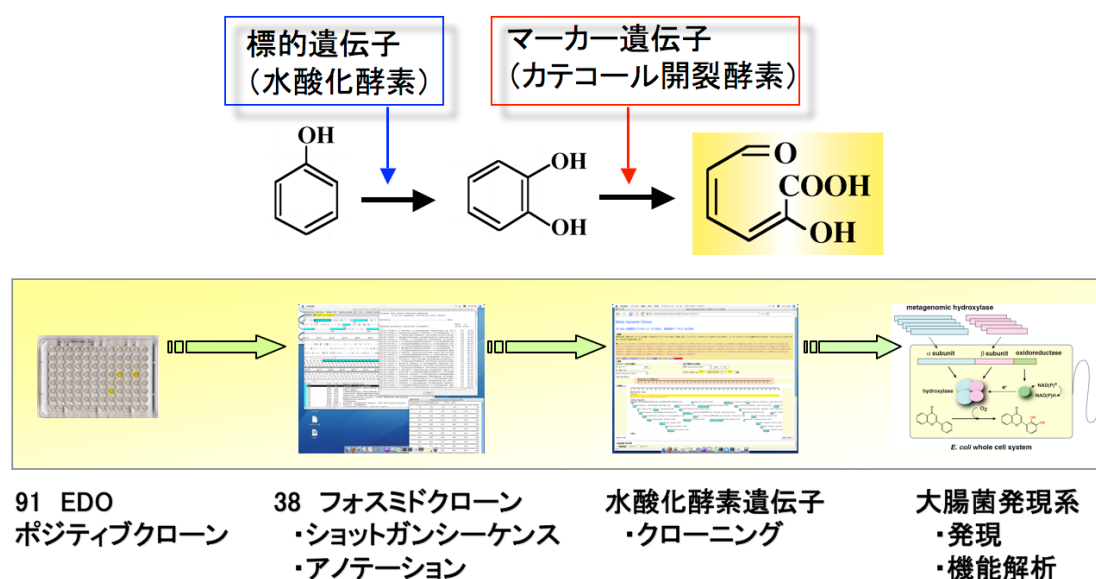
(3) 脱炭酸酵素の炭酸固定活性を活用した有用カルボン酸の酵素合成を目指し、超臨界二酸化炭素条件下で機能する酵素の探索を進めた。高温域適応型の4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を見出すために、集積培養を行ない、*Bacillus* 属細菌に高温域で安定に活性を示す菌株を見いだした。

2. 2. 1. 5 メタゲノム手法による芳香族水酸化酵素の開発と反応ルートの開拓(産業技術総合研究所)

メタゲノムより種々の芳香環水酸化酵素遺伝子を単離し、遺伝情報解析と機能解析を行った。既知の酵素と類似のマルチコンポーネント以外に、産業上の有用性が見込まれるモノコンポーネントタイプの酵素2種を見出した。これらの酵素遺伝子を大腸菌内で発現し、ナフトエ酸に対する水酸化活性を検討した。この際、位置選択的な水酸化体の検出方法として、4-アミノアンチピリンとナフトエ酸水酸化物をラッカーゼ存在下でカップリング重合させることを試み、実際に、ナフトエ酸の水酸化位置の違いにより異なる呈色反応産物が得られることを見出した。本アッセイ系を構築した上で、野生型酵素の水酸化可能を検討したが、有意な活性を示さなかった。

そこで、特にモノコンポーネントタイプの酵素2種について、進化工学的な改変(変異 PCR 法によるランダム変異)も試みたが、ナフトエ酸に対して水酸化能を持つ酵素は得られなかった。

この他、in house メタゲノム配列データベースを活用し、その遺伝情報解析により、ナフトエ酸水酸化活性を持つと推測される酵素遺伝子を同定し、遺伝子発現と機能解析を行ったが、本酵素についてもナフトエ酸水酸化活性を確認するには至っていない。



2. 2. 1. 6 有機溶媒耐性酵素等有用酵素の精製・結晶化・構造化学的研究(兵庫県立大学)

本研究課題に対して「有機溶媒耐性ニトリラーゼの精製・結晶化および構造化学的研究」「その他の有用酵素の構造化学的研究」を実施した。

(1) *Fusarium* AAM1 由来のニトリラーゼについて SDS 電気泳動的に不純物バンドが見られないところまで精製し、結晶化を試みたが結晶は得られなかった。そこで、ネイティブ電気泳動および動的散乱法によりその性状を調査した。その結果、精製酵素はネイティブ電気泳動ゲル上で単量体から 10 量体以上におよぶ多量体の混合物であることがわかった。また、動的散乱法による結果も分子量的に不均一な会合物の混合物であることを指示していた。そこで、他の菌株由来の同等酵素の検索を行い、*Arthrobacter* F73 由来のニトリラーゼを精製し、同様にその性状を調査した。その結果、本酵素は、精製直後はネイティブ電気泳動上単一のバンドを示し、動的散乱の結果は、ほぼ 10 量体程度の均一な会合状態であることがわかった。しかし、精製後、時間経過に伴ってさらに大きな凝集状態に移って行く傾向も見られた。現在は、できるだけ 10 量体を維持できる溶液条件と短時間で結晶化させる条件を検討中である。

(2) *Alkaligene* 由来の 2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase の結晶化および結晶構造解析に成功した。分子は 4 量体で一分子の全体構造は、*Rhizobium* 由来の酵素 (PDB=2DVU) とほぼ同じであり、両者の原子座標の変位の二乗平均平方根は約 0.6 Å であった。活性部位と思われる部分の重要残基の原子座標もほぼ重なった。しかし、*Rhizobium* の酵素で活性に必須と思われる Zn とと思われる電子密度が低かった。また、*Alkaligenes* 由来の酵素では、酵素活性は Zn の濃度に依存しないことがわかった。現在、その原子種について調査を続けている。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY 2006	0件	0件	0件	3件	0件	3件
H19FY 2007	0件	0件	0件	2件	0件	6件
H20FY 2008	0件	0件	0件	1件	0件	9件
H21FY 2009	1件	0件	0件	2件	1件	4件
H22FY 2010	1件(予定)	0件	0件	3件	2件	9件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 2. 2 酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン株式会社)

2. 2. 2. 1 酸素添加酵素任意デザイン化技術の研究開発 Vdh の機能改変 (メルシャン株式会社)

大腸菌発現系、スクリーニング系の構築

Vdh のビタミン D2 (VD2) 25 位水酸化活性向上を目的として機能改変を行った。大腸菌を宿主とした機能改変を行うために、大腸菌における Vdh の発現と電子伝達系の検討を行った。Vdh は *Pseudonocardia autotrophica* よりクローニングされたが、共役する電子伝達系タンパク質(レドックスパートナー)について本研究開始時は未同定であった。そこで、大腸菌の休止菌体反応による VD2 変換試験での VD2 25 位水酸化活性を指標に他の微生物由来のレドックスパートナーを検討したところ、*Acinetobacter* 属細菌由来のフェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素遺伝子 (*aciBC*) を共発現させた時、最も高い活性が得られた。続いて、大腸菌の whole cell 反応を利用した Vdh 変異ライブラリーのスクリーニング条件を検討した。基質濃度や反応時間を検討することにより、活性のばらつきが無く、活性向上クローンを検出しやすいスクリーニング条件を設定した。

高機能化酵素の取得

設定した条件により高活性 Vdh 変異体のスクリーニングを行った。Error-prone PCR 法で Vdh 遺伝子のランダム変異ライブラリーを構築し、前述のスクリーニング法に従って、VD2 25 位水酸化活性が向上した変異クローンの分離を試みた。約 1000 クローンのスクリーニングにより、コントロール株より活性が高い株を 23 株同定した。これら 23 株の変異点解析により、Vdh の活性向上に寄与する 8 箇所の置換部位を同定した。これらの部位をアミノ酸総置換し、最も比活性(酵素あたりの活性)が高くなるアミノ酸置換を決定した(図1)。その結果、一箇所のアミノ酸置換で活性が 1.9 から 2.8 倍上昇し、3 次元結晶構造解析を元にそれらの置換部位の分布を見ると、基質ポケットの入り口やフレキシビリティが高いと推測される FG ヘリックスの付け根、フェレドキシン相互作用部位と推測される部位の近傍に分布していることが示された(図2)。

更なる高活性化 Vdh を作製するために、上記 8 箇所の中から有効アミノ酸変異の多重化を行い、四重変異体活性向上酵素 (Vdh-K1) を構築した(図 1)。この Vdh 改変酵素を大腸菌で発現させて水酸化活性を調べた結果、VD2 の水酸化は最高で野生型 Vdh の 11.5 倍まで増加した。さらにこれらの改変 Vdh は VD3 に対しても野生型の 21.6 倍の比活性向上が認められた。

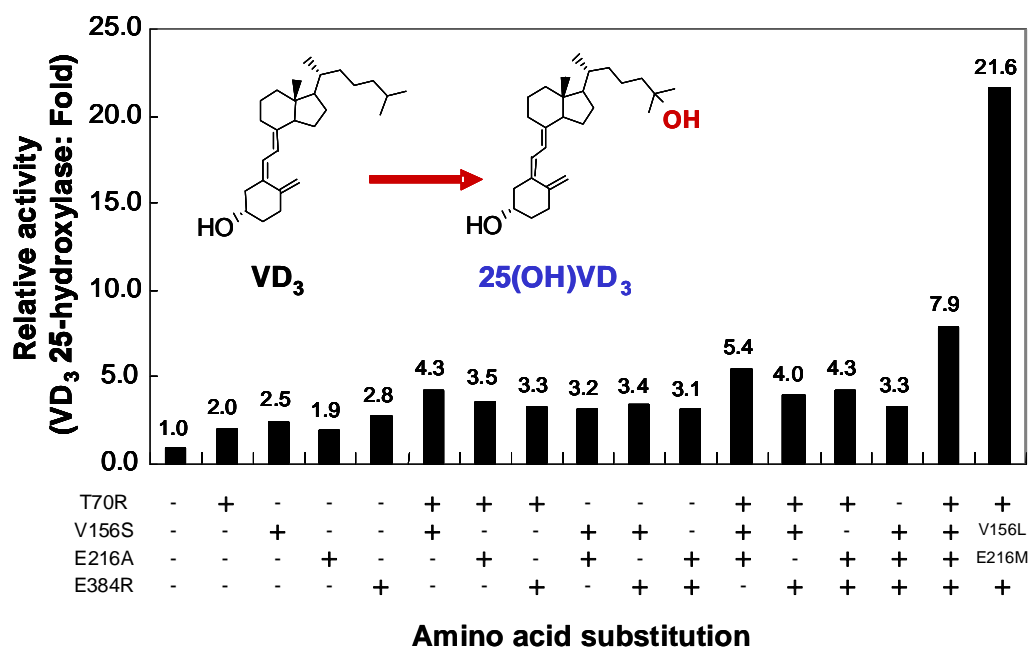


図1. Vdhの有効変異の組合せによる活性上昇

活性向上に寄与する各変異部位において最大の活性をもたらすアミノ酸の置換体、さらにそれらの2-4の多重変異体を作製した。それぞれの相対活性を示す。

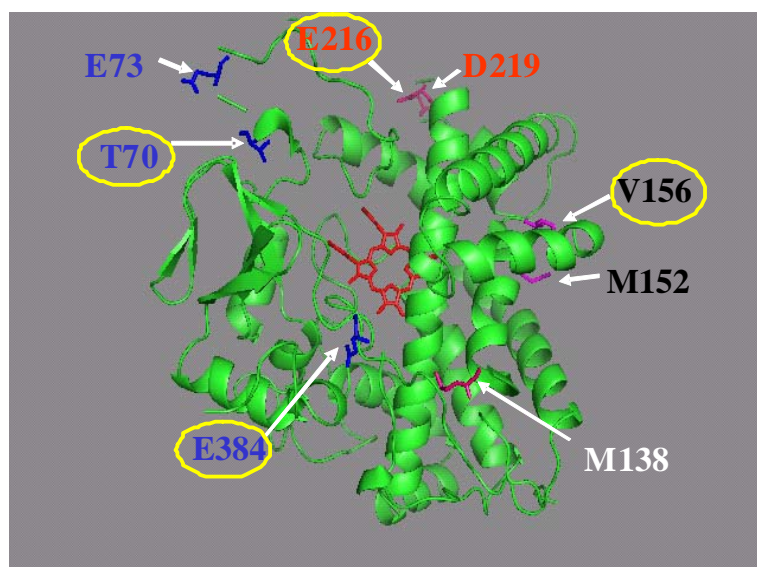


図2. Vdhの活性向上に有効だった変異部位

活性向上に寄与する変異部位を野生型Vdh結晶構造上に示した。E73, T70, E384は基質認識部位、E216, D219はフェレドキシン作用部位、V156, M152はFGヘリックスのヒンジ部位と推定される。最大の活性を有する改変酵素Vdh-K1がもつ変異部位(T70R, V156L, E216M, E384R)

を○で囲む。

Vdh の機能改変による高活性化に加えて、副反応制御も生産プロセスを視野に入れた酵素の高機能化では重要な課題である。VD3 は Vdh により水酸化されてカルシトリオール (1,25-dihydroxy VD3) を生成する。この時、26 位水酸化体が副生成物として生じる。そこで 26 位水酸化反応が抑制された Vdh の構築を目的として有効変異点の探索を開始した。産総研で明らかにされた結晶構造データに基づいて基質 VD3 と相互作用すると考えられる Vdh のへム近傍に位置する数箇所のアミノ酸残基に対してアミノ酸置換による副反応抑制効果を調べた。その結果 88 番目のイソロイシン残基をバリンに置換した時に副反応物生成が顕著に抑制されることを発見した。この変異(I88V)を前述の高活性化酵素 Vdh-K1 に導入した酵素(VdhK1-I88V)では顕著な副反応物比率の減少が認められた。すなわち VdhK1-I88V では向上した比活性(野生型酵素の 20 倍)を維持したまま副反応物比率(野生型酵素は 10.1%)が 1.7% まで低減していた。以上の改変酵素の機能評価は大腸菌組み換え株を用いたものであるため、実際の能力検証のため、VdhK1-I88V 遺伝子を親株の VD 変換放線菌 *P. autotrophica* に導入した株を構築し、VD3 の水酸化変換試験を実施した。すでに開発 *P. autotrophica* ベクターを用いて内在の野生型 Vdh を破壊した *P. autotrophica* を宿主にして Vdh-K1 遺伝子や VdhK1-I88V 遺伝子をゲノムにインテグレートさせた。得られた株は元の株に対して最大 2 倍の 25(OH)VD3 の生産速度(変換 24 時間後)を与えたものの変換速度は持続しなかったため 72-96 時間後には元株の生産量に追いついた(図3A)。一方で I88V 変異に基づく 26 位水酸化副反応の抑制は顕著な効果を示し、副反応生成比は元株の 1/13 に低減させることができた(図3B)。

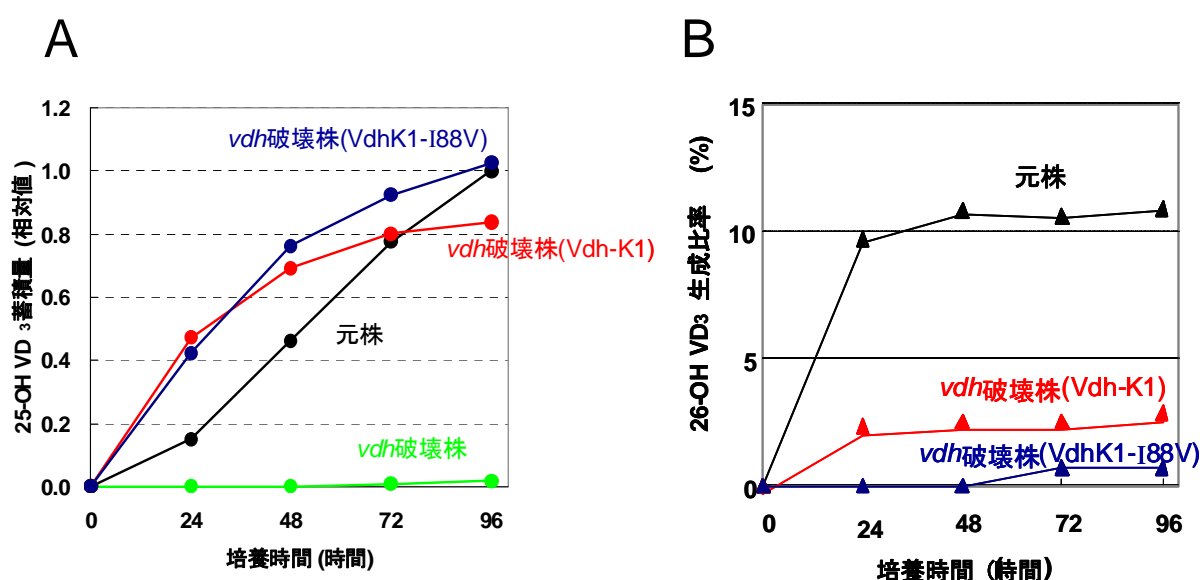


図 3. 高機能化酵素を発現させた *P. autotrophica* による VD3 変換試験

VD3 を基質とした変換試験で 25(OH)VD₃ の生産量 (A) および 26 位水酸化副反応物生成比

率 (B) を示した。

ドラフトゲノム配列情報を利用したビタミンD水酸化に影響を及ぼす遺伝子の探索と利用

VD 水酸化変換菌 *P. autotrophica* のゲノム配列をドラフトレベルで解析した結果、ゲノムは 6.9 Mb の環状ゲノムと 278 kb の環状プラスミドから構成されることが分かった。全配列の GC 含量は 72.8% であった。このゲノムデータから水酸化反応場促進に関わる遺伝子の探索を行うことで、従来の遺伝生化学的手法に比べ迅速な目的候補遺伝子の有効性検証が可能となった。細胞外からの基質取込みを促進することは、変換反応の効率の向上につながる。ゲノムに見出された物質の取り込みや排出に関与するトランスポーター遺伝子を使って機能試験を行ったが、VD 類の排出、取り込みに強く関わるものは認められなかった。そのほか、数種の反応場促進に影響を及ぼすことが推測される遺伝子の探索、有効性の検証を行い、有効な遺伝子を *P. autotrophica* の育種に利用することで最終的に生産性を従来の数倍に高めることができた。

2. 2. 2. 2 Vdh の結晶構造解析 (産総研)

Vdh 大量発現系の構築・結晶化

実験に用いるサンプルを取得するため、最初に組替え Vdh の大量発現系の構築および精製方法の確立を行った。野生型 Vdh (Vdh-WT) は大腸菌もしくは *Rhodococcus erythropolis* を用いて、高活性型 4 重変異体 Vdh-K1 は大腸菌を用いて、それぞれ結晶化に用いる事が可能な十分量の蛋白質の発現に成功した。サンプルは C 末端にヒスチジンタグを融合させて発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行い、高純度サンプルの調製を行った。サンプルは約 20 mg/ml にまで濃縮した後、結晶化スクリーニング、および可視紫外吸収スペクトル測定、酵素アッセイ等に用いた。

精製サンプルは、市販の結晶化スクリーニングキット (約 300 条件) を利用し蒸気拡散法によって初期結晶化条件を探索し、得られた初期条件を最適化することで Vdh-WT および Vdh-K1 とともに高品質の単結晶を得る事に成功した。また、基質であるビタミン D₃ (VD₃) および 25 位水酸化ビタミン D₃ (25(OH)VD₃) との複合体構造の解析を行うため、過剰量の基質をサンプルと混合することで複合体を形成させ、上記と同様の手法で結晶化条件の探索を行い、解析可能な単結晶を得た。複合体の形成は、可視紫外吸収スペクトルを測定することで確認した (後述の「高活性化の構造基盤」)。

Vdh の立体構造解析

・構造決定

全ての結晶回折データ収集は、茨城県つくば市の高エネルギー加速器研究機構に設置されているシンクロトロン放射光施設において行った。構造解析は、Vdh が所属する CYP107 ファミリーにおいて構造既知であった P450eryF をサーチモデルとして用いた分子置換法を適用し、解を得ることに成功した。Vdh-WT に対しては二つの異なる結晶系に属する基質フリー状態の構造を、

また Vdh-K1 に対しては基質フリー状態、VD3 複合体、および 25(OH)VD3 複合体の構造解析を行い、全ての構造モデルを精密化し、比較考察に用いた。構造モデルは全て蛋白質構造データベース(Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>)に登録した(PDB code; 3A4G, 3AH, 3A4Z, 3A50, 3A51)。

・全体構造

構造解析の結果、Vdh の全体構造が明らかになった(図 4)。一般的にフレキシブルであり基質認識に重要な役割を果たすことが多い BC ループや FG ループを含め、ほぼ全ての領域の電子密度が明瞭に観察された。Vdh の立体構造は、これまでに知られている基本的な P450 フォールドを示し、分子中央にはヘムの結合が確認された。Vdh-WT および Vdh-K1 を比較したところ、大きな構造変化が観察された。Vdh-WT はヘム鉄上部の基質結合ポケットが大きく溶媒に露出したオープン構造を形成していたのに対し、Vdh-K1 は FG ヘルックスが約 8Å ほど基質結合ポケット側に移動し、それに伴って基質結合サイトが分子外部の溶媒領域から部分的に遮断されることでクローズ構造を形成していた。基質複合体においては、この基質結合ポケットに VD3 および 25(OH)VD3 に相当する電子密度が観察された。一方、Vdh-WT においては結晶化条件に多量の基質分子を加えた場合であっても、基質に相当する電子密度は観察されなかった。Vdh の結晶構造を既に解析されている他の P450 分子と比較したところ、同じ 107ファミリーに属する P450 PikC に最も相同であった。Vdh-WT (オープン構造)は PikC の基質フリー構造(オープン構造)に、Vdh-K1 (クローズ構造)は PikC の基質結合構造(クローズ構造)に最も相同であり、PikC の基質結合に伴う構造変化は、Vdh-WT と Vdh-K1 の間で観察される構造変化と類似していた。

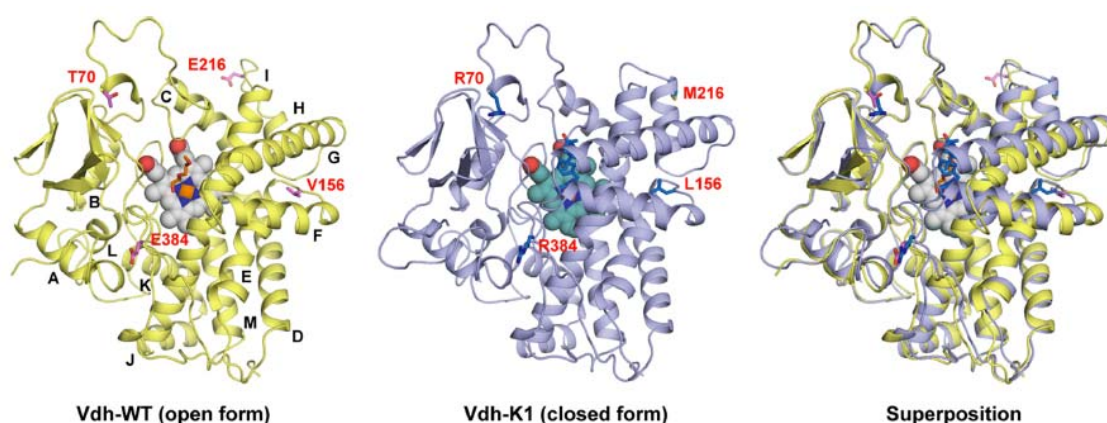


図 4. Vdh-WT および Vdh-K1 の全体構造

Vdh-WT と Vdh-K1 の間で顕著なコンフォメーション変化が観察された。進化工学により Vdh-K1 に導入された 4 カ所の変異を赤で示した。

・高活性化の構造基盤

進化学により取得された高活性型4重変異体である Vdh-K1 は、in vitro 再構成系による活性測定の結果、VD₃ に対する2段階水酸化反応のどちらのステップに対しても飛躍的な活性の向上が観察された(表1)。また、可視紫外吸収スペクトル測定により酵素と基質の解離定数を調べたところ、Vdh-WT では基質結合スペクトル変化は観察されず親和性が認められないのに対し、Vdh-K1 は非常に高い基質親和性を示すことが明らかになった(図5)。結晶構造解析の結果も、これらスペクトルアッセイおよび活性測定の結果を支持しており、Vdh-K1 ではクローズ構造へとコンフォメーションを変化させ、基質をへムポケットに取り込んでいることが確認された。基質フリーおよび基質結合状態のどちらに対しても Vdh-WT はオープン構造を、Vdh-K1 はクローズ構造を示したことから、構造の変化は基質結合によって誘導されるのではなく、Vdh-K1 に導入された4カ所の変異によって引き起こされたと考えられた。すなわち、オープン構造とクローズ構造の構造変化の平衡は Vdh-WT においては大きくオープン側に傾いており、この平衡状態は4カ所の変異が導入されることによってクローズ側に移行したと考えられる。Vdh-K1 に導入された変異箇所はいずれも活性部位から大きく離れた場所に位置しており、基質認識に直接関与しているとは考えられない。一方で4カ所の変異のうち3カ所の変異は、それぞれオープン構造を不安定化もしくはクローズ構造を安定化する作用があると推察され、構造変化の平衡状態を移動させる駆動力となりうると考えられた(図6)。

4カ所のそれぞれの変異が基質結合アフィニティ変化にどれくらい寄与するかを調べるため、それぞれの1アミノ酸残基変異体を作製し可視紫外吸収スペクトル測定を行った。結果として、V156L で大きな変化が見られたが、Vdh-K1 ほどの高アフィニティは観察されなかった。その他の3種の変異体は Vdh-WT 同様に基質への親和性はほとんど見られなかった。このような結果から、Vdh-K1 の基質に対する高い親和性は、これら4カ所の変異が協

調的に作用して初めて起こるものと考えられる。

表1 in vitro 再構成系による酵素活性の比較

	Vdh-WT	Vdh-K1
VD ₃ 25-hydroxylase activity (mmol/min/mol Vdh)	173.3 ± 10.7 (1.00)*	2,002 ± 361 (11.6)*
25(OH)VD ₃ 1 α -hydroxylase activity (mmol/min/mol Vdh)	253.0 ± 4.5 (1.00)*	6,337 ± 383 (25.0)*

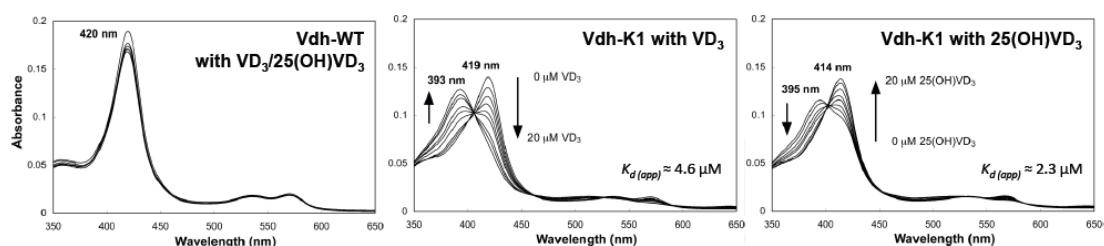


図 5. 可視紫外吸収スペクトル測定による酵素基質間の親和性の比較

Vdh-WT においてはいずれの基質に対してもほとんどスペクトル変化が観察されないが、Vdh-K1 は大きく変化することが明らかになった。スペクトル変化はヘム鉄の電子状態の変化を示しており、ヘム鉄近傍に基質が結合したことを示している。

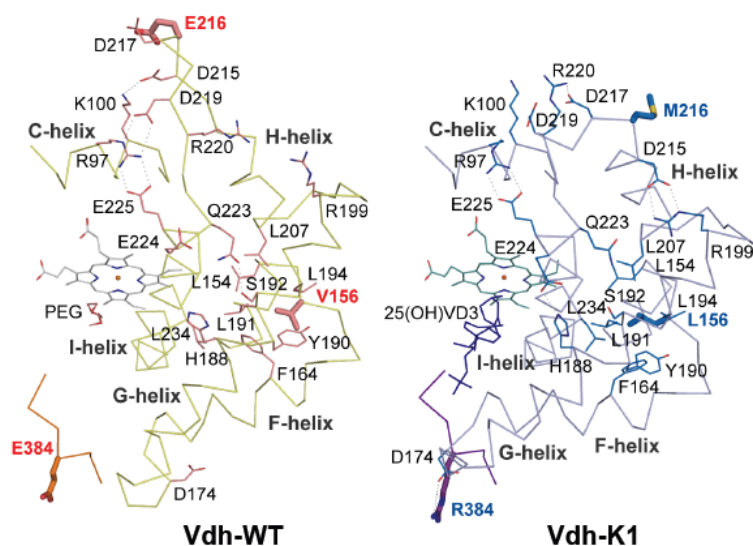


図 6. 構造変化が観察された FG ヘルックスおよび HI ループ近傍

Vdh-K1 に導入された 4 種の変異のうち 3 種を赤で示した。E216M および V156L はそれぞれオープン構造を不安定化させ、E384R はクローズ構造を安定化させる寄与を持つ事が推測される。

・ 2段階連続水酸化を可能とする基質結合メカニズム

Vdh-K1 と基質 VD3 および 25(OH)VD3 との複合体構造解析に成功したため、基質認識の詳細を観察することが可能となった。Vdh はまず VD3 の 25 位を水酸化し、引き続いて 25(OH)VD3 に対して 1 α 位を水酸化する。25 位と 1 位はビタミン D 骨格の両端に位置するため、酵素のビタミン D 骨格の認識は両者で大きく異なっていることが考えられる。

構造解析の結果、Vdh-K1 に対して VD3 と 25(OH)VD3 の結合は完全に上下が反転しており、VD3 は 25 位側を、25(OH)VD3 は 1 位側をそれぞれヘム鉄に向けるように結合していることが明らかになった (図 7)。これは酵素の二段階水酸化反応の結果と矛盾しない。VD3 複合体と 25(OH)VD3 複合体の構造を重ね合わせたところ、両者の間に酵素構造の差異は全く認められなかった。つまり、Vdh-K1 で観察されたクローズ構造は、ビタミン D 骨格を上下反転した二つの状態で認識可能であることが示唆される。しかかしながら実際には、VD3 に対して最初に 1 位が水酸化されることはない。これは、疎水性の高い 25 位側を溶媒に接する分子の外側 (ヘムから遠い基質結合ポケットの入り口側) に向けることがエネルギー的に不安定であることに起因すると推測される。一方、25(OH)VD3 複合体構造において 25 位水酸基は溶媒の水と水素結合を形成しており、1 位をヘム側に向けた状態でも安定な結合が可能になると考えられる。

上下が反転した全く異なる二種の基質結合状態が存在するにも関わらず、酵素は全く基質の形状に応じた構造変化を示さない。このことは、Vdh-K1 における活性の向上が基質特異性の向上によるものではないことを示唆している。上述の通り、Vdh-K1 に導入された 4 カ所の変異は全て基質認識に直接関わるができない場所であり、おそらくオープンとクローズ構造間の平衡状態を大きくクローズ側にシフトさせる役割を果たすことで、そもそもの酵素の性能向上を可能にしたと考えられる。多くの P450 分子が基質の取り込みに際してオープンとクローズ間の構造変化があることが分かっており、このような構造状態間の平衡を調整する変異を選択することで、どのような P450 に対しても基質の種類に関係なく活性を向上させることができる可能性が示された。

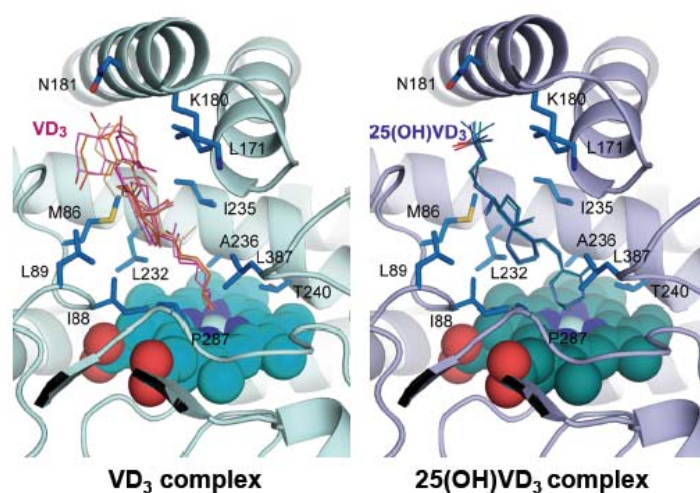


図 7. Vdh-K1 基質複合体の基質結合ポケットの詳細

VD₃ および 25(OH)VD₃ は互いに上下反転した方向で酵素に結合しており、水酸化される部位をヘム鉄近傍に接近させていた。一方、基質がどちらの向きで結合しても酵素の構造には全く変化は観察されなかった。

・副反応低減変異体作成に向けた情報取得

Vdh-K1 において基質複合体構造の解析に成功したため、酵素と基質間の原子間相互作用の詳細情報を取得する事ができた。この情報をもとに、炭素 25 位近傍に存在する Vdh のアミノ酸残基を 4 種類選択し、26 位水酸化の副反応を低減させる変異導入箇所の候補とした。結果、Vdh-K1 にさらに I88V の変異を導入した 5 重変異体を用いる事で、26 位水酸化体が検出されない VD₃ 変換が可能になった（前述「高機能化酵素の取得」）。

レドックスパートナー蛋白質の構造解析

P450 酵素が活性を発揮するためには、適切な電子伝達蛋白質が必要となる。異宿主における生体変換を可能とするためには、酵素反応が適切に進むためのレドックスパートナーの探索および電子伝達の効率化が不可欠となる。今回、Vdh に電子を受け渡すことが可能な *Rhodococcus* 由来 ThcCD および *Acinetobacter* 由来 AciBC 蛋白質（フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素）を大量発現させ、結晶化および構造解析を行い、電子伝達に重要なアミノ酸残基の解析および変異導入による電子伝達のされなく効率化を目指した。これまでにフェレドキシン還元酵素（ThcD および AciC）の構造解析に成功したが、鉄硫黄クラスターを含むフェレドキシンの結晶を得る事ができなかったため、構造モデルを利用した変異導入による電子伝達の効率化に関する実験は実施することができなかった。

ナイシン処理細胞による変換実験

Vdh の構造解析が予定より早く完了したため、研究後半において、VD₃ の微生物変換効率を高める研究を行った。これまでの研究から、VD₃ の水酸化体生産効率は、宿主細胞内に発現する Vdh やレドックスパートナー分子の細胞内発現量と比例せず、あるレベルで頭打ちになることを確認している。VD₃ は水に難溶性のため、シクロデキストリン(CD)に包接し反応液への溶解度を高めているが、細胞内への VD₃ 移行は CD から乖離して拡散により進むと考えられており、細胞内の VD₃ 濃度を高めることは容易でない。従って、VD₃ 水酸化反応の効率改善には宿主細胞における VD₃ 透過性の改善が重要であることが示唆された。そこで標的細胞 (*R. erythropolis* JCM3201 株)の細胞膜に抗菌物質 nisin により孔を形成させ、VD₃-CD 複合体がその孔から細胞内へ移行することで VD₃ 水酸化効率の上昇を期待し研究を展開した。

nisin は食品添加物として認定されている抗菌物質で、その作用機序は詳細に解析されている。実際、*R. erythropolis* JCM3201 株に nisin を添加すると細胞膜上に孔が形成され 99%以上の細胞は致死する。この時、細胞は溶菌することなく再回収できることから、nisin 処理した細胞の形態は安定に保持されていると予想された。また細胞内タンパク質の漏出も確認されなかったことから、細胞内に過剰発現したタンパク質がそのまま保持できると考えられた。次に、nisin 処理した細胞に対し、モデル基質として過酸化水素によって発光する緑色化学発光 γ -シクロデキストリン (Green Chemi-luminescence CD, GCCD) を添加し、その細胞内取り込みを調べると、nisin の濃度、処理時間に依存して高くなり、nisin 孔が CD の通り道として利用可能であることを確認した。

そこで、実際 VD₃ を包接させた CD 複合体を使用して水酸化反応の条件検討を行った。その結果、nisin 処理した細胞は、生細胞の場合とは異なり反応系に NADH 再生系を要求すること、そして細胞内に安定なレドックスパートナーを発現させておくことが重要であることが判明した。

上記条件を満たした反応系を用いて nisin 処理細胞の VD₃ 水酸化体生産性を検討した。その結果、nisin 処理細胞は、同未処理細胞に比べて数倍高い水酸化効率が得られることが確認された。更に nisin 処理した細胞を、16 時間の反応を 1 サイクルとした繰返し反応を行うと、1 回毎の VD₃ 水酸化率は最大 90%近くまで向上させうることを見出した。また、4 サイクル反応後の VD₃ 水酸化体総収量は、nisin 未処理細胞に対し約 6 倍高くなることを見出し、生細胞を利用して得られる結果より遙かに高効率な水酸化生産系の構築に成功した(図 8)。

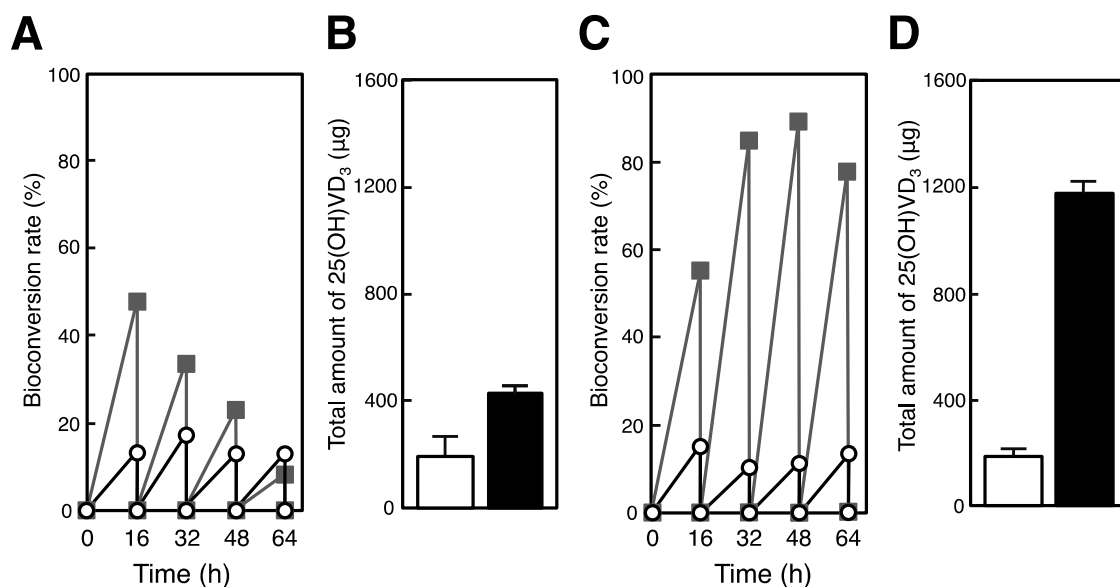


図 8. ナイシン処理した *Rhodococcus erythropolis* 細胞を用いた 25(OH)VD₃ 水酸化変換の繰り返し実験

nisin 処理した細胞を用いて 16 時間を 1 サイクルとした繰り返し反応を行い各反応時間における 25(OH)VD₃ 水酸化効率を調べた (■)。同効率は、細胞内安定性の低いフェレドキシン (ThcC) をレドックスパートナーとして発現した細胞では時間と共に低下する (A)。一方、細胞内安定性の高いフェレドキシン (AciB) をレドックスパートナーとして発現した場合には、変換効率を高く維持できる (C)。生細胞による変換効率は、反応サイクルを通して大きく変動しないが低いレベルで維持される (○)。25(OH)VD₃ の生産量は、生細胞 (open bar) に比べて nisin 処理細胞 (closed bar) が高く、ThcC を発現した場合より (B)、AciB を発現した方が著しく高くなる (D)。

以上のことより、Vdh とその基質複合体の構造解析より、VD₃ 水酸化反応機構を原子レベルで解析・応用することを可能とする成果が得られた。また、nisin を利用した VD₃ 水酸化反応効率を向上させる反応系の構築にも成功した。これらの成果により、VD₃ のみならず、他の難溶性物質を基質とした微生物変換、あるいは P450 を介した微生物変換系に有用な情報を取得出来たと考えられる。

2. 2. 2. 3 Whole cell catalyst 内外における酵素反応場の解析・制御技術の開発（大阪大学）

細胞内反応場構成素子の研究

P450活性に影響を及ぼす宿主細胞遺伝子の同定・制御を目的として、大腸菌1遺伝子破壊株ライブラリーを宿主とした活性向上株のスクリーニングを行った。大腸菌BW25113由来の1遺伝子破壊株約4,000からなるKeio collectionを宿主とし、これらに*Streptomyces coelicolor*由来のP450であるCYP154A1遺伝子を導入・発現させた。7-エトキシマリンの脱エチル化活性を指標としたスクリーニングを行った結果、約80の活性上昇株が見出された。ついで、再現性を確認するために試験管スケールでの2次スクリーニングを実施した。この結果、野生株と比較して、生育速度に大きな違いがなく、なおかつ相対活性が1.5倍以上に上昇した4株を選抜した。野生株から再度相応する遺伝子破壊株を作成し、結果の再現性を評価したところ、これらのうち3株($\Delta cpxA$, $\Delta gcvR$, $\Delta glnL$)においてCYP154A1活性の増大が認められた。再現性が見られなかった1株についてはターゲット遺伝子以外の部分に生じた自然発生的な変異がP450活性に影響を及ぼしたものと考えられる。

多重遺伝子破壊による活性向上を目指したところ、 $\Delta cpxA/\Delta glnL$, $\Delta glnL/\Delta gcvR$ の組み合わせにおいて、単位菌体量当たりの比活性が、一重変異株の1.5倍程度に向上した。しかし、これは主として生育の悪化によるものであり、単位培養液量当たりの活性にほとんど変化が見られなかった。なお、 $\Delta cpxA/\Delta gcvR$ の二重破壊株は取得できず、両者がともに欠損することにより大腸菌に致命的な影響が及ぶものと考えられる。従って、3重変異株の作成は行っていない。

次にここまで得られた3つの1遺伝子破壊株を用いて、CYP154A1以外のP450に対する活性向上効果の有無を検証した。この結果、 $\Delta gcvR$, $\Delta glnL$ の2株における活性向上は、CYP154A1にのみ特異的であったのに対して、 $\Delta cpxA$ はアッセイを行った全てのP450反応 (*Streptomyces* sp. TM-7由来BoxAによるジクロフェナク水酸化反応、*Pseudonocardia autotrophica*由来VdhによるビタミンD3の25位水酸化反応、および*Bacillus megaterium*由来BM3 F87V変異型P450によるジクロロフェノール水酸化反応)において、野生株に比べ、それぞれ7.8、3.9、4.6倍の相対活性を示した(表2)。

これらのP450アッセイはいずれも転写制御にラクトース誘導型プロモーター (*tac*およびT7プロモーター)を用いたものであった。次に熱誘導型プロモーターである P_{rP_L} プロモーター制御下にBM3 F87Vを連結したベクターを用い、プロモーター種の違いによる影響を調査した。この場合、野生株、 $\Delta cpxA$ の両者において、BM3 F87V活性に大きな違いは認められず、 $\Delta cpxA$ におけるP450活性の向上はラクトース誘導型プロモーターの転写活性増大に起因することが示唆された(表2)。 $\Delta cpxA$ 内におけるT7プロモーター下からのBM3 F87Vの転写量をreal-time RT PCRで定量化したところ、野生株を宿主とした場合に比べ、mRNA量が100倍程度向上していることが明らかとなった。

CpxAは大腸菌内に約30ペアが存在するとされる2成分シグナル伝達経路のセンサーキナーゼの1つである。CpxAは、折りたたみ不全タンパク質蓄積など、膜ストレスと総称される一連のストレスを感知し、カウンターパートナーであるCpxRのリン酸化を通じて、各種のストレス応答タンパク質の転写調節を行う。本シグナル伝達経路(Cpx経路)の活性化により転写が促進される*degP*の発現量を定量することでCpx経路の活性化をモニターしたところ、野生株においてはP450発現時にのみ同経路が活性化されていることが確認された。大腸菌ではCpxAにより感知される膜ストレス存在下でラクトースやプロリンなどの能動輸送が抑制されることが知られている。これに従って考察すると、*cpxA*を欠損させることにより、膜ストレスによって引き起こされるラクトースの輸送抑制が解除をされ、転写誘導物質であるラクトースの細胞内濃度が高まり、この結果、P450転写量が増大した、という一連の推察を行うことができる。一方で、 $\Delta cpxR$ を宿主とした場合、 $\Delta cpxA$ と同様の

活性向上効果は認められず、上記の推察の是非によらず CpxA の欠損による活性向上は本来のカウンターパートナーである CpxR を介さないクロストークによって引き起こされていることが示唆された。

表2. $\Delta cpxA$ 株を宿主とした各種P450の酵素活性

P450	Promoter	Total activity		Specific activity		Total relative activity ^a
		(nmol/h/ml culture)		(nmol/h/mg dry cells)		
		Wild type	$\Delta cpxA$	Wild type	$\Delta cpxA$	
CYP154A1	<i>tac</i>	2.20 ± 0.17	4.05 ± 0.30	0.27 ± 0.03	0.53 ± 0.05	184
	T7	2.31 ± 0.18	5.68 ± 0.33	0.30 ± 0.03	0.77 ± 0.09	246
BoxA	T7	1.64 ± 0.09	13.0 ± 0.94	0.25 ± 0.02	2.40 ± 0.19	785
Vdh	T7	27.8 ± 1.94 ^b	109 ± 11.0 ^b	5.25 ± 0.33 ^b	21.1 ± 1.70 ^b	3.94
BM3 F87V	T7	34.1 ± 1.91	156 ± 12.6	6.93 ± 0.47	34.2 ± 3.13	461
	P _R P _L	54.2 ± 4.93	46.1 ± 5.11	9.25 ± 1.01	8.48 ± 0.66	85

^a 野生株を宿主とした時の活性を 100%とした CpxA 破壊株の相対活性

^b × 10⁻³

非水環境下での物質生産系の研究

有機溶媒耐性細菌として発見・単離された *Rhodococcus opacus* B4 は疎水性の高い細胞表面構造を有し、湿潤状態で有機溶媒に分散・けん濁できるユニークな特性を示す。本菌を宿主として利用することにより、水をほとんど含まない有機溶媒中における微生物変換反応を実施した。種々の有機溶媒に *R. opacus* B4 の湿菌体をけん濁し、30°C にて 1~5 日間、振とうした後の菌体の生存率をコロニーカウンティングにより測定した。有機溶媒の微生物への毒性は、水/オクタノール分配係数である $\log P_{ow}$ 値に相関があることが知られている。この値が小さい（水に分配しやすい）有機溶媒ほど生物毒性が高いとされるが、得られた結果は、おおむねこの $\log P_{ow}$ 則に従ったものであった。*R. opacus* B4 は $\log P_{ow}$ が 4 を超えるような有機溶媒中において、少なくとも 5 日間の生存が可能であった（図 9）。また、各溶媒中において本菌中で発現した酵素が難水溶性物質の変換を触媒しうるかを調査した。発現用プラスミドベクターに *R. opacus* B4 自身が有するベンゼンジオキシゲナーゼ（BnzA）遺伝子を導入し、これを構成的に発現させた組換え株を作成した。変換反応は BnzA によって触媒されるインドールからのインジゴ生産をモデルに行った。結果は図 9 のとおりであり、各有機溶媒中での菌体の生存率と生産性に有意な相関は見られず、ビス(2-エチルヘキシル)フタル酸（BEHP）中にて良好な生産性が見られた（図 9）。

BnzA は補酵素として NADH を要求することから、持続的な反応のためには補酵素の再還元が必要である。NADH などの再還元は炭化水素の異化代謝を通じて行われることから脂溶性炭化水素としてオレイン酸を選択し、*R. opacus* B4 による非水条件下での代謝試験を行っ

た。この結果、水を含まないBEHP中においても *R. opacus* B4はオレイン酸の消費を示し、また、オレイン酸の添加によりインジゴ生産能の持続性が向上することが確認された (図 10)。

また、好熱性微生物由来の耐熱性酵素の多くが有機溶媒などの変性作用に対しても優れた耐性を示すことに着目し、好熱性細菌である *Thermus thermophilus* HB27由来のアルコー

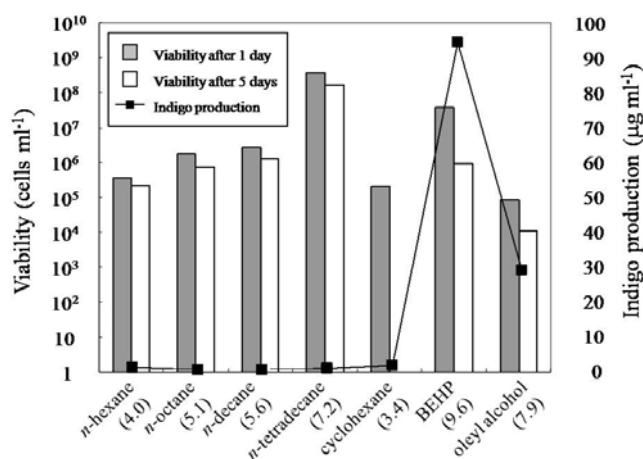


図 9. 有機溶媒中における *R. opacus* B4 の生残数およびインジゴ生産。初期菌体濃度は 2.4×10^9 cell/ml。括弧内の数字は各溶媒の $\log P_{ow}$ を示す。

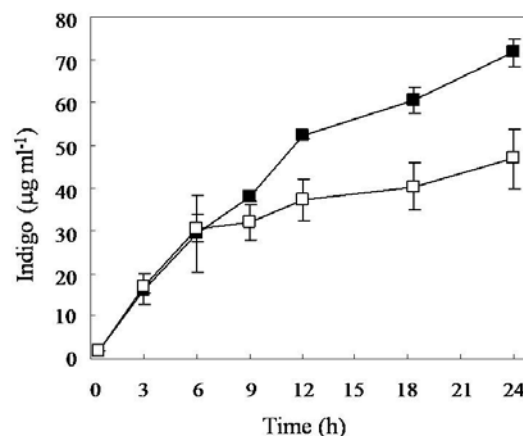


図 10. BEHP 中での *R. opacus* B4 によるインジゴ生産。反応液に 10 mg/ml のオレイン酸を含む場合 (■)、含まない場合 (□) で試験を行った。

ルデヒドロゲナーゼ (ADH) を発現させた *R. opacus* B4 による芳香族ケトンの還元反応を実施した。反応は目的酵素の最適温度である 70°C にて実施した。このため菌体は死滅しているが、その生死により有機溶媒中への分散性に顕著な違いは見られなかった。2,2,2-トリフルオロアセトフェノン (TFAP) から \cdot - (トリフルオロメチル) ベンジルアルコールへの還元反応をターゲットとし、補酵素再生反応として同じく *T. thermophilus* HB27 に由来する別の ADH によるシクロヘキサノールの NAD^+ 依存的酸化反応をカップリングさせた。2つの ADH を共発現させた *R. opacus* B4 を TFAP とシクロヘキサノールの等モル混合液中に直接分散させることにより溶媒成分を全く含まない反応液中での変換を試みた。この結果、12時間の反応でモル変換率約60%、最終生産物濃度 510 mg/mL という変換効率を示すことができた (図 11)。

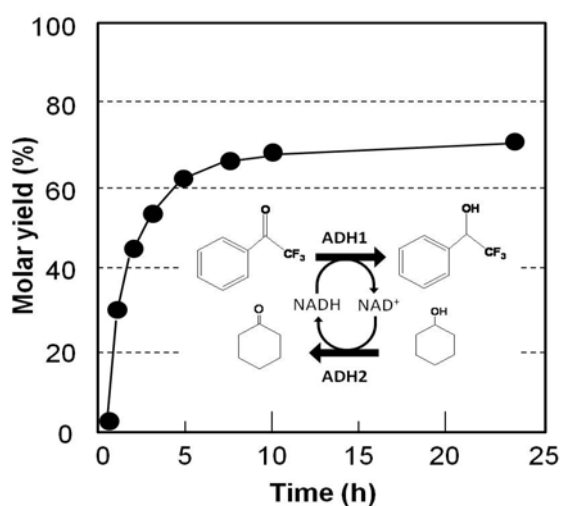


図 11. *T. thermophilus* HB27 由来 ADH を発現させた *R. opacus* B4 による TFAP 還元反応

一方、総体積の10%程度の少量の水を含む有機溶媒中において、*R. opacus* B4の菌体は

水/有機溶媒界面に偏在し、water-in-oil型の安定なエマルジョンを形成することを見出した。この状態で*R. opacus* B4は、水、有機溶媒のそれぞれに溶解した物質に対して高い接触効率を維持していると期待できる。上述のインジゴ生産の系で補酵素再生のための還元力供給源をオレイン酸から水溶性のグルコースに置き換えた結果、インジゴ濃度は217 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とオレイン酸を用いた場合の約3倍にまで向上した。

以上の成果より、親油性細菌である*R. opacus* B4を用いることによって、水を全く、あるいはほとんど含まない反応系においても微生物変換反応が実施可能であることが実証された。一方で、有機溶媒相に吸着する本菌の特性は、従来の水/有機溶媒二相反応系においても有機相中の難水溶性基質との接触効率を高く保つ上で有利に働くと期待される。そこで

Pseudomonas putida F1由来のトルエンジオキシゲナーゼを発現させた*R. opacus* B4および大腸菌のそれぞれを触媒とし、二相反応系中での変換効率について比較検討を実施した。この際、モデル反応を基本計画中のインドール酸化によるインジゴ生産からアルキル化ベンゼン水酸化反応へと切り替えた。これは、側鎖アルキル基の炭素鎖数を変化させることで基質の水溶度とこれらの変換能との相関を明確にするためである。有機相としてオレイルアルコールを採用し、水：オレイルアルコール比を変化させた二相反応液中にてトルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、およびブチルベンゼンの水酸化を実施した。大腸菌を触媒とした場合、基質の水溶度が低下するにつれて生産物量が低下していくのに対し、*R. opacus* B4使用時には目立った収率の低下は認められなかった(図12)。

親水性細菌である大腸菌は主として水相に分配された基質に対して作用するため、基質の水溶度に強く影響されるのに対し、*R. opacus* B4は有機相中の基質に対する高い接触効率を保持しているためだと推察できる。また、水：有機溶媒比が収率に及ぼす影響について見てみると、大腸菌では有機溶媒濃度が低いほど反応効率が高まるのに対し、*R. opacus* B4の場合、等量の水/有機溶媒混合液にて最大の変換効率を示した。二相反応系における難水溶性基質の水相への分配は両相間の基質濃度勾配がドライビングフォースとなる。従って、大腸菌の場合、有機相の割合が小さく基質濃度勾配が大きくなるほど基質が菌体に供給されやすくなるのに対し、*R. opacus* B4は、この影響を受けず水/有機溶媒間の比界面積

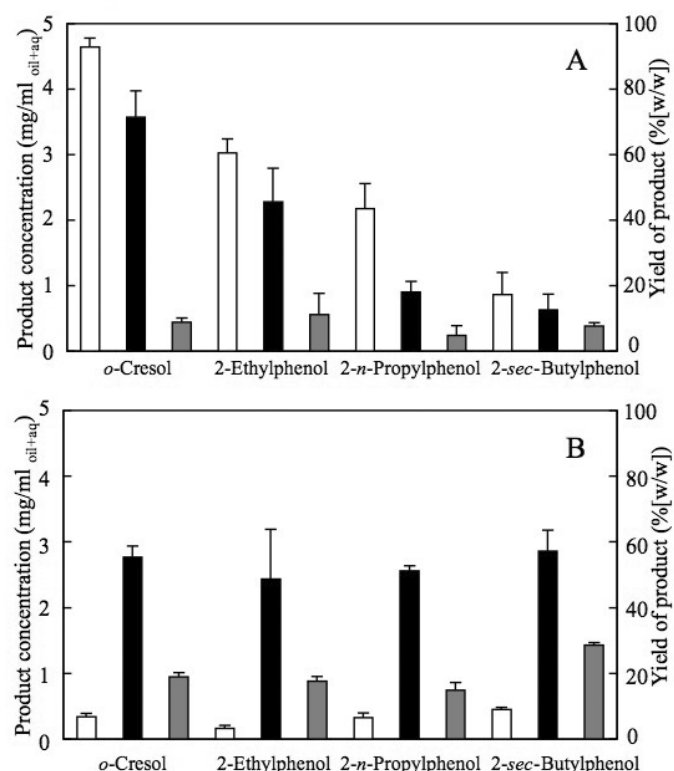


図12. 大腸菌(A)、*R. opacus* B4 (B)を用いた二相反応系におけるアルキルベンゼンの水酸化。それぞれ 10(白)、50(黒)、90%(灰色)容量のオレイルアルコールを有機相として含む反応液中にて変換反応を実施した。

が最大となる等量混合液中にて最大の変換効率を示したものと考えられる。

これらの知見に基づき、水/有機溶媒二相系でのブチルベンゼンの水酸化反応を5-L バイオリクタースケールで実施した。同反応は分子状酸素を基質とすることなどからも、生産効率を高めるには、通気攪拌速度の向上による酸素供給速度の向上が肝要であることは容易に推察される。しかし、有機溶媒存在下では攪拌による菌体への物理的ダメージが大きくなる上、通気速度の上昇は基質・生成物の揮発が著しくなる。そこで、多孔質型スパージャーを用いることで通気気泡の粒径を小さく保ち、気液比界面積の増大による酸素供給速度の向上を試みた。この結果、30時間の反応で有機相中に9.6 g/L (モル収率86%) の生産物を蓄積させることに成功した。

Rhodococcus opacus B4 の有機溶媒耐性・親油性機構の研究

R. opacus B4における有機溶媒耐性メカニズムの解明を目指し、本菌より有機溶媒感受性変異株の取得を試みた。変異導入には共同実施先である産総研・田村グループにより開発されたトランスポゾンベクターであるpTNR-0riTを用いた。トルエン蒸気供給下における生育能を指標としたスクリーニングの結果、生育が著しく低下した複数の変異株が取得された。プラスミドレスキューによる変異点同定を行ったところ、いずれの変異株でも*R. opacus* B4 の内在性環状プラスミド上へトランスポゾンが導入されており、本プラスミドが有機溶媒耐性に関与している可能性を強く示唆する結果が得られている。一方でスクリーニング期間を通じて野生型*R. opacus* B4のトルエン耐性が大きく低下するといった問題が見られた。産業分野への応用を念頭においた場合、表現型として著しく不安定な本菌の有機溶媒耐性を活用するという考えは現実的ではない。また物質生産を目的とした上述の研究において、本菌の親油性は菌体の生死に左右されないという結果が得られたことから大阪大学では平成22年度より有機溶媒耐性に関する研究を中断した。

一方、*R. opacus* B4の親油性機構を研究するにあたり、細菌の細胞表層疎水度を定量的に評価する手法の確立を目指した。既報に見られる細胞表層疎水度評価法のうち、bacterial adhesion to hydrocarbon (BATH)、contact angle measurement (CAM)、hydrophobic interaction chromatography (HIC)、glass adhesion test (GAT)の4とおりの方法を用いて、*R. opacus* B4、*R. erythropolis* PR4、*Pseudomonas putida* T57、ならびに大腸菌JM109の4つの細菌の疎水度測定を実施した(表3)。用いた測定法のうちBATH、HIC、GATは、それぞれ有機溶媒、アルキル化セファロース樹脂、シラン樹脂コートされたスライドガラスという疎水性担体への菌体の吸着性を指標とするものである。これらの方法を用いた場合、いずれも*R. opacus* B4のみが顕著に高い疎水性を示す結果が得られた。一方、CAMはメンブレンフィルター上に作成された細菌の層(ローン)が水滴をはじく力をローンと水滴の接触角により定量化するものであり、定義上の「疎水性」、すなわち水(極性溶媒)との親和性の低さを定量する上では最も適当な方法とされている。CAMによる疎水度測定では、*R. opacus* B4に加え*R. erythropolis* PR4が高い疎水度を示す結果が得られた。*R. erythropolis*

PR4におけるCAMとその他の方法により測定された疎水度の違いを説明するものとして、BATH、HIC、GATにおける各種担体への吸着度には菌体の表層疎水度のみでなくゼータ電位が大きく関わっていると考えられる。*R. opacus* B4と*R. erythropolis* PR4のpH 7におけるゼータ電位を測定したところ、前者はニュートラルな値を示したのに対し、後者は-18 mVという負の電荷を有することが明らかとなった。水中に分散した有機溶媒の油滴は負に帯電しているとの報告もあり、これらから有機溶媒への吸着度、すなわち親油性にはCAMによって測定される疎水性の他にゼータ電位が大きく関わることが示唆された。一方、*R. erythropolis* PR4は、二相反応液中における有機相への吸着度は低いものの、*R. opacus* B4と同様に湿潤状態で有機溶媒中に分散することができる。すなわち有機溶媒中での分散性には菌体のゼータ電位は寄与せず、疎水度のみが重要なファクターとなると考えられる。

表3. 各法により定量した細菌の細胞表層疎水度

	BATH (%) ^a	CAM (°)	HIC (%) ^b	GAT (%)	ζ potential (mV)
<i>R. opacus</i> B4	98	118	79	64	-1.7
<i>R. erythropolis</i> PR4	24	132	0	14	-18
<i>E. coli</i> JM109	13	21	18	6	-16
<i>P. putida</i> T57	1.1	ND ^c	17	6	0.2

^a n-ヘキサデカンへの吸着度

^b オクチルセファロースビーズへの吸着度

^c 水滴が細菌ローンに浸透してしまうため測定不能

2. 2. 2. 4 マルチコンポーネント酸化酵素系の反応場制御基盤技術の開発 (広島大学)

Rhodococcus opacus B4 株の有機溶媒耐性機構の解明

本研究では、有機溶媒耐性細菌 *R. opacus* B4 株の有機溶媒耐性機構の解明を行った。[シグマ因子 SigB の関与] 細菌の有機溶媒耐性機構の解析はほぼグラム陰性細菌でのみ行われ、*R. opacus* B4 株が含まれるグラム陽性細菌ではほとんど解析されていなかった。*Bacillus subtilis* のアルコール耐性の解析から、環境ストレス対応型のシグマ因子が有機溶媒耐性に関与しているのではないかと予想が立てられていたが、その実験的検証は行われていなかった。そこで、*R. opacus* B4 株を対象にその検証を行った。*R. opacus* B4 株のゲノム情報から、環境ストレス対応型のシグマ因子と予想される SigB を割り出した。そして本事業で開発したノンマーカークロニカル破壊法を用い、*R. opacus* B4 株の *sigB* 破壊株を作成した。*sigB* 破壊株は親株と比べ温度ストレスやエタノールストレスに感受性になっており、SigB が確かに環境ストレス対応型のシグマ因子であることが分かった。得られた *sigB* 破壊株は、デカン、テトラデカンやキシレンなどには親株と同等の耐性を示す一方、特定の有機溶媒（トルエン、ヘキサン、シクロヘキサン）に対して感受性になった。以上

のことから、SigBが *R. opacus* B4 株の有機溶媒耐性に関与していることが分かった。

[ミコール酸合成系の関与] SigBはシグマ因子であるので、SigBそのものが直接有機溶媒耐性に関与しているのではなく、SigB支配下の遺伝子産物が有機溶媒耐性に寄与していると考えられる。まず、有機溶媒と細胞の界面にあたる細胞表層の成分が有機溶媒耐性に重要であると考え、Actinobacterium 類特有の長鎖脂肪酸ミコール酸について検討を行った。*R. opacus* B4 株のゲノム情報から、ミコール酸合成系の候補遺伝子 *fabI* と *fabF1* を選抜した。このうち、*fabF1* の転写は *sigB* の破壊で減少することが分かった。有機溶媒耐性が低下した *sigB* 破壊株に *fabI* と *fabF1* を導入したところ、いずれの形質転換株も特にヘキサンへの耐性が復帰することが分かった(図13)。それぞれの株をヘキサンに曝露

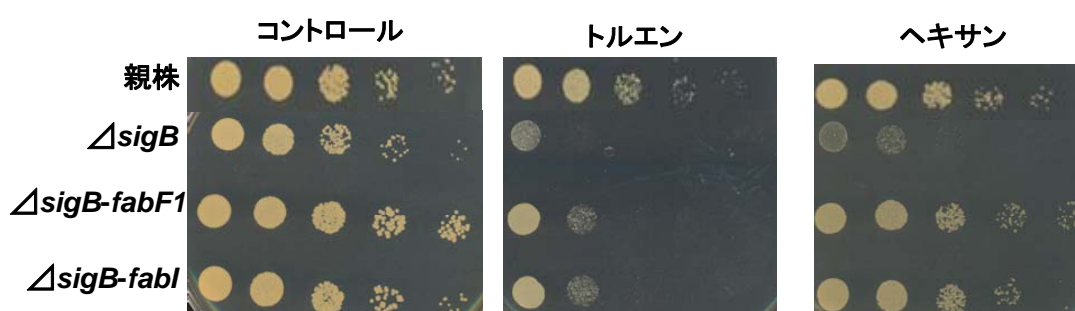


図 13. *R. opacus* B4 株、*sigB* 破壊株 ($\Delta sigB$) および *sigB* 破壊株に *fabF1* および *fabI* を導入した株 ($\Delta sigB-fabF1$ および $\Delta sigB-fabI$) のトルエン、ヘキサン耐性

TSB 培地で前培養した菌株を 1/10 ずつ段階的に希釈した後、TSB 寒天培地上にスポットした。その寒天培地を有機溶媒の蒸気に曝露して培養した。

した後、細胞内のヘキサン蓄積量を GC で定量したところ、*sigB* 破壊株で有意に蓄積量が増加していた。この蓄積は、*fabI* および *fabF1* 導入で親株程度に低下した。ミコール酸を抽出して TLC 分析したところミコール酸量自体は *sigB* 破壊で変化していないことから、*sigB* 破壊によりミコール酸組成が変化し、ヘキサンやトルエンが透過しやすくなったため、それら有機溶媒に対する耐性が低下したと考えられる。

[排出ポンプの関与] グラム陰性細菌での解析から、細胞膜に存在する排出ポンプが有機溶媒耐性で重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかし、グラム陽性菌ではまったく検討されていない。*R. opacus* B4 株のゲノム情報を調べると多剤耐性排出ポンプ遺伝子の候補が 32 見出された。定量的 RT-PCR により親株と *sigB* 破壊株での転写を調べたところ、*efp21*、*efp22*、*efp23* および *efp24* 遺伝子の転写が *sigB* の破壊により低下することが分かった。そこで、これら遺伝子を *sigB* 破壊株に導入してヘキサンおよびトルエンに対する耐性を調べたところ、*efp21* および *efp22* の導入でヘキサンおよびトルエン耐性が復帰することが分かった(図14)。一方、*efp23* と *efp24* を導入しても耐性

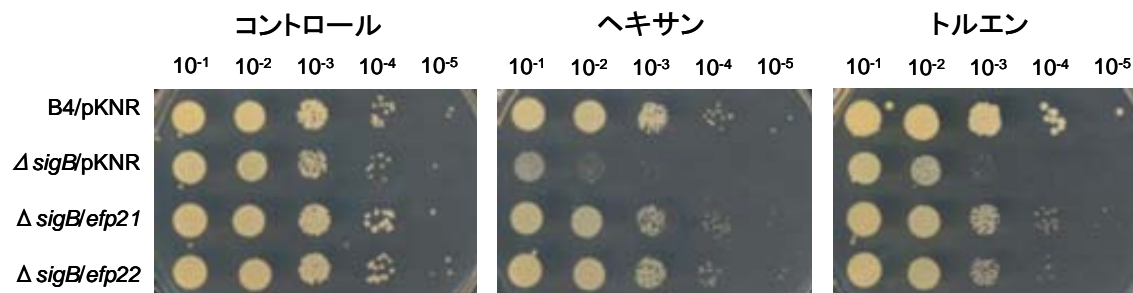


図 14. *R. opacus* B4 株 (B4/pKNR)、*sigB* 破壊株 ($\Delta sigB/pKNR$) およびその *efp21* および *efp22* 遺伝子導入株 ($\Delta sigB/efp21$, $\Delta sigB/efp22$) のヘキサン、トルエン耐性 pKNR は空ベクター。

の復帰は見られなかった。*efp21* および *efp22* は major facilitator superfamily タイプの排出ポンプをコードしている。これら遺伝子産物が本当に排出ポンプの機能を持つかを検討するために、親株 (B4/pKNR)、*sigB* 破壊株 ($\Delta sigB/pKNR$)、排出ポンプ遺伝子導入株 ($\Delta sigB/efp21$, 22) をヘキサンおよびトルエンに曝露した後、菌体内に蓄積したヘキサンおよびトルエンをクロロホルムで抽出し、GC で定量した (図 15)。その結果、*sigB* の破壊により、ヘキサンおよびトルエンの蓄積量は親株の 5~6 倍に増加することが分かった。また、*sigB* 破壊株に *efp21* および *efp22* の導入により、ヘキサンおよびトルエンの蓄積量は親株と同等か (*efp22*) それ以下 (*efp21*) になった。この結果から、Efp21 および Efp22 はヘキサンおよびトルエンの排出ポンプとして機能していることが強く示唆された。

以上、本研究を通じ、グラム陽性細菌の有機溶媒耐性においてミコール酸合成系および排出ポンプが関与していることを世界で初めて明らかにした。

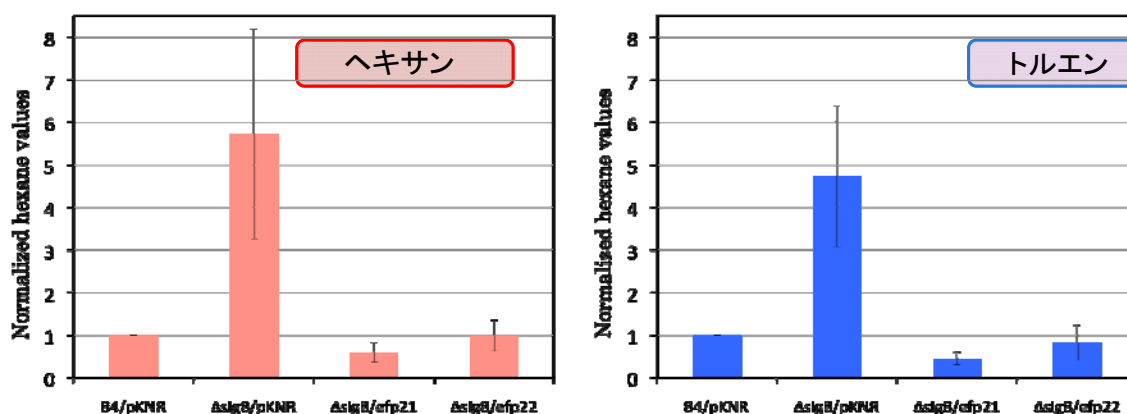


図 15. *R. opacus* B4 株およびその変異株におけるヘキサソおよびトルエンの細胞内蓄積量

各株をヘキサソおよびトルエンにお直接曝露した後、細胞内に蓄積するヘキサソ、トルエンをクロロフォルムで抽出し、GC で定量した。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	1件	1件	6件
H19FY	0件	0件	0件	3件	2件	15件
H20FY	1件	0件	0件	3件	1件	11件（プレス発表2件含む）
H21FY	1件	0件	0件	4件	2件	11件
H22FY	0件	0件	0件	5件	1件	7件

（※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約）

2. 2. 3 高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発

(日本電気株式会社)

従来からのランダム変異などによる酵素の高効率化手法と相補的に、そして大きく加速するために、分子シミュレーションによる分子設計手法の開発が重要である。そのために、新しい分子シミュレーション理論の構築により酵素反応機構を解明し、アミノ酸置換に伴う活性化自由エネルギーなど化学反応に関わる変化を定量的に予測することによって、部位特異的変異手法を用いて効率的酵素を実現する基盤技術を構築した。具体的なターゲットであるメルシャン社のP450に関しては、目標生成物の生産を効率化し、かつ副生成物を押さえるようにP450のアミノ酸配列を置換することが目的である。

この目的を達成するために、本研究では複数の異なる分子シミュレーション手法の開発を行った。まず、反応効率を決定するものは遷移状態であり、その電子状態を解明できる高度な分子軌道法であるCASSCF法やCASSCF-DFT法の基本的なモジュールの開発・整備を行って十分な高い性能が得られた。第二に、のぞましいアミノ酸配列を決めるには、目標生成物や副反応物とP450の複合体構造に基づいて、目標生成物のドッキングを邪魔することなく、副反応物のドッキングを邪魔するようなアミノ酸配列であり、そのために必要となる反応中間体に対する高性能の複合体モデリング技術やスコアリング技術の開発を行った。第三に、シミュレーション評価と有用性実証のためにラマン分光取得システムの開発を行った。

メルシャン社のP450に関しては、まず、酵素反応メカニズムの解析を行った。①基質結合過程、②水酸化反応、③反応生成物解離過程を含む酵素反応の一連の流れに対するシミュレーションを実施し、反応プロセス全体を視覚化することができた。特に、水酸化反応の解析において、P450の反応活性種と推測されているcompound Iに対して、2種類の構造:perferryl-oxo種とferryl-oxo種を考え、反応機構を詳細に検討した結果、P450の反応機構におけるいくつかの謎を解明する手掛かりを得たことは大きな成果である(詳細は、以下のチーム毎の成果を参照)。

変異体設計に関しては、第1段階では、これまでに構築した技術・メカニズム解析に基づいて、メルシャン社によるP450VDHに対する変異実験の結果を論理的に理解することを試みた。その結果、活性向上については、構造揺らぎを拡大させる変異、塩橋を形成する変異で効果が説明できた。副反応制御に関しては、立体障害を低減する変異で効果が定量的に説明できた。

次の段階では、P450VDHに対する計算で向上した予測技術と仮説に基づいて、メルシャン社が有するP450の新規基質に対する副反応制御を目的とする計算を行い、7個の変異位置候補を提案した。変異実験の結果、4個で副反応を抑制できることが分かり(約1/3に抑制)、成功率は57%であった。ランダム変異に比べて遥かに高く、有効性が実証できた。

2. 2. 3. 1 非経験的分子軌道法(CASSCF法)による酵素反応シミュレーション基本技術の開発 (日本電気(株))

CASSCF法の開発:収束性向上ならびにMM/PB法による部位特異性の解析に活用 CASSCF法にもとづいて、分子のエネルギーや勾配(原子に作用する力)を計算するコードを開発・整備を

行った。P450 の主要構成要素である鉄ポルフィンは計算難度の高い分子であるが、エネルギー計算の収束性を向上させた結果、計算できるようになった。計算で得られた鉄ポルフィンの電荷部分布を、我々の開発した MM/PB 法(溶媒効果を考慮したエネルギー計算法のひとつ)に活用したところ、P450camphor が樟脳類似分子(ノルカンフォー)を水酸化する反応に関しては、部位特異性の定性的説明が可能になったことが分かり、計算手法の有用性が実証された。メルシャン社の P450 に関しては、共同実施先の産総研で決定されたドッキングモードを出発点として、MM/PB 計算を行い複合体モデルの精密化を行ったが、反応制御の仕組みは P450camphor に比べて遥かに複雑である。QM/MM 法の方法論に関しては、大阪大学(蛋白研)中村教授と NEC とで共同出願されている特許がベースとなっているが、これを補う特許も新たに出願して強化を行った。

妥当な複合体構造の識別能に優れた BBCS 法(Bootstrap Based Consensus Scoring)を開発 精度の高い量子化学計算を行う上で、計算の出発点は蛋白質とリガンドの複合体構造であり、それが間違っていると妥当な計算結果は得られないので、これを精度よく決定することは非常に重要である。初期構造モデルは様々な計算手法を用いれば、多数の候補構造を作成できるが、その中で最も妥当なものを識別することが困難であった。そこで、我々は、情報科学の分野で発展した学習理論を応用したある種の多数決法である BBCS 法を開発した。代表的な蛋白質複合体 100 個に対するテスト計算を行ったところ、BBCS 法を用いれば、従来の多数決法にくらべて、より確実に Robust にドッキング構造として妥当な構造を判別できることが分かった。この成果は、J. Chem. Info. Model. 誌に発表し、また関連特許を出願した。

反応制御のための変異部位予測法の開発 基質と酵素の相互作用をエネルギー成分分割法によって解析する手法を独自に開発した。この手法により、基質のビタミン D3 とそれに接触する P450 のアミノ酸間の立体障害を解析した結果、主反応と副反応では相互作用の特徴が異なることを明らかにし、副反応抑制のための変異部位予測の設計指針を提案した。別種の P450SU-1 に適用したところ、活性向上変異の実験結果が本手法で説明可能なことが分かり、本手法は汎用性があることが示された。

遷移状態の結合配座の構築と副反応率の計算 酵素反応の遷移状態の構造は X 線結晶解析からは不明であるので、自由エネルギー計算および高度量子化学計算で得られたヘムと基質の結合角情報(大阪大学の項を参照)に基づいて、P450 酵素反応の遷移状態の結合配座モデルを構築した(図1)。この結合配座を用いて、計算機上でアミノ酸変異実験(熱力学積分法)を行い、副反応の割合を推算したところ、メルシャン社の実験結果と良好に一致し、シミュレーションの有効性が実証された。

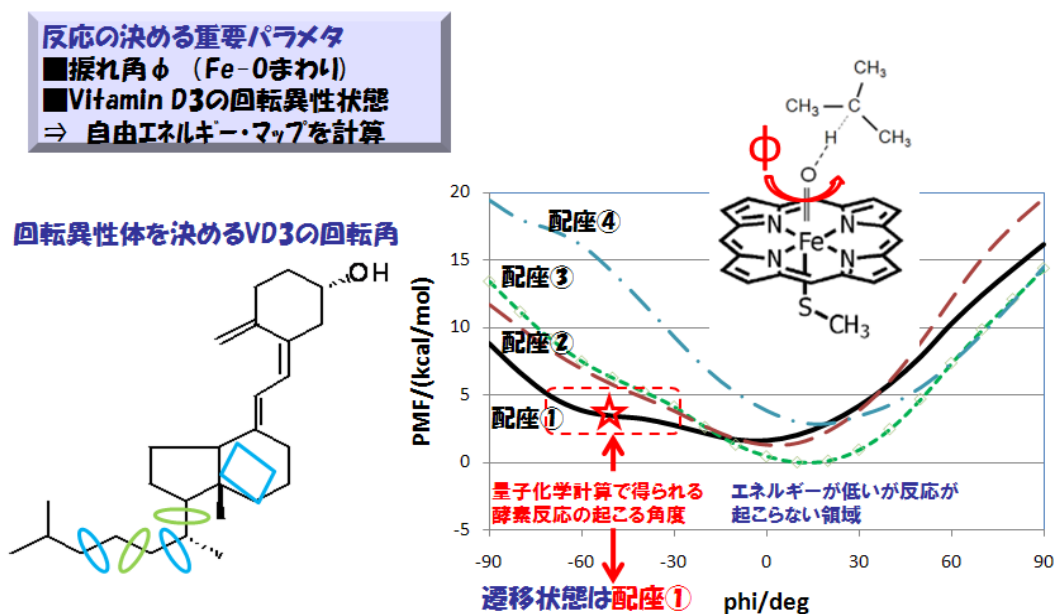


図1 高精度計算による結合モードの探索

結晶構造情報では不明であった進入経路上の変異のメカニズムを提案 ビタミン D3 の想定進入経路上の変異が塩橋形成により活性を向上させるメカニズムを提案した。野生型ではその部位に塩橋形成はありえず、また変異体の結晶構造でも塩橋の形成が見られないが、本研究で実施したダイナミクス計算によって塩橋が生成・消滅を繰り返していることを見出した。ビタミン D3 の放出経路を Steered MD 法(計算機上での仮想的な AFM 測定)を用いて定量的解析を行った。結合経路に沿った自由エネルギー変化を解析した結果、この変異が結合親和性の向上に寄与していることが分かった。

P450 の新規基質に対する変異予測の成功(副反応が従来の 1/3 の変異体の開発に貢献) これまで構築した技術により、メルシャン社保有の P450 の新規基質に対する副反応制御を目的とする計算を行い、7個の変異位置候補を提案した。変異実験の結果、4個で副反応を抑制できることが分かり(約 1/3 に抑制)、成功率は 57%であった。ランダム変異に比べて遥かに高く、構築したシミュレーション技術の有効性が実証できた。

2. 2. 3. 2 密度汎関数法(CASSCF-DFT 法)による酵素反応シミュレーション高信頼化技術の開発(共同実施先:大阪大学 奥村光隆教授)

世界でも最速のCAS-DFT積分コード開発 遷移金属酵素活性中心の電子状態は極めて複雑であり、エネルギー差の妥当な値を得るためには、多配置キャラクターによる取り扱いが必要不可欠になる。我々は、擬縮退電子系の静的相関にはCASSCF(あるいはCASCI)法を残りの動的電子相関部分には密度関数(DFT)法を用いるCAS-DFT法を開発した。さらに、DFT積分の高速化のた

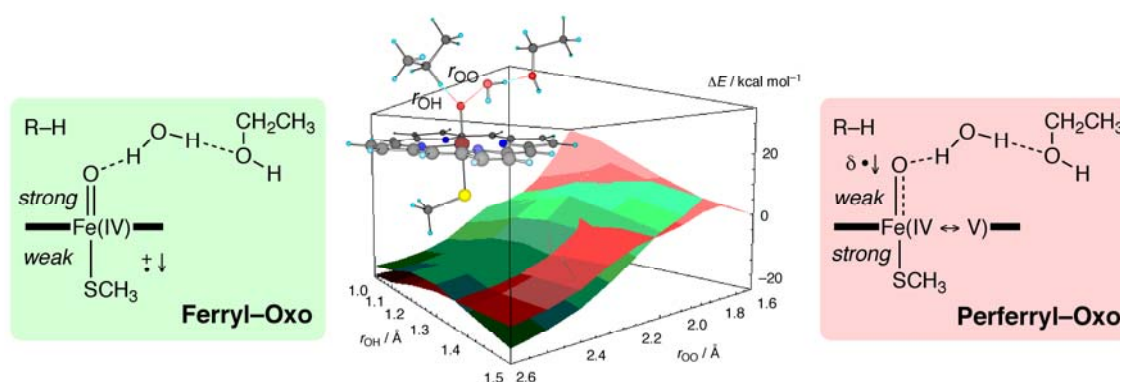


図2 グリッドサーチによる O-O および C-H 結合活性化過程に関するポテンシャル面

め、DFT数値積分の元となる積分公式から再検討し、既存の世界標準であるEuler-Maclaurin-Lebedev (EML)数値積分法と別に、GillとChenが巨大分子用の積分として考案した Gauss-Gill-Chen公式に基づくGauss-Gill-Chen-Lebedev数値積分法の積分コードを開発した。通常のKohn-Sham DFT用テスト版も開発し、GAMESSに組み込み直接DFT数値積分速度を比較し、同程度の精度で3倍近く高速となる事を確認した。実際、Q-Chem, Inc.の汎用プログラムQ-Chemの他に搭載しているプログラムは未だなく、これによりDFT数値積分コアコードの速度に関しては、本研究で使用するCAS-DFT用DFTコードは、世界でも最速のコードの一つになった。

P450触媒サイクルにおける反応中間体の電子・スピン状態の決定 P450の酸素分子活性化過程におけるすべての中間体の最安定電子・スピン構造、化学結合様式、エネルギーダイアグラムを Broken Symmetry (BS)法に基づいた非制限型hybrid DFT計算により検討した。この成果は、Int. J. Quant. Chem.誌 (Vol. 108, 631-650 (2008))にて発表した。

Compound I の電子・スピン状態の決定 P450 の酸化活性種である compound I の電子・スピン状態、化学結合様式、相対安定性を BS 法により検討した。Compound I では、鉄原子の酸化数が4価になった ferryl-oxo (Fe(IV)=O)コアとポルフィリンとシステインアニオンから構成される配位子部分にホールが存在する3スピン系が重要であると考えられている。基底状態では、Fe(IV)=O 3重項とリガンドスピンが弱く相互作用するため、ほぼ縮退した4および2重項状態になる。我々は、基底状態以外に Fe(IV)=O 励起1重項由来の複数の BS 解の電子状態解析も行い、BS 解に含まれるスピン混入を除去して波動関数の解の対称性を回復させる問題を考察した。さらに、ferryl-oxo コアが.....*励起した5スピン系の高スピン(6重項)および中間スピン(4重項)状態や鉄サイトの酸化数が5価になった低スピン(2重項)perferryl-oxo 状態の結合様式も明らかにした。Ferryl-oxo 種の電子状態に関する成果は、Int. J. Quant. Chem. 誌 (Vol. 108, 2991-3009 (2008))および Polyhedron 誌 (Vol. 28, 2044-2052 (2009))にて発表した。

律速段階の反応シミュレーション実施 上記酸化活性種による P450 の水酸化反応の中間体、遷移状態構造、活性化エネルギーを非制限型 hybrid DFT 法を用いて決定し、反応性解析を行った。基質として、メルシアン関連化合物であるビタミン D₃ の側鎖をモデル化したイソブタン・プロパンとリング A 部位のモデル分子を用いた。イソブタンからの水素引き抜き反応の活性化エネルギー

一は第1級より第3級の方が小さくなり、P450 変異体開発で大きな課題となっている酸素原子挿入部位に関する位置選択性を再現した。イソブタンの第1級水酸化反応に関する成果は、Int. J. Quant. Chem.誌 (Vol. 108, 2991-3009 (2008))にて発表した。

4状態モデルに基づいた水酸化反応機構の提案 従来の研究では、Fe(IV)=O3重項とリガンド2重項がスピン結合した4および2重項状態に着目した2状態モデルを中心に議論されていた。我々は、Fe(IV)=O1重項由来の複雑なスピン構造をもつ励起状態の反応性も詳細に調べ、反応の前後での電子状態相関ダイアグラムを明らかにすることで、すくなくとも4つの状態が P450 の反応メカニズムを理解する上で必要不可欠であることを示した。この成果は、Int. J. Quant. Chem. (Vol. 108, 2991-3009 (2008), Vol. 109, 3723-3744 (2009), Vol. 109, 3745-3766 (2009)) 誌にて発表した。

高スピンおよび中間スピン状態による水酸化反応機構 ビタミン D₃ の 1a 位の水酸化反応では、遷移状態付近で ferryl-oxo コアが $\delta \rightarrow \sigma^*$ 励起した5スピン系の高スピンまたは中間スピン状態が compound I の反応性に寄与する可能性があることが分かった。 σ^* 軌道のエネルギーレベルが低下するほど $\delta \rightarrow \sigma^*$ 励起エネルギーが小さくなるため、Fe-S 結合長が伸長することで高スピンまたは中間スピン状態の反応性が向上することが明らかになった。

高原子価状態による水酸化反応機構 Compound I の励起状態において、鉄イオンの価数が変動しやすいチオレートリガンドのコンフォメーションが存在し、水素引き抜き過程において ferryl-oxo 状態(Fe(IV)=O)から perferryl-oxo 状態(Fe(V)=O)に電荷再配置する可能性があることが分かった。Ferryl-oxo および perferryl-oxo 種の構造最適化と平衡分子構造での振動解析を行い、Fe-O および Fe-S 結合の平衡核間距離と伸縮振動数を比較した結果、電荷再配置することで、トランス効果により Fe-O と Fe-S の結合強度が逆転し、電子が異なる部分に局在することが明らかになった。Ferryl-oxo 種では Fe-O 結合が強く Fe-S 結合が弱いいため、不対電子がチオレートリガンドに局在化し、基質からの水素引き抜きに対する反応性は低くなることが分かった。一方、perferryl-oxo 種では Fe-S 結合が強く Fe-O 結合が弱いいため、不対電子がオキソリガンドに局在化し、水素引き抜きに対するラジカル反応性が極めて高くなることが分かった(図 2)。

新たな P450 による水酸化反応メカニズムの提案 O-O および C-H 結合活性化過程における ferryl-oxo 種と perferryl-oxo 種の振る舞いを調べるために、前駆体である compound 0 の O-O 結合が開裂して compound I を生成する過程および compound I が基質から水素原子を引き抜いてラジカル中間体を生成する過程に関する ferryl-oxo 状態と perferryl-oxo 状態のポテンシャル面を計算した(図 2)。その結果、O-O および C-H 結合開裂過程においてそれぞれ1回ずつポテンシャル面が交差することが分かった。この結果から、反応メカニズムとして、プロトン化した compound 0 の O-O 結合がヘテロリティック開裂して perferryl-oxo 種を生成する協奏的な機構や compound 0 の O-O 結合がホモリティック開裂して ferryl-oxo 種を生成する段階的な機構などいくつかの可能性が考えられる。前者は酸素分子と還元系を用いた P450 の触媒サイクルでは compound I は観測されないという実験事実と矛盾しない。一方、後者は酸素分子と還元系の代わりにメタクロロ過安息香酸のような過酸化物を用いると compound I が観測されるという実験事実と矛盾しない。

水分子の役割の解明 周辺の水分子(水素結合網)が活性化エネルギーに大きな影響を及ぼすことを計算で実証した。

密度汎関数法による遷移金属オキシ化合物の分光学的帰属 compound I および compound II の基底および低い励起状態の最適化分子構造を密度汎関数法による full geometry optimization により決定した。さらに、平衡構造での振動解析を行い、赤外およびラマンスペクトルの帰属を行った。さらに、メスバウアー分光法によるアイソマーシフトや四極子分極定数などを計算し、Fe サイトの酸化数を推定した。これらの結果を総合的に比較検討し、構造と電子状態の相関を明らかにした。この成果は、Int. J. Quant. Chem. 誌 (Vol. 108, 2950-2965 (2008)) にて発表した。

2. 2. 3. 3 酵素反応シミュレーションのための自由エネルギー計算手法の開発(共同実施先:産業技術総合研究所 福西快文主任研究員)

反応中間体を扱える新規機能をMDソフトに実現 分子シミュレーションは古典力場を基礎とするため、原子間相互作用に関数系を割り当てる。しかし、基質ドッキングによる構造モデリング、モデルを精密化するMDシミュレーション、いずれにおいても世界にみても既存欧米ソフトウェアなどでは、安定分子のモデリングはできても、反応中間体を扱える機能を実現しているものは存在しない。我々は、AMBER力場を改良し、中間体が扱えるソフトウェアを産総研で開発中のmyPresto®システムを用いて作成した。このソフトによって、実証研究の対象であるP450のヘム鉄に酸素が配位した中間体のモデリングを行い、以下に述べる解析を行った。

従来よりも遥かに高精度でドッキングできる MVO 法を開発 標的蛋白質への化合物のドッキングシミュレーションは、化合物が標的に結合するならば、どのような形で結合しうるかを提示するものであって、化合物が結合するか、しないかを判別できる精度はもっていない。しかし、X線による構造決定は極めて時間を要するため、しかも X 線では普通は反応中間体を捕らえることができないため、酵素とリガンドの複合体をドッキングソフトで高精度に予測できる技術の確立は非常に重要である。しかし、実際に行うドッキング計算は、複合体構造未知の新しいリガンドと標的との複合体の予測であって、この場合予測精度は著しく低いのが普通であり、たとえば SievGene/myPresto® の場合、27%程度にとどまるのが課題であった。我々は、既知の蛋白質-リガンド複合体の3D座標をもとに、未知のリガンドの蛋白質-リガンド複合体の3D構造を高精度で予測する手法として、Maximum volume overlap (MVO)法を新規に開発した。開発は産総研の SievGene/myPresto を用いて行った。ドッキングソフトは、多数の複合体構造の候補を算出するが、スコア上位 100 候補をとれば、その構造の中には正しい構造が含まれるケースがほとんどであるが(90%の割合)、どの構造が正しい構造であるかは不明である。我々の MVO 法では、ドッキングの結果の多数の構造のうち、既知の蛋白質-リガンド複合体構造のリガンド座標と重なり大きい構造を選ぶことによって精度を 70%にまで飛躍的に向上させることに成功した。この MVO 法に関しては、J Mol Graph Model 誌に発表した。

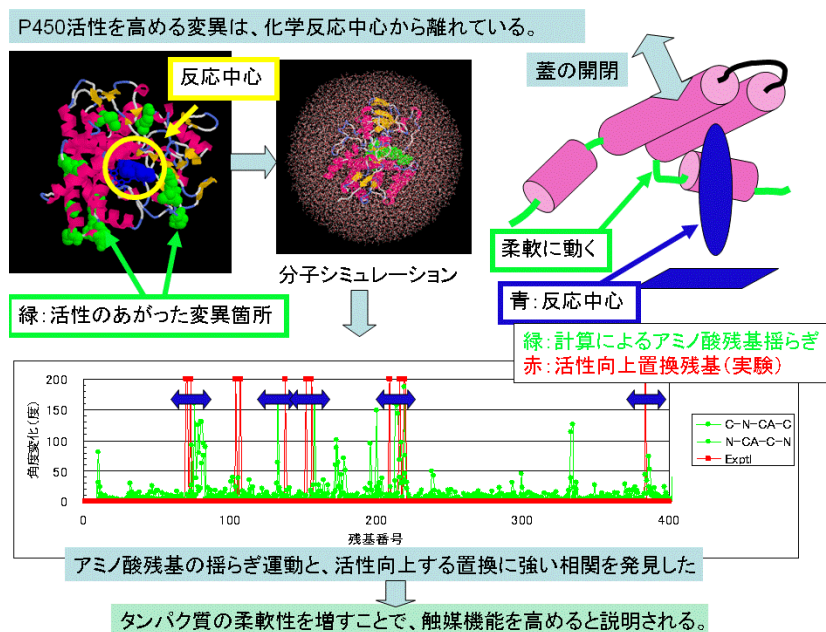


図3 活性向上と構造揺らぎの関係

メルシャン社のP450-VD3およびP450-VD2の反応中間体複合体モデルの構築 このMVO法を用いて、P450 に対しビタミン D3(VD3)および D2(VD2)をドッキングし、P450-VD3 およびP450-VD2 複合体モデルを作成した。この構造に対し、反応中間体を保持するMDシミュレーションを実施して、反応中間体モデルを作成した。MVO 法を適用した結果、いくつかの実験を説明できる構造が得られたので、上記の中間体の扱える新規開発のMDソフトを用い水中でのMD計算を行い、構造の精密化を行った。

メルシャン社の P450-VDh の反応機構の解明 上記のように新規開発した手法を用い、P450-VDh のアミノ酸変異と活性の関係を調べた。(1)活性を向上させるアミノ酸変異は、リガンド結合ポケット、反応中心にはなく、タンパク質の外周部分に分布していた。タンパク質の分子シミュレーションは、タンパク質は堅いヘリックスと柔らかいループでできているが、リガンド結合・解離において良く動くループ(特にヘリックスとヘリックスをつなぐ短いループ)に変異が入ると活性が向上することを示した。このことから、アミノ酸変異によるタンパク質の柔軟性の増大が活性の向上につながると期待された。(2)タンパク質とアミノ酸の結合のしやすさを統計的に調べた。その結果、ポケット入口付近のアミノ酸を、低分子を結合しやすい残基に置換した場合に、活性が向上していると解釈できた。ポケットのリガンド結合性を増すだけでなく、水中を漂うリガンドをかき集める「手」のような働きをするアミノ酸があり、そのアミノ酸を望みのリガンドに合わせて変異させると、望みの活性を上げることができると期待される。(3)アミノ酸とアミノ酸の結合のしやすさも統計的に調べた結果、特定のアミノ酸同士の結合が強いことが分かった。この結果をP450に適用した結果、タンパク質複合体形成による活性の向上といった機構は、あまり働いていないと解釈された。(4)アミノ酸変異が、P450 をリガンド非結合型からリガンド結合型構造にシフトさせることで、活性

を向上させる機構も考えられるが、我々の実現可能な計算機時間の範囲では、このアイデアは検証することはできなかった。

2. 2. 3. 4 ラマン分光法による酵素反応シミュレーション評価技術の開発(共同実施先: 茨城大学 高妻孝光教授)

シトクロームP450のように、機能を発現するために金属イオンを要求する金属タンパク質では、金属イオンの部分と基質の認識などに重要なタンパク質骨格部分との構造相関を系統的に調べる事が重要である。また、高度な理論計算によって、酵素機能の本質を検討するためには、超高分解能のX線結晶構造と精密な分光学的情報を必要とする。特に、精密な生体分子触媒設計における微細な構造変化を実験的に検出することが、計算機から得られる理論的結果の活用において重要であり、酵素反応の本質を担う微細構造変化を調べる上で、ラマンスペクトルは、きわめて有効な方法である。変異体で生じるヘム近傍の構造転移の測定・解析を行った。

これまでに、P450と同様のヘム蛋白であるシトクロームc' (Cyt c') に対して、pH変化がアルカリに変化するに伴って起こる構造転移を詳細に測定した。可視光励起の共鳴ラマン(514.5nm励起)でポルフィリン環のコアサイズをモニターし、紫外共鳴ラマン(244nm励起)でトリプトファン残基の親水性環境度をモニターする測定を行った。その結果、アルカリ条件下におけるタンパク質のわずかな構造変化が、中心部のポルフィリン環のコアサイズを変化させていることを見事に解明することができた。これは、P450に関していえば、周辺部位で起こった変異が中心部のポルフィリン近傍の反応場に及ぼす影響をラマン分光で検出できる可能性を示唆する重要な結果であると考えている。

P450と同様のヘムタンパク質であるシトクロームc' (Cyt c') に対して、pH変化がアルカリに変化するに伴って起こる構造転移を、共鳴ラマンスペクトルによって、局所構造の精密分子構造解析を行ってきたが、最近、0.92 Å分解能でのX線結晶構造を得る事にも成功し、ラマンスペクトルから得られる精緻な分子構造情報の解析と反応性との相関について新たな知見を得た。さらに、金属イオンの特色の現れやすい銅タンパク質シュウドアズリンを用いる事によって、活性中心の電子状態をタンパク質部分の変異で制御できる事を、共鳴ラマンスペクトルをはじめとする各種分光方法と結晶学的方法によって明らかとした(図4)。これらのことは、P450の周辺部位で起こった構造変化が中心部のポルフィリン近傍の反応場に及ぼす影響をラマン分光で検出できる可能性を強く示唆する重要な結果である。またほかにも、関連酵素であるH-PGDS (Human Hematopoietic Prostaglandin D2 Synthase)の精密なスペクトルを得て、理論計算を行い、理論計算のアプローチの有効性についての検証を行なうことに成功している。これらの成果は、国際学会での招待講演、および Theor. Chem. Acc. 誌において発表した。

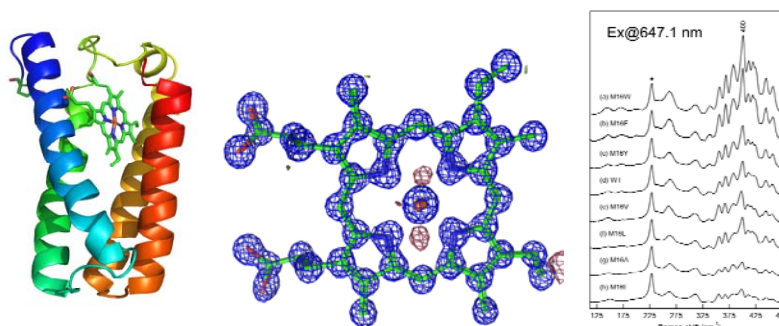


図4 理論計算を確立するために有効なシトクローム *c*'の原子レベル(0.92 Å分解能)での超高分解能X線結晶構造。全体構造(左)とヘム部分の構造(中央)。タンパク質デザインに有効となるタンパク質の微細構造変化が電子状態に与える影響を系統的に検証した銅タンパク質シュウドアズリンとその変異体の共鳴ラマンスペクトル(右)。シュウドアズリンの共鳴ラマンスペクトルは、活性中と相互作用をするアミノ酸残基の効果について系統的情報を与えており、シトクローム P450 における理論的タンパク質デザインの指針としても有効なデータである。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分	特許出願			論文		その他外部発表(プレス発表等)
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	0件	1件
H19FY	1件	0件	0件	5件	0件	4件
H20FY	2件	0件	0件	4件	0件	7件
H21FY	1件	0件	2件	5件	0件	20件
H22FY	1件	0件	0件	3件	0件	20件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 2. 4 微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)

複合要素を統合化した物質生産プロセス(Integrated bio factory-IBF)の基盤技術を確立すべく、光学活性アミノ酸、光学活性アルコール、光学活性アミンをターゲットとした生産プロセスの開発、及び、還元酵素、脱水素酵素、酸化酵素、P450、peroxidase、laccase などの酸化還元酵素、ならびに産業化が期待される付加、脱離、転移、異性化酵素などを対象とした探索・機能解析を行った。具体的成果は以下のとおりである。

2. 2. 4. 1 高機能性 Multi-component 酵素系による光学活性アミノ酸生産プロセスの開発(株式会社カネカ)

複合酵素系を利用した非天然 L 体アミノ酸の酵素合成法について検討した。D 体選択的なアミノ酸オキシダーゼ、L 体選択的なアミノ酸脱水素酵素、NADH 再生用のギ酸脱水素酵素によって D 体アミノ酸は α -ケト酸を介して L 体アミノ酸に変換される(図 1)。

これを構成する酵素のうち、高活性、低基質特異性が要求される D-アミノ酸オキシダーゼ(DAAO)の生産菌として、*Candida intermedia* IFO0761 株を発見した。本菌は2種類の DAAO を生産し、DAAO1 は脂肪族アミノ酸に対して高活性であり、芳香族アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸に対して活性を示さなかった。DAAO2 は、芳香族アミノ酸に対して高活性であり、幅広い基質特異性を有していた。組換えDAAO1とロイシン脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、カタラーゼを用いて、ラセミ体の 2-アミノ酪酸から 100%e.e.の L 体 2-アミノ酪酸が収率 95%で、また組換えDAAO2 とフェニルアラニン脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、市販カタラーゼを用いて、ラセミ体の *p*-フルオロフェニルアラニンから 100%e.e.の L 体 *p*-フルオロフェニルアラニンが収率 92%で生成した。

ケト酸を還元的にアミノ化して L 体アミノ酸を生成するアミノ酸脱水素酵素の生産菌として土壌分離菌 *Rhodococcus qingshengii* KNK2-10-8 株を発見した。本菌のアミノ酸脱水素酵素は NADH 依存性で約 46kDa のサブユニットからなるホモ二量体と推定され、ナフチルピルビン酸、インドールピルビン酸、ホモフェニルピルビン酸などの側鎖の大きなケト酸に対して既知酵素に比べて特異性が高い傾向にあり、大きな側鎖を有する L-アミノ酸合成への利用が期待できる。本酵素遺伝子の*E. coli*での発現実験では、組換え酵素の大部分が不溶化し低活性となった。そこで、本酵素遺伝子と *groEL*、*groES* のシャペロン蛋白遺伝子を同時発現させることによって、可溶化に成功し当初の約 30 倍の酵素活性が得られた。

L-アミノ酸脱水素酵素、D-アミノ酸オキシダーゼ、ギ酸脱水素酵素、市販カタラーゼの混合液によって、ラセミ体を原料に、光学的に純粋な L 体のナフチルアラニン及びホモフェニルアラニンが 97%以上のモル収率で合成できた。次に、L-アミノ酸脱水素酵素、D-アミノ酸オキシダーゼ、ギ酸脱水素酵素の 3 酵素を同時に高生産する組換え大腸菌を育種した。本菌の培養液と市販カタラーゼの混合液を用いて、ラセミ体のフェニルアラニン誘導體から L 体のそれが 90%収率で得られた。これら 4 酵素を混合した場合よりも収率は向上し、副生物である中間体 α -ケト酸の分解物も低減できた。次に、熱安定性が高く、低 K_m 値をもつ大腸菌のカタラーゼ遺伝子をクローニングし、先の 3 酵素とカタラーゼの計 4 酵素を同時に高生産する組換え大腸菌を育種した。本菌の

培養液を用いて同様に L 体のフェニルアラニン誘導体を合成したところ、3 酵素菌利用時よりもさらに高濃度の蓄積が可能であった。

この 4 酵素生産菌内の組換えプラスミド上のフェニルアラニン脱水素酵素遺伝子をロイシン脱水素酵素遺伝子に置き換えたプラスミドを構築し、4 酵素生産菌と同様に組換え大腸菌を育種した。本菌を用いてラセミ体のノルバリンを原料に L-ノルバリンを合成したところ、ほぼ光学的に純粋な 50g/L の L-ノルバリンが蓄積し、基質に応じてアミノ酸脱水素酵素遺伝子を替えることで、さまざまなアミノ酸合成に対応できることを示した。さらに、4 酵素生産大腸菌を合成高分子化合物によって包括固定化することにより、バッチ式で繰り返し使用可能な固定化微生物触媒を容易に調製できた。

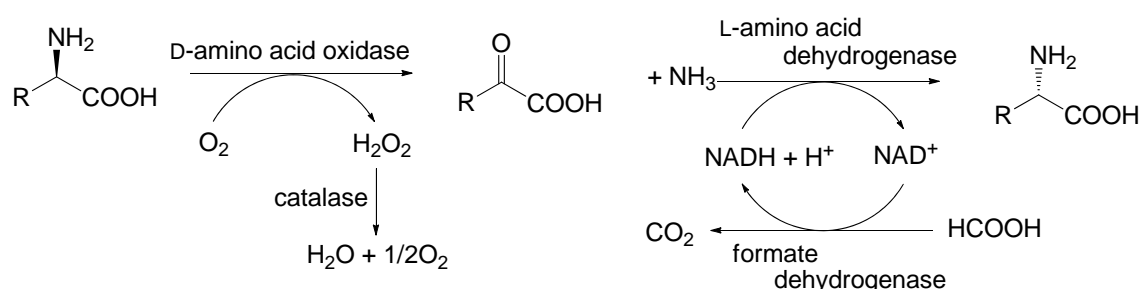


図 1. 立体反転反応による光学活性アミノ酸の生産プロセス

2. 2. 4. 2 高機能性 Multi-component 酵素系による光学活性アルコール生産プロセスの開発 (株式会社カネカ)

(1) 複合酵素系を利用した光学活性なアルコール類の生産プロセス開発

立体選択的酸化酵素と NADH オキシダーゼからなるアルコールの酸化反応と、還元酵素および補酵素再生用酵素からなる中間体ケトンの還元反応のワンポット複合反応によって、ラセミ体の全量を一方の立体配置をもつアルコール体に変換する(図 2)。

これを構成する 4 酵素のうち、*Streptococcus mutans* 由来の水生成型 NADH オキシダーゼ (NOX) は、安定性に乏しく工業的利用には制限を受ける。そこで、理論的分子設計によるアミノ酸変異設計、およびランダム変異実験による安定性向上変異酵素の取得検討を行なった。理論的分子設計の方針としては、NOX 酵素の熱安定性を向上させる変異、および反応中心のシステイン残基の過剰酸化を防ぐことにより化学的安定性を向上させる変異を選択した。次いで、設計した二十数種類の NOX 変異体が大腸菌にて発現させ、その性質を評価した。その結果、化学的安定性向上を図ったアミノ酸変異によって、NOX 酵素の耐久性を向上させる効果が見られた。

本複合酵素系による(S)-3-クロロ 1,2-プロパンジオール(CPD)を(R)体に立体反転する反応を解析した結果、酸化反応には NADH オキシダーゼの添加が効果的なこと、及び酸化反応に NAD⁺依存性の酵素系を用いる場合、還元反応には NADPH 依存性の酵素系が必要なことが確

認できた。したがって、バイオ還元反応時の還元型補酵素の再生用に繁用されている *Bacillus* 属細菌由来のグルコース脱水素酵素(GDH)は、NADH と NADPH の両者に作用するため適切ではない。そこで、*Bacillus* の GDH の部位特異的アミノ酸変異設計による NADPH 単独依存性付与について検討し、設計した十数種類の GDH 変異体遺伝子を大腸菌で発現させ、GDH 変異体を取得した。一残基変異および二残基変異を与えた GDH 変異体のうち、NADP 依存性が 2~3 倍に向上し、酵素活性も野生型 GDH と同等である変異体を数種得た。また、乳酸菌数株から新たに 8 種類のグルコース脱水素酵素を得た。これらはいずれも NADP⁺ に高い選択性を有し、うち 3 酵素は NADP⁺/NAD⁺ が 10,000 以上であった。反応至適 pH は 6.5-7.5 であり、*Cryptococcus* 酵素の 7.0-8.0、*Bacillus* 酵素の 8.0 と比べて酸性側に偏っていた。さらに、スクリーニング実験によって得られた *Cellulomonas* sp. KNK0102 株由来のグリセリン脱水素酵素、上述した変異型 NADH オキシダーゼ、*Candida magonoliae* AKU4643 由来のカルボニル還元酵素 S1、上述の乳酸菌由来の NADPH 依存性グルコース脱水素酵素の 4 酵素を同時に生産する組換え大腸菌を育種し、本菌を用いてグルコースの存在下、ラセミ体 CPD を本菌に作用させたところ、反応約 50 時間で 96.7%e.e. の (*S*)-CPD がほぼ定量的に蓄積した。

次に、(*R*)-CPD を (*S*) 体に立体反転する反応に必要な (*R*)-CPD 酸化酵素を土壌分離菌 *Orchrobactrum* sp. KNKc71-3 中に発見した。本酵素は NADH 依存性のアルコール脱水素酵素であり、その基質特異性から 2,3-ブタンジオール脱水素酵素の 1 種と考えられた。本酵素は CDP 以外にも様々な 2 級の (*S*) 体の脂肪族アルコールに作用した。本酵素、変異型 NADH オキシダーゼ、*Rhodotorula glutinis* var. *dairenensis* IFO415 由来のカルボニル還元酵素、乳酸菌由来の NADP 依存性グルコース脱水素酵素の 4 酵素を同時に生産する組換え大腸菌を育種し、本菌を用いてラセミ体 CPD を原料に (*R*)-CPD を合成したところ、反応約 40 時間で 100%e.e. の (*R*)-CPD が 100g/L 蓄積した。また、同様にラセミ体 1,2-ペンタンジオールを立体反転させたところ、反応約 24 時間で 99.9%e.e. の (*S*)-1,2-ペンタンジオールが 100g/L 蓄積した。いずれもモル収率はほぼ 100%であった。

酸化還元複合酵素系によるアルコール類の立体反転反応においては、上述したように酸化反応と還元反応における補酵素種の厳密な管理が必要である。天然に存在するアルコール脱水素酵素においては、補酵素依存性と所望する化合物への反応性には制限があるため、補酵素依存性を改変できる技術は重要となる。そこで、計算化学的手法によるアルコール脱水素酵素の補酵素改変変異体の取得を試みた。NADH 依存性の *Candida* 属酵母由来のアルコール脱水素酵素を題材に、既存の類似酵素を参考にコンピューターモデリングを行ない、補酵素認識部位を中心に変異を導入したモデルを設計し、さらに酵素活性の維持を目標に計算を行なった。得られた変異候補部位を部位特異的変異によって当該酵素に導入し、変異酵素を調製してその触媒能力等を評価した。14 個の変異酵素のうちの一つにおいて、活性比 (NADPH/NADH) が 44 に達し、酵素活性が約 1/5 になった三重変異酵素が得られた。なお野生型酵素では NADH/NADPH が 357 であった。

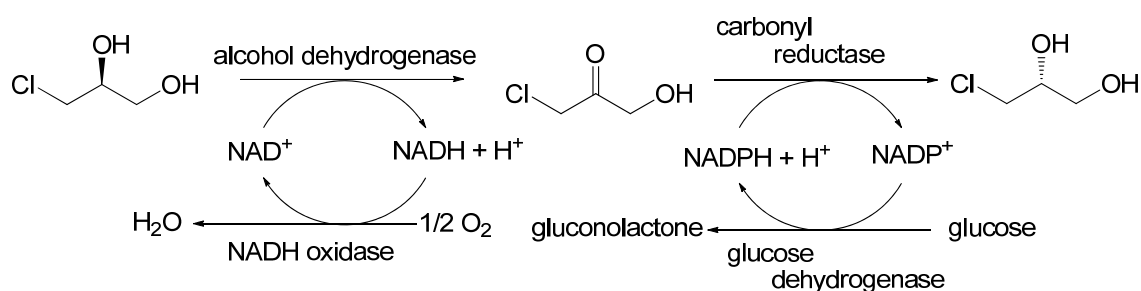


図 2. 立体反転反応による光学活性アルコールの生産プロセス

(2) 複合酵素系を利用した光学活性なアミン類の生産プロセス開発

光学活性アミンは医薬品等の原料として、光学活性アミノ酸や光学活性アルコールと同様に重要な化合物群である。安価なカルボニル化合物からの従来の合成法においては、高温高压反応を必要とし、多段階の反応が必要である。カルボニル化合物に直接立体選択的にアミノ基が導入するアミノ基転移反応は経済面でも環境配慮面でも魅力的な反応である。まずアミン化合物を単一窒素源とする集積培養法によって、カルボニル化合物とアミン化合物とのあいだでアミノ基を立体選択的に転移する活性を有する *Pseudomonas* 属細菌を単離した。本菌から当該酵素活性を電気泳動的に単一にまで精製した。本酵素 TFP は分子量 53,000 のホモダイマーで反応にはピリドキサルリン酸を必要とし、(S)-1-フェネチルアミンとピルビン酸によく作用するが、(R)-1-フェネチルアミンや D-アラニンには作用しなかった。また、β-アラニンや 4-アミノ酪酸には作用せず、ω-アミノ酸トランスアミナーゼとは異なる酵素と考えられた。本酵素をコードする遺伝子のクローニング及び大腸菌での高発現にも成功し、本菌によって、(S)-1-フェネチルアミンの存在下、7-メトキシ-2-テトラロンを 97%e.e. の 7-メトキシ-2-アミノテトラリンに変換することができた。しかし、収率は 80%と低く、その原因としてアミノ化反応の反応平衡が考えられた。そこで、アミノ基供与体を L-アラニンとし、乳酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素、触媒量の NAD⁺、グルコースを反応液に添加したところ、L-アラニンのみの添加ではほぼ反応が進行しなかったにもかかわらず、ほぼ定量的に 7-メトキシ-2-アミノテトラリンが生成した。これは、アラニンのアミノ基転移後生成物であるピルビン酸が乳酸脱水素酵素によって乳酸に変換されるため、アミノ化反応の平衡が解除された結果である。グルコース脱水素酵素はピルビン酸還元時に必要な還元型補酵素を強力に再生するのに有効であった。

本アミン生成反応をさらに容易に実施できる触媒を調製した。トランスアミナーゼ TFP、*Pediococcus acidilactici* 由来の乳酸脱水素酵素、*Bacillus megaterium* 由来のグルコース脱水素酵素の 3 酵素を同時に生産する組換え大腸菌を育種した。本菌を用いた場合、7-メトキシ-2-アミノテトラリンのほかに、高光学純度の 3-アミノピロリジン誘導体、3-アミノピペリジン誘導体などの有用な光学活性アミン類を、対応するカルボニル化合物からワンポットでかつ高収率で合成することができた。

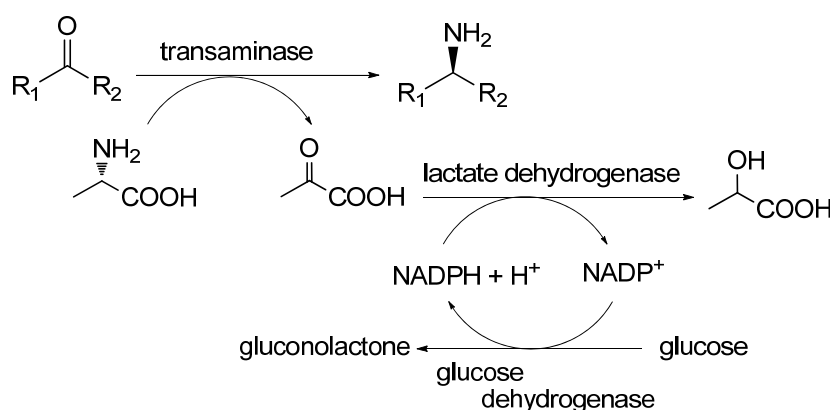


図 3. 複合酵素系による光学活性アミンの生産プロセス

2. 2. 4. 3 高機能性 Multi-component 酵素系の探索・機能解析(京都大学農学研究科)

還元酵素、脱水素酵素、酸化酵素、P450、peroxidase、laccase などの酸化還元酵素、ならびに産業化が期待される付加、脱離、転移、異性化酵素などを対象とした探索・機能解析を行った。具体的成果は以下のとおりである。

(1) 光学活性 β -アミノ酸の立体反転反応による生産に有用な新規トランスアミナーゼ、オキシダーゼを取得した。このうち新規酵素 β -フェニルアラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素の精製を行い諸性質を解明した。本酵素は、 β -フェニルアラニンに立体選択的に作用するアミノ基転移酵素としては初めての報告であり、立体反転反応による光学活性 β -アミノ酸生産における第一段階、すなわち、立体選択的のケト酸生成反応に有用であることが判明した。

(2) 酵母解糖系を用いるリン酸化基質供給とカップリング可能なアルドラーゼ活性菌を取得した。特に、基質となるアセトアルデヒドに対して耐性をしめすデオキシリボアルドラーゼを *Klebsiella* 属細菌に見いだした。また、アルドラーゼ-トランスアミナーゼカップリング反応による 4-ヒドロキシイソロイシン生産に有用なアルドラーゼ類の探索を行い、*Arthrobacter* 属細菌に新規なアルドラーゼ (asHPAL) を見みいだした。さらに、asHPAL の遺伝子情報を活用して、様々な微生物ゲノム中にホモログを見いだすとともに、これら大腸菌にて発現し、様々な 4-ヒドロキシアミノ酸誘導体の合成に有用な酵素群(4 種類)を見いだした。

(3) 高度不飽和脂肪酸に関する不飽和化酵素活性菌を *Mortierella* 属、*Trichoderma* 属、*Delacroixia* 属糸状菌に見いだした。また、高度不飽和脂肪酸分子内の二重結合を異性化、飽和化する菌株を、*Lactobacillus* 属乳酸菌(C18の脂肪酸に特異的)、ならびに、*Clostridium* 属の嫌気性細菌(C20の脂肪酸にも作用する)に見いだした。さらに、脂肪酸の二重結合水和化による水酸化脂肪酸の生産に関し、*Lactobacillus* 属細菌に $\Delta 9$ 位ならびに $\Delta 12$ 位を水和する特異な活性を見いだした。

(4) L-イソロイシンからの 4-ヒドロキシイソロイシン生産に有用な 2-ケトグルタル酸依存性新規ジオキシゲナーゼ(L-イソロイシンジオキシゲナーゼ)を *Bacillus* 属細菌に見いだした。また、L-イソロイシンジオキシゲナーゼの遺伝子情報を活用して、様々な微生物ゲノム中にホモログを見いだす

とともに、これらが大腸菌にて発現し、アミノ酸水酸化酵素としての機能解析を行った。その結果、水酸化部位の異なる酵素(3位、4位、5位にそれぞれ特異的な酵素)を取得した。

(5) L-イソロイシンジオキシゲナーゼを生産する *Bacillus* 属細菌において、4-ヒドロキシイソロイシンがさらに酸化を受け対応する 4-ケト体となる新規 L-イソロイシン代謝経路を見いだした。この知見に基づき、4-ケト体を還元するカルボニル還元酵素の探索を行った結果、立体選択性の異なる様々な、3-ketoacyl-ACP reductase 類を取得した。

2. 2. 4. 4 Multi-component 酵素系の機能発現制御技術の開発(京都大学農学研究科)

電子伝達系、還元力供給系、エネルギー供給系、安定化蛋白質、低分子化合物(メディエーター)などを対象とした探索・機能解析を行った。具体的成果は以下のとおり。

(1) 酸化還元酵素系に有用な電子伝達系に関し FMN 依存酸化還元酵素系の解析を行い *Rhodococcus erythropolis* 由来の FMN 依存酸化還元酵素、L-パントイルラクトンデヒドロゲナーゼ(LPLDH)について周辺遺伝子の解析を行った。その結果、LPLDH 遺伝子の上流、下流にそれぞれ、鉄-硫黄クラスター・オキシドレダクターゼ、NADH-フラビン・オキシドレダクターゼと相同な遺伝子を見いだした。さらに、これらのアクセサリ蛋白質が LPLDH の誘導物質である 1,2-プロパンジオールにより誘導発現されることが、高発現された LPLDH の活性向上に寄与することを見いだした。

(2) *Bacillus* 属細菌由来シトクロム P450 水酸化酵素(BM-3)によるフェノール化合物(2-ベンジルオキシフェノール; 2-BP)のパラ位特異的水酸化を指標にシトクロム P450 水酸化酵素活性化因子の探索し、superoxide dismutase(SOD)に BM-3 の活性化/安定化効果を見いだした。また、2BP 水酸化反応に対する SOD の添加効果を、NADPH 消費速度およびカップリング定数にて評価したところ、SOD は BM-3 に対して、NADPH 消費速度の向上すなわち電子伝達の効率化、ならびに、カップリング定数の向上すなわち基質酸化の選択性向上に寄与しており、結果的に 2BP 水酸化反応を大幅に活性化していることが判明した。さらに、各種低分子ラジカル消去剤についてシトクロム P450 水酸化酵素活性化を検討し有効性を見いだした。また、P450 モノオキシゲナーゼの電子伝達系として、BM-3 還元ドメイン系、フェレドキシン系、ルブレドキシン系の 3 種の大腸菌発現系を構築した。

(3) 高度不飽和脂肪酸の分子内二重結合を異性異化する共役リノール酸生産性乳酸菌における関連酵素群の解析を行い、3 成分の複合酵素系(CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC)が触媒する水和(CLA-HY)、アルコール酸化(CLA-DH)、異性化(CLA-DC)、カルボニル還元(CLA-DH)、脱水(CLA-HY)の連続する反応により共役化が起こることを解明した。また、これらの酵素群にゲノム上にて隣接する遺伝子がコードする酵素(CLA-ER)の機能解析を行った結果、CLA-ERを合わせた計 4 種類の酵素の働きによる、水和(CLA-HY)、アルコール酸化(CLA-DH)、異性化(CLA-DC)、エノン還元(CLA-ER)、カルボニル還元(CLA-DH)、脱水(CLA-HY)の連続する反応により二重結合の飽和化が起こることを明らかにした。

(4) ラッカーゼ・ペルオキシダーゼの活性を賦活化する低分子メディエーターの探索を行い、ター

メリック、ポピーシードなどの植物抽出物に活性を見いだした。さらに、微生物二次代謝産物、フェノール性合成化合物、*N*-ヒドロキシ合成化合物等に活性を見いだした。

(5) ジオキシゲナーゼの補酵素である 2-ケトグルタル酸を効率供給する大腸菌宿主の開発を行い、水酸化アミノ酸生産を効率化する大腸菌宿主細胞を構築した。

2. 2. 4. 5 最適反応場・プロセスの構築(京都大学大学院農学研究科)

(1) 細胞内での multi component 酵素系発現の最適化に関して、ケトイソフロロンから(4*R*,6*R*)-アクチノールを生産するプロセスに有用な複合酵素系発現微生物触媒の開発を行った。すなわち、本プロセスに必要な、*Candida* 属酵母ならびに *Torulopsis* 属酵母由来の2種類のオレフィン還元酵素(CYE ならびに TYE)、*Corynebacterium* 属細菌由来カルボニル還元酵素(LVR)、さらに補酵素再生系としての *Bacillus* 属細菌由来グルコース脱水素酵素(GDH)の4つの酵素の大腸菌における共発現を試みた。その結果、薬剤耐性マーカーの異なる2種のベクターを活用することにより、4つの酵素を効率よく発現する形質転換大腸菌の構築に成功し、ブチル酢酸を用いる有機溶媒-水二相系反応の導入による反応条件の最適化を経て、50g/L スケールの変換に成功した(図4)。この際の反応収率は100%、生成した(4*R*,6*R*)-アクチノールの光学純度は89.5% *d.e.*であった。

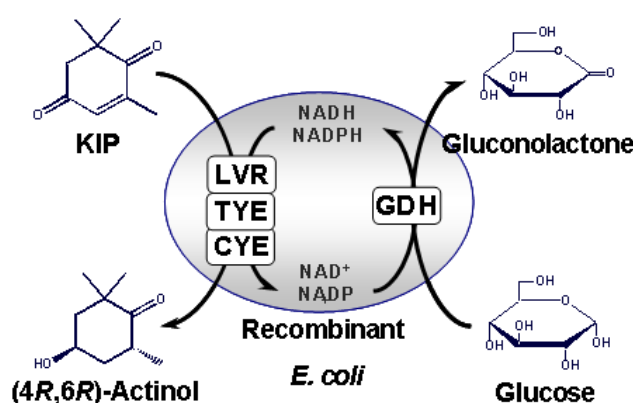


図4. 複合酵素系による光学活性アルコール(アクチノール)の生産プロセス

(2) パン酵母の解糖系を活用したグルコースからの高エネルギー化合物(フルクトース 1,6-ニリン; FDP)の供給系と、高エネルギー化合物(FDP)から誘導されるグリセルアルデヒド 3-リン酸とアセトアルデヒドとのアルドール縮合を触媒するアルドラーゼ(アセトアルデヒド耐性のデオキシリボアルドラーゼ)の反応とを共役させることにより、グルコースとアセトアルデヒドから、抗ウイルス剤の合成原料となるデオキシリボース 5-リン酸(DR5P)を効率的に生産しうるプロセスを構築した。このプロセスにおける中間体FDPならびに最終産物DR5Pの生産量はそれぞれ、120 g/Lならびに52.6 g/Lに達した(図5)。

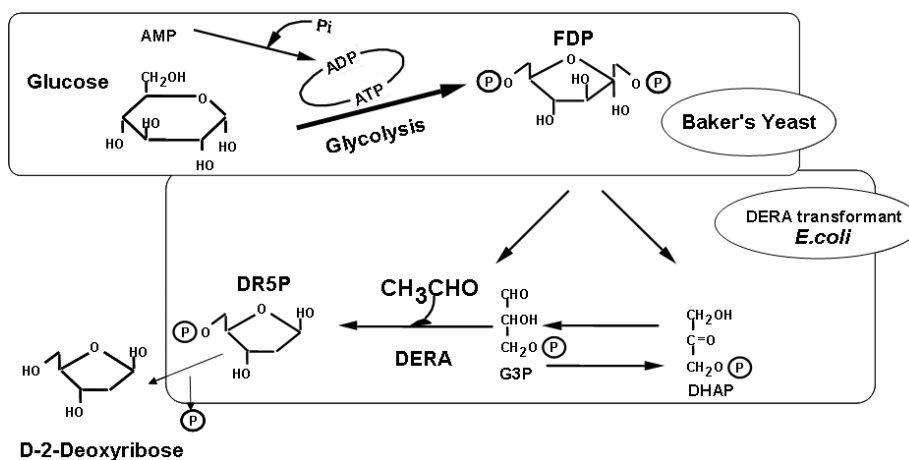


図5. パン酵母解糖系とアルドラーゼからなる複合酵素系によるグルコース、アセトアルデヒドからのデオキシリボース 5-リン酸生産

(3) 新規ジオキシゲナーゼ(L-イソロイシンジオキシゲナーゼ; IDO)の反応(図6)に必須である2-ケトグルタル酸(α -KG)を大腸菌の解糖系、TCA サイクルを活用してグルコースから供給すべく、 α -KG 消費に機能する酵素の遺伝子群を欠損させた大腸菌遺伝子破壊株を作成した。本大腸菌遺伝子破壊株に IDO を導入し、グルコースを炭素源とする培養法による L-イソロイシンからの 4-ヒドロキシイソロイシンの生産を試みた結果、収率 87%にて、73 g/L の生産を達成した。

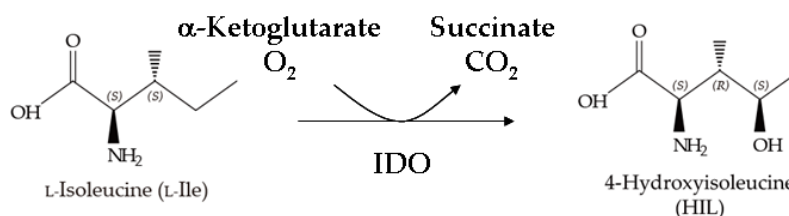


図6. L-イソロイシンジオキシゲナーゼを用いる L-イソロイシンからの 4-ヒドロキシイソロイシンの生産

(4) アルドラーゼ-トランスアミナーゼカップリング反応による 4-ヒドロキシイソロイシン生産に有用な酵素として見いだした HpaI/HpcH-aldolase family に属する 5 種のアルドラーゼ *Arthrobacter simplex* 由来 asHPAL、*Escherichia coli* 由来 YhaF ならびに YfaU、*Novosphingobium aromaticivorans* 由来 BphF、*Rhizobium radiobacter* 由来 HkpA を大腸菌にて発現させ、発現酵素群の機能解析を行った。その結果、これらの酵素が分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼとカップリングした複合酵素系において、ピルビン酸ならびに α -ケトブタン酸と様々な脂肪族ならびに芳香族アルデヒドから、多様な 4-ヒドロキシアミノ酸を生成しうること、また、その際の立体選択性が酵素により異なることを見いだした(図7)。

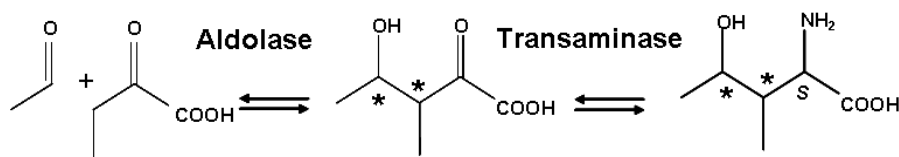


図7. アルドラーゼ-トランスアミナーゼ共役反応による4-ヒドロキシアミノ酸生産

(5) 乳酸菌由来の共役化酵素群 (CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC) を共発現する大腸菌を構築するとともに、本大腸菌を用いるリノール酸からの共役リノール酸生産条件を最適化し、収率 60%にて 53.5 mg/ml の共役リノール酸生産を達成した (図8)。本形質転換大腸菌は、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸を基質とし対応する共役高度不飽和脂肪酸を生産するプロセスにも応用可能であった。また、ポリマー原料等として有用な水酸化脂肪酸の生産プロセスに関し、乳酸菌由来の共役化酵素群コンポーネントの一つである水和酵素を用いる反応の最適化を行い、収率約 90%にて 30 g/L の生産を達成した (図9)。

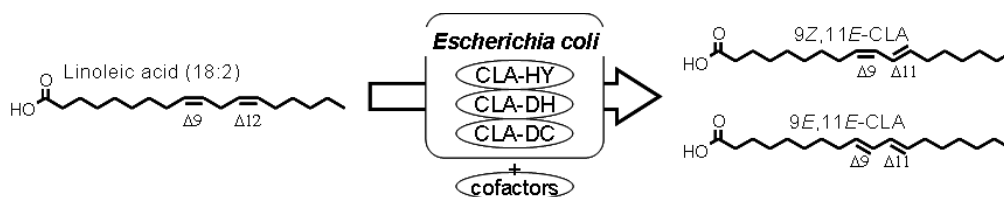


図8. 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 由来の不飽和脂肪酸共役化酵素群を発現させた大腸菌によるリノール酸からの共役リノール酸生産

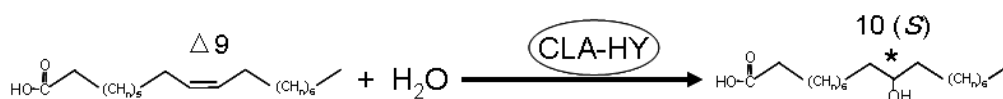


図9. 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 由来の水和酵素を用いる水酸化脂肪酸生産

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表等)
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	2件	0件	1件	10件	1件	10件
H19FY	2件	0件	0件	10件	5件	12件
H20FY	0件	0件	0件	8件	2件	3件
H21FY	1件	0件	1件	16件	2件	9件
H22FY	0件	0件	1件	10件	13件	22件

2. 2. 5 放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)

2. 2. 5. 1 天然型抗生物質A生合成遺伝子クラスターの解析

「非天然型」抗生物質Bを発酵生産させる戦略は図1に示す通りである。

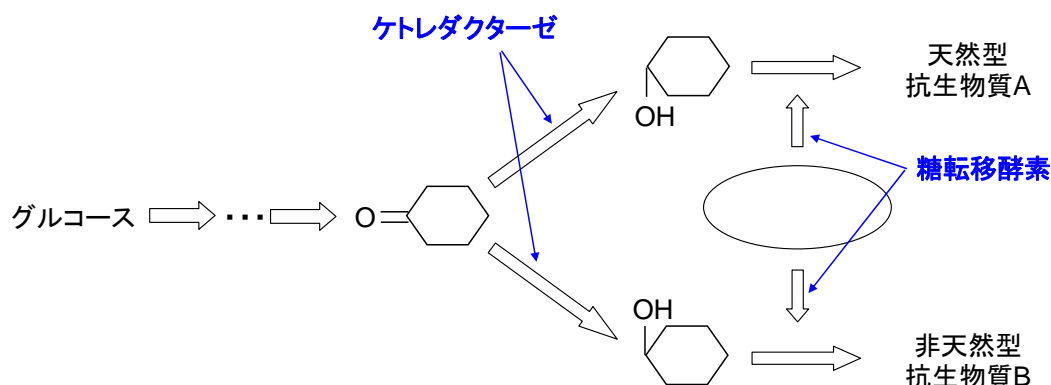


図1 非天然型抗生物質「非天然型抗生物質B」の発酵生産戦略

本戦略は、天然型抗生物質Aの生合成に関わるケトレダクターゼ遺伝子を破壊し、その代わりにエピ型ケトレダクターゼ遺伝子を導入することから成る。そこで、まず、明治製菓保有の天然型抗生物質A生産菌よりケトレダクターゼ遺伝子の単離を行った。天然型抗生物質A生産菌のゲノムDNAを鋳型として、ケトレダクターゼ遺伝子の一部をPCRで増幅した。これをプローブとして、EMBL3に作成したゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、ケトレダクターゼ遺伝子及びその周辺のDNA断片(約7.4kb)を取得した(図2)。



図2 ケトレダクターゼ遺伝子と周辺のORFの配置

次に、上記DNA断片を利用して、ケトレダクターゼ遺伝子破壊用プラスミドを構築した。即ち、部位特異的変異法によりケトレダクターゼ遺伝子の翻訳領域に in-frame で終止コドンを導入した変異ケトレダクターゼ遺伝子を含むDNA断片を、アブラマイシン耐性遺伝子と接合伝達用 oriT を含むプラスミドに挿入して構築した。このプラスミドを天然型抗生物質A生産菌へ接合伝達法により導入しアブラマイシン耐性株を取得した。アブラマイシン耐性株のゲノムDNAをPCR及びサザン解析にて分析し相同組換え体であることを確認した。相同組換え体をアブラマイシンを含まない液体培地で継代培養し、アブラマイシン耐性遺伝子を含むベクター領域が除去されたケトレダクターゼ遺伝子破壊株を得た(図3)。これを液体培養して天然型抗生物質Aの生産の有無をHPLCで分析した。その結果、ケトレダクターゼ遺伝子破壊株が天然型抗生物質A非生産となっている

ことを確認した(図4)。

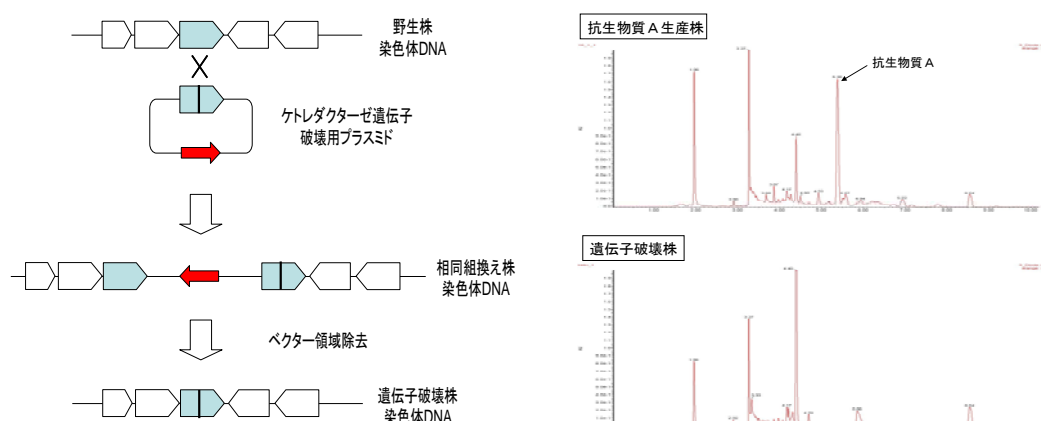


図3 相同組換えによるケトレダクターゼ
遺伝子破壊株取得の概略

図4 天然型抗生物質A生産株と遺伝子
破壊株の培養液の HPLC 分析

また、天然型抗生物質A生合成遺伝子クラスター全体をクローニングすべく、コスミドライブラリーをスクリーニングし、クラスター全体をカバーするコスミド(2 クローン)を単離した。これらの塩基配列を解析し全長 71, 079bp の塩基配列を決定した。決定した塩基配列内には 52 個の ORF が存在した。この中に、非天然型抗生物質B発酵生産においてケトレダクターゼに次いで重要と考えられる糖転移酵素遺伝子を2 個見出した。このうちの1 個の遺伝子(S)については、上述のケトレダクターゼ遺伝子破壊のときと同様、2 ステップ法による遺伝子破壊用プラスミドを構築し、接合伝達法によって天然型抗生物質A生産菌に導入した。得られたアプラマイシン耐性の形質転換体について、相同組換えによってプラスミド DNA が染色体に挿入されていることをPCRにより確認した後、該形質転換体よりアプラマイシン感受性株を誘導し、S遺伝子破壊株を得た。本遺伝子破壊株を抗生物質生産培地で培養した結果、天然型抗生物質Aの生産は認められず、S遺伝子が天然型抗生物質Aの生合成に関わる糖転移酵素遺伝子であることを明らかにした。

一方、生合成遺伝子クラスター中に存在するもう一つの糖転移酵素遺伝子(H)について、S遺伝子の場合と同様に 2 ステップ法による遺伝子破壊用プラスミドを構築し遺伝子破壊株を取得したが、天然型抗生物質Aの生産に何ら影響は及ぼさなかったことから、天然型抗生物質Aの生合成に関わる糖転移酵素遺伝子ではないことが示された。

2. 2. 5. 2 非天然型抗生物質B生産用遺伝子資源の探索

非天然型抗生物質Bを生産させるためには、天然型抗生物質A生合成に関わるケトレダクターゼとは酵素反応後の水酸基の立体配置が異なるケトレダクターゼ(エピ型ケトレダクターゼ)をコードする遺伝子が必要である。そこで、放線菌が生産する既知二次代謝産物の分子構造を検索し、非天然型抗生物質B生産に利用可能なエピ型ケトレダクターゼ遺伝子を含む可能性がある菌株をピックアップし、下表に示す5種のエピ型ケトレダクターゼ遺伝子をクローニングし塩基配列を確

認した。

菌株	抗生物質	遺伝子
<i>Streptomyces mycarofaciens</i>	ミデカマイシン	<i>orf29</i>
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	エリスロマイシン	<i>eryBIV</i>
<i>Streptomyces avermitilis</i>	アベルメクチン	<i>avrE</i>
<i>Streptomyces olivocromogenes</i>	オレアンドマイシン	<i>oleU</i>
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	クロレモマイシン	<i>evaE</i>

初めに、*S. mycarofaciens*由来の *orf29* 遺伝子を *ermE**プロモーター制御下に配置した接合伝達用プラスミド pMED-E を構築した。これをケトレダクターゼ遺伝子破壊株の染色体 DNA 上の *attB* 部位に導入した(図5)。

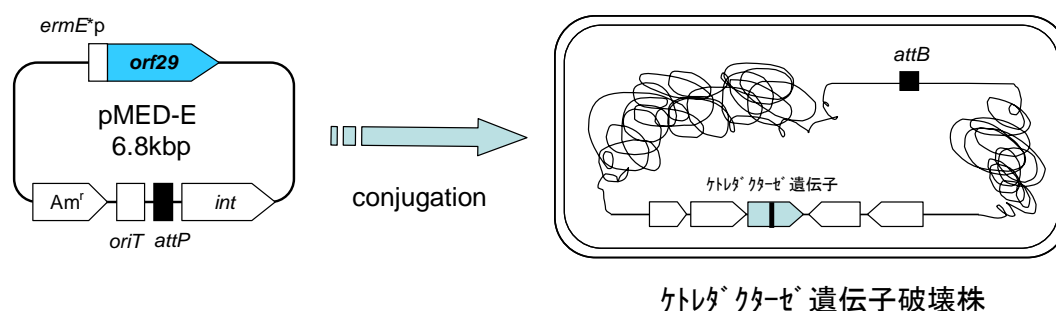


図5 接合伝達法によるプラスミド pMED-E のケトレダクターゼ遺伝子破壊株への導入

得られた形質転換体(ケトレダクターゼ破壊株/pMED-E)を培養し、培養液を LC-TOFMS で分析した結果、非天然型抗生物質B標品と同じ保持時間に新たなピークが検出され、その分子量は非天然型抗生物質Bのものと一致し、目的とする非天然型抗生物質Bの発酵生産を確認できた(図6)。

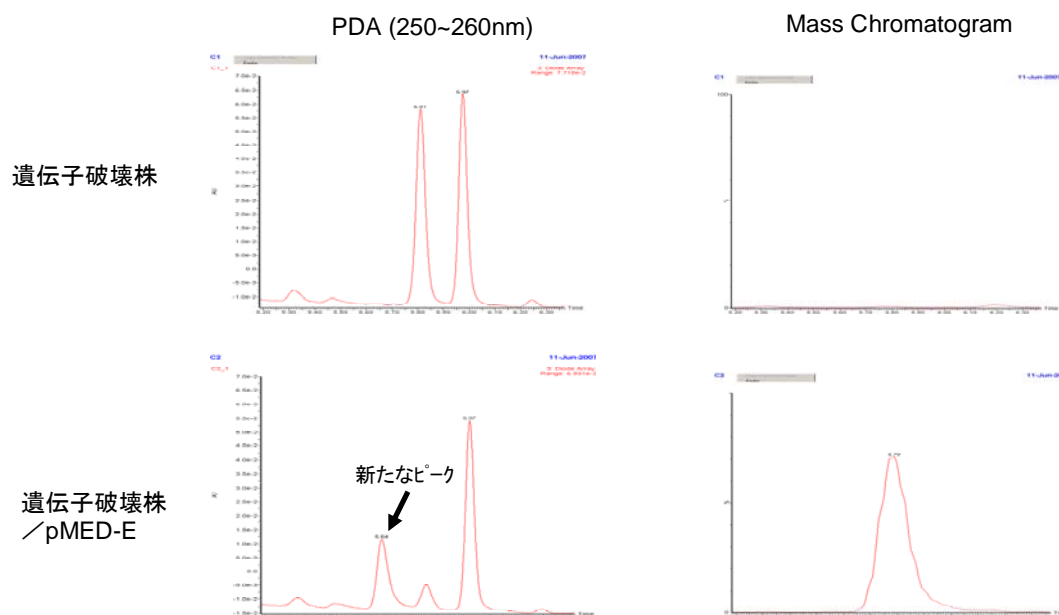


図6 LC-TOFMS 分析による非天然型抗生物質Bの検出

次に、他の4種のエピ型ケトレダクターゼ遺伝子についても *ermE**プロモーター制御下に配置した接合伝達用プラスミド(pERY-E, pAVR-E, pOLE-E, pEVA-E)を構築し、ケトレダクターゼ遺伝子破壊株の染色体DNA上の *attB* 部位に導入した。各形質転換体を培養し、非天然型抗生物質Bの生産量を比較した結果、*A. orientalis* 由来の *evaE* 遺伝子を使用したとき(ケトレダクターゼ破壊株/pEVA-E)が最も高く、ケトレダクターゼ破壊株/pMED-Eの約8倍の生産性を示した。この結果から、エピ型ケトレダクターゼの基質特異性が目的物質の生産性に大きく影響することが推定された。そこで、*evaE* 遺伝子産物の基質特異性を目的物質生産に最適化するため、error-prone PCRによるランダム変異導入及び優良変異遺伝子のスクリーニング系を確立した。

このスクリーニング系を用いて *A. orientalis* 由来の *evaE* 遺伝子の改良を試みた結果、野生型の遺伝子と比較して「非天然型」抗生物質Bの生産性を向上させるアミノ酸置換として Q42L、K153T 及び C270Rを見出すことができた。非天然型用の *evaE* 遺伝子は天然型抗生物質Aを生産するためのケトレダクターゼ遺伝子とも僅かながら相同性を有しており、コードするアミノ酸配列をアライメントすることが可能であるが、今回見出されたアミノ酸置換は全て天然型ケトレダクターゼタイプへのアミノ酸置換であったことは興味深い。また、これらアミノ酸置換のうち K153T が最も非天然型抗生物質Bの生産性を向上させる変異であったことから、サチュレーション変異法により153番目の位置のアミノ酸の最適化を実施した。その結果、プロリン以外のアミノ酸であれば生産性向上が認められ、その中でもトレオニンが最も良いアミノ酸であることが明らかとなった。また、153番目の近傍のアミノ酸について天然型ケトレダクターゼタイプへのアミノ酸置換を行った結果、

Q149S に生産性向上の効果を認めた。

さらに、K153T のアミノ酸置換を有する変異遺伝子を親遺伝子として、前述と同等の方法で非天然型抗生物質Bの生産性を向上させる変異遺伝子のスクリーニングを実施したところ、1980 株をスクリーニングして E306D のアミノ酸置換を見出した。このアミノ酸置換についても天然型ケトレダクターゼタイプへのアミノ酸置換であった。

```

M-RVVVLGATGSVGRQVCAAYQAHGWDVHGVARR---PAPHLSGCGFTELDLAAAAPGRI
MKLITVLGASGFIGSAVTRALAQQPIRLRAVARRQFTTPAPGQAETTVVAADLTDRV-ALA
                                     Q42L
ATVGLDLPADV VVNAAGGWDTE-EEMTYSHLRLVRRRLVEALALLPFRPRLVHLGSVHEY
DAVAGSDAVVYLLLSDDGGWRAVETEDAERVNVGVMRDLIDVTGSDNGTTPVVVFGGTVSQ
                                     Q149S
GPVPAGTLLHEDLLPEPVTPYARVKLETSSAVLTAARAGVLDVAVLRAANMSGPHPPQES
VGVPREPLDGESEPDNPATPYDIQKLTAEQILKKATANGQVRGISLRLPTIFGETTAQGA
                                     K153T
FLA-ALMARISTAFAHGGRLEL-SVADARRDFIDVRDVAQA--VVRAGRPAVGG-LVVN
NHDRGVVSSMARRALDGQALTIWGDGSVRRD VVHVEDVAAAFTAALANPDSL VGGHWLI G
I GRGDAV-PIGDLVGW-LLEAAAFPEDRVDRREAPVRSKGGDWTRLDI--GRARRLLSWA
AGRGDQLGEIFRLVAREVAEQTGQRPEVETCV EPPSHAPEMDFRSVTIDSSPFRAVTGWR
                                     C270R
PRIGLEDSVHSMWRTAHGAPA-----
PEISLSEGVRRRTVAALTTSVHGKARA
                                     E306D

```

図7 非天然型抗生物質の生産性を向上させるアミノ酸置換

2. 2. 5. 3 放線菌による「非天然型」抗生物質の生産検討

ケトレダクターゼ遺伝子破壊株に導入した5種のエピ型ケトレダクターゼ遺伝子は *ermE** プロモーター制御下で染色体上の *attB* 部位に挿入していたが、遺伝子を挿入する位置及び遺伝子発現制御の効果を検討するため、相同組換えにより *A. orientalis* 由来 *evaE* 遺伝子を天然型抗生物質A生合成遺伝子クラスター中のケトレダクターゼ遺伝子と置換するためのプラスミド pDaEva を構築した。図8に示すように、このプラスミドを使用して *evaE* 遺伝子を天然型抗生物質A生合成遺伝子クラスター中のケトレダクターゼ遺伝子部位に配置した菌株を取得し、非天然型抗生物質Bの生産性を調べた結果、*ermE** プロモーター制御下で *attB* 部位に挿入した場合と比較して非天然型抗生物質Bの生産量が約1.2倍に向上した。

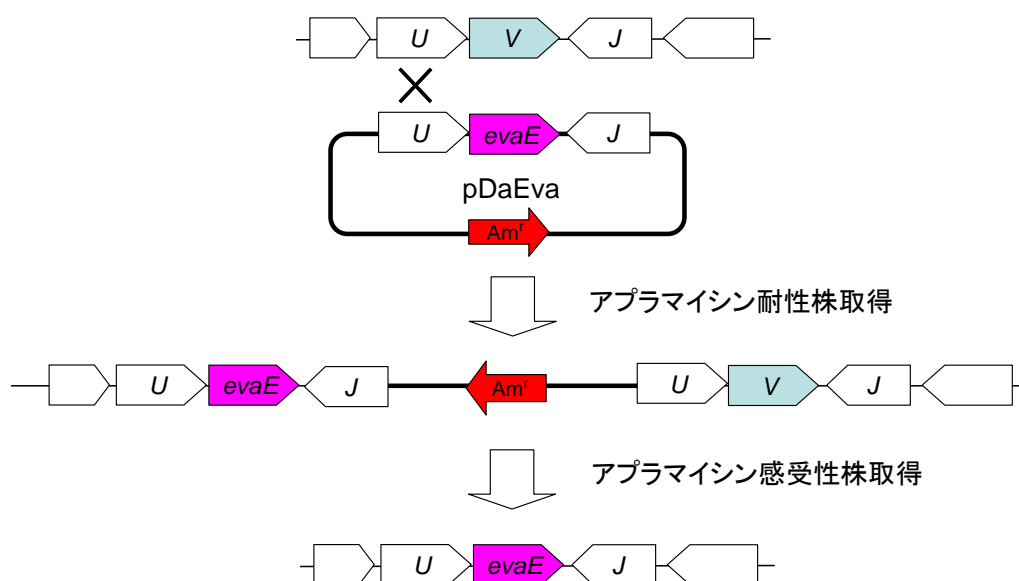


図8 相同組換えによるケトレダクターゼ遺伝子と *evaE* 遺伝子の置換

天然型抗生物質A合成遺伝子クラスター中のケトレダクターゼ遺伝子部位で *A. orientalis* 由来 *evaE* 遺伝子のコピー数を増加させた場合の効果調べることを目的に、*evaE* 遺伝子を2コピー直列に配置した組換え体を構築した。生産性を評価した結果、1コピーだけ配置した菌株と比較して約160%の生産性を示し、*evaE* 遺伝子のコピー数を向上させることによって生産性が向上することを見出した。

次に、同様の方法で *evaE* 遺伝子のコピー数を4コピーとした組換え体を構築して評価した。その結果、フラスコ培養では2コピーの組換え体と比較して生産性が向上する傾向が認められたが、ジャー培養では10日目以降の生産性が2コピーの組換え体よりも低迷する結果となった。

次に、非天然型抗生物質B合成遺伝子クラスターの中には、遺伝子発現制御遺伝子として2種の遺伝子(NとI)が存在していることに着目し(図9)、これら制御遺伝子を構成的且つ強力なプロモーターである *ermE**プロモーター制御下に配置し、染色体の *attB* 部位に挿入した。得られた組換え体についてフラスコ培養で評価した結果、N遺伝子を発現させた組換え体においてベクターのみを導入したコントロールに対して115%の生産性を示した。しかし、これらの組換え体をジャー培養で評価した結果、培養初期はN遺伝子を発現させた組換え体の生産性が親株を上回ったが、最終的には親株の方が生産性が高い結果となり、N遺伝子を強制発現させるメリットを見出すことはできなかった。

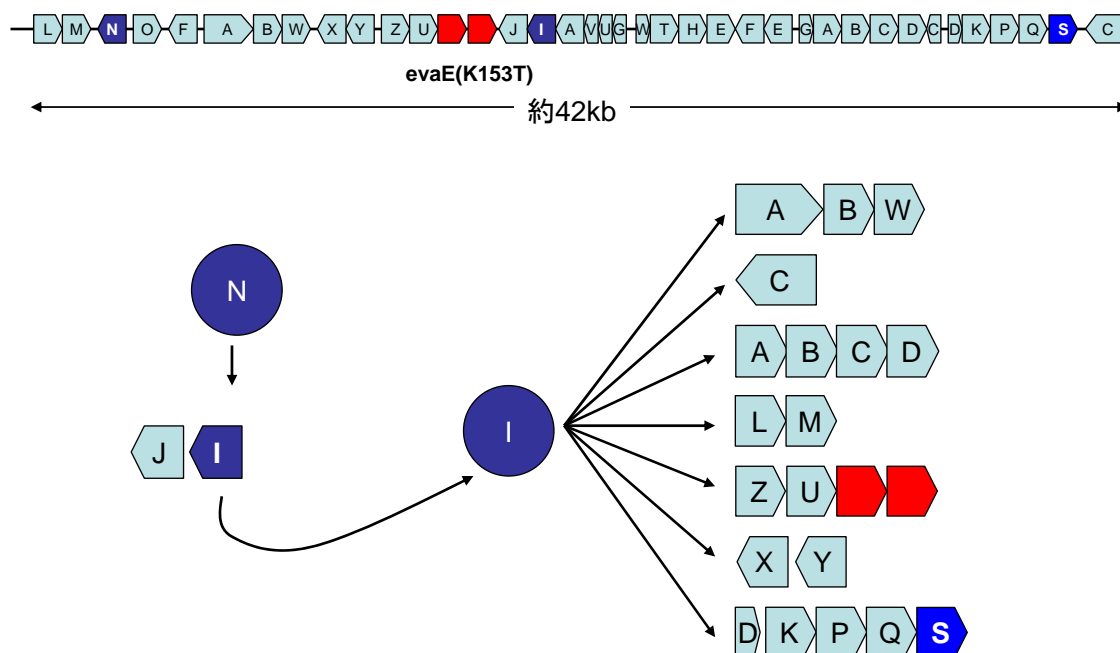


図9 非天然型抗生物質 B 生合成遺伝子クラスターの構造と制御遺伝子

次に、非天然型抗生物質B生合成遺伝子クラスター全体を増幅させることを目的に、生合成遺伝子クラスター全体を含み、放線菌に接合伝達可能なプラスミド pEPI-01 を構築した(図10)。

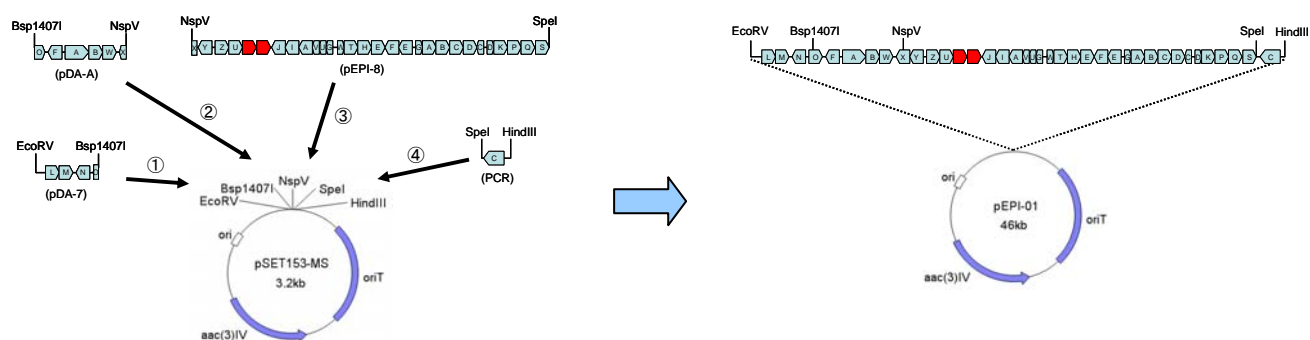


図10 非天然型抗生物質B生合成遺伝子クラスターを含むコスミド pEPI-01 の構築

本プラスミドを、ケトレダクターゼ遺伝子部位に *evaE* 遺伝子を 2 コピー直列に配置した非天然型抗生物質B生産菌に接合伝達で導入した。サザン解析により生合成遺伝子クラスターが導入されたことを確認した後、各菌株をフラスコ培養で評価した結果、生合成遺伝子クラスター全体の増幅により生産性が 1.2 倍に向上した。本組換え体をジャー培養で評価した結果、培養の途中の時期ではあるものの、非天然型抗生物質Bの生産速度が 175mg/L/D に達し、最終目標(200mg/

L/D)をほぼ達成することができた。これまでの生産性向上検討の結果をまとめると(図11)、*S. mycarofaciens* 由来の *orf29* 遺伝子を利用して非天然型抗生物質Bの発酵生産を確認できて以来、約 50 倍に培養生産性が向上したことになる。

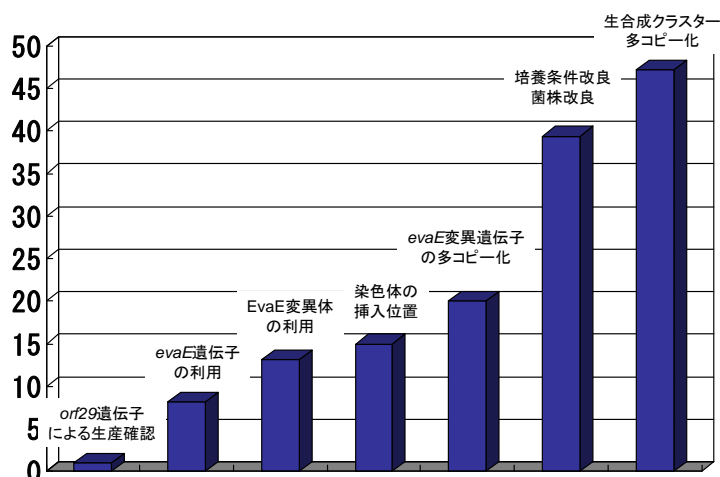


図11 非天然型抗生物質Bの培養生産性向上

2. 2. 5. 4 二次代謝産物生合成の制御技術の開発(東京大学と共同研究)

放線菌の二次代謝は、複雑な機構により制御されている。炭素源、窒素源などの栄養条件以外に、自身の生産する γ -ブチロラクトンによるスイッチング機構やタンパクのリン酸化を介した制御が絡み合っており、これらを統括的に理解することが二次代謝産物の生産量を上げるために必須である。ストレプトマイシン生産菌である *Streptomyces griseus* の γ -ブチロラクトンおよびタンパクリン酸化の二次代謝への制御を明らかにすべく、全ゲノム配列に基づいた DNA マイクロアレイの実験条件を確立した。DNA マイクロアレイを利用して明らかになった A-ファクター制御下にある約 600 遺伝子を順次、破壊・過剰発現し、それらの機能の同定を進めた。そのうち、ストレプトマイシン生産の制御を行う AtrA を同定し、*strR* 制御遺伝子を介するその制御機構を解明した。さらに形態分化に関する *whiB* 関連遺伝子 7 種につき、破壊・過剰発現から 2 種の重要な遺伝子を同定した。また、*S. griseus* ゲノム上の small non-coding RNA を 12 種全てを検出し、それらの破壊を行ったが、単独の破壊では二次代謝、形態分化いずれにも影響は観察されなかった。

一方では、 γ -ブチロラクトンの全生合成経路を明らかにした。本成果は、長年待ち望まれていた課題を解決したことになり、放線菌の二次代謝研究に大きなインパクトを与えた。

また、*S. griseus* で A-ファクターに直接制御されるグリキサゾン生合成につき、その制御機構の全貌を明らかにした。

更に、放線菌の二次代謝をグローバルに制御する蛋白質リン酸化系、AfsK/AfsR/AfsS、につき、転写因子 AfsR がいかに *afsS* のプロモーターを活性化するかの詳細を明らかにできた。AfsR は、放線菌の経路特異的転写因子 (SARP: *Streptomyces* antibiotic regulatory protein) の一員でもあり、この成果はこれまで不明であった SARP の転写活性化機構を説明でき

たことになる。

また、二次代謝、形態分化に及ぼすグルコース抑制については、その本質を担うと推定されるグルコースキナーゼの機能解析を中心に研究を進めた。グルコースキナーゼは制御領域と酵素触媒部位を有する”bifunctional”な酵素であると考えられていたため、その立体構造をX線結晶構造解析で解いた。一方、グルコース抑制を受ける β -ガラクトシダーゼ遺伝子を同定することに成功し、本遺伝子の転写解析によりグルコース抑制の程度を直接的に捉えることが可能になった。その結果、*Rhodococcus* 由来のグルコースキナーゼを用いた解析において、グルコースキナーゼ活性とカタボライト抑制能がある程度相関していることが明らかになった。この結果は、従来の「グルコースキナーゼは制御領域と酵素触媒部位を有する “bifunctional” な酵素である」という考えと合致しないものである。

2. 2. 5. 5 コンビナトリアル生合成技術の開発(東京大学と共同研究)

非微生物産物であるフラボノイドやイソフラボノイドを微生物を用いた発酵により生産させるため、「人工的生合成遺伝子クラスター」を構築し、大腸菌に導入した。生産量を上げるというよりは、より多くの化合物を生産させることに集中して取り組んだ。その結果、天然型である各種フラボノイド、フラボン、フラボノールの発酵生産に成功し、さらに種々の前駆体を投与することにより、非天然型化合物の生産にも成功した。また、大腸菌と酵母を組み合わせることにより、イソフラボンの生産にも成功した。一方、ワインに含まれるポリフェノールとして知られるレスベラトロール及びその誘導体をチロシンから発酵生産することにも成功した。さらに、イネから発見したクルクミノイド合成酵素を用い、大腸菌でチロシンやフェニルアラニンからクルクミノイド類を効率よく発酵生産させることに成功した。アミノ酸の代わりに種々のカルボン酸を投与すると、効率良く「非天然型」クルクミノイドが生産された。更に、クルクミノイド合成酵素、酵母由来の脂肪酸 β 酸化酵素群等を利用した大腸菌でのジゲロールアナログ生産系も構築できた。ウコンの根で生産されるクルクミン(カレーの黄色色素の本体)に代表されるクルクミノイドは、種々の生理活性を有することから大変注目を集めている化合物である。

一方、人工的生合成遺伝子クラスターの一員として用いるためのIII型ポリケタイド合成酵素を各種微生物や植物に求め、放線菌、カビ、イネが有するいくつかの遺伝子につき、その酵素反応機構を明らかにした。窒素固定細菌である *Azotobacter vinelandii* のIII型ポリケタイド合成酵素は、包囊の脂質成分として必須なレゾシノール(フェノール性長鎖脂質)の生合成に与ることを明らかにした。また、一方、イネゲノムからレゾシノール生合成酵素2種、カルコン合成酵素2種を同定し、それらの反応を解析した。レゾシノール合成酵素は、放線菌、枯草菌をはじめとする多くの微生物で見出され、一連の研究成果は、生物の膜脂質研究の一方向性を示したものとして評価されている。

更に、コンビナトリアル生合成に応用可能な酵素遺伝子の探索のため、いくつかの化合物の生合成研究を行ってきた。その結果、放線菌の4-ヒドロキシ-3-ニトロソベンズアミド生合成経路を解明するとともに、芳香族アミンのニトロソ化に関わる新規酵素を見出した。さらに、4-ヒドロキシ-3-

ニトロソベンズアミド生合成経路と一部類似したフェロベルディン生合成経路を明らかにし、興味深い反応を触媒する酵素を新たに複数取得するとともに、経路の改変によって新規フェロベルディンの生産にも成功した。一方、稀少放線菌の新規テルペノイドキノン生合成経路を明らかにした。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	6件	0件	11件
H19FY	1件	0件	0件	7件	0件	15件
H20FY	0件	0件	1件	8件	0件	31件
H21FY	1件	0件	0件	13件	0件	15件
H22FY	0件	0件	1件	8件	0件	21件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 2. 6発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

2. 2. 6. 1 *R. opacus* B4株の培養条件の検討

R. opacus B4株による非水系バイオプロセスの実現のため、通常の培養方法及び有機溶媒を菌体に接触させる培養方法を検討した。*R. opacus* B4株の水系培養菌体、有機溶媒重層培養菌体及び有機溶媒接触菌体を採取し、網羅的プロテオーム解析を実施した。網羅的プロテオーム解析結果に基づき、水系培養に比べて、有機溶媒重層培養菌体に発現するタンパク質を確認し、有機溶媒耐性株の性質や有機溶媒耐性機構解明のための発現タンパク質リストを作成した。

(1) 解析対象菌株

解析対象菌株①～③までの3株である。

- ① *R. opacus* B4 有機溶媒耐性株(大阪大学保存株)
- ② *R. opacus* B4 有機溶媒耐性劣化株(NITE保存株)
- ③ *R. opacus* B4 有機溶媒耐性欠損株(広島大学SigB破壊株)

(2) 培地

R. opacus B4有機溶媒耐性株 通常培養(24時間後採集)、有機溶媒耐性劣化株 通常培養(24時間後採集)及び有機溶媒耐性欠損株 通常培養(24時間後採集)の培地は、コスト、生産物質の精製及び発酵タンク内に栄養源の投入が簡便である単純培地とした。なお、有機溶媒耐性株 有機溶媒接触培養(24時間後、オレイルアルコール8時間接触)については富栄養培地とした。

(3) 培養結果

培地と菌体を培養フラスコに入れ、回転培養を実施した。*R. opacus* B4有機溶媒耐性株の単純培地による培養結果を図-1に示す。培養の結果、*R. opacus* B4株は、対数増殖期が24時間後に終了し定常期に移行した。

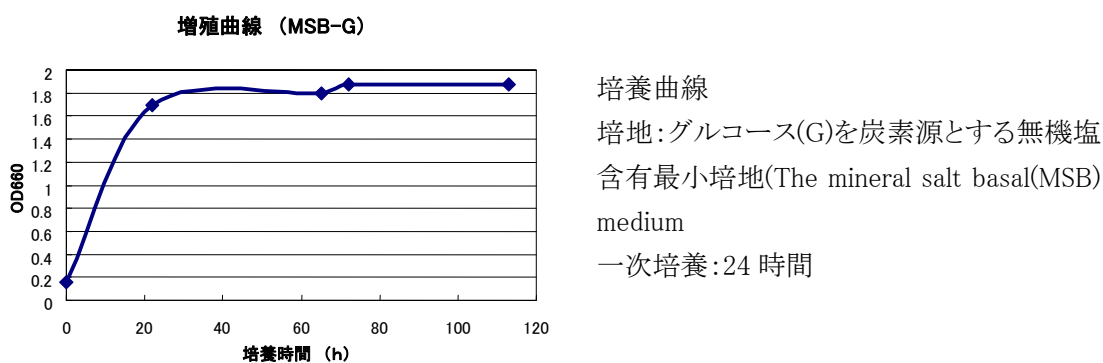


図-1 *R. opacus* B4有機溶媒耐性株増殖曲線

R. opacus B4有機溶媒耐性株及び*R. opacus* B4有機溶媒耐性劣化株の有機溶媒耐性を確認するため、トルエン及びデカンの気相接触培養を実施した。培養の結果、*R. opacus*

B4有機溶媒耐性劣化株は、デカンの気相接触培養については単純培地による通常培養と同様な増殖が認められたが、トルエンの気相接触培養については増殖が認められなかった(図-2)。一方、トルエンの気相接触培養では*R. opacus* B4有機溶媒耐性株のトルエン耐性が高かった(図-2)。このことから、*R. opacus* B4有機溶媒耐性劣化株は、何らかの作用により、有機溶媒耐性が劣化しているものと考えられた。よって、*R. opacus* B4有機溶媒耐性株及び*R. opacus* B4有機溶媒耐性劣化株のプロテオーム解析の結果を比較検討することで、有機溶媒耐性機構の解明に有効なデータが得ることとした。

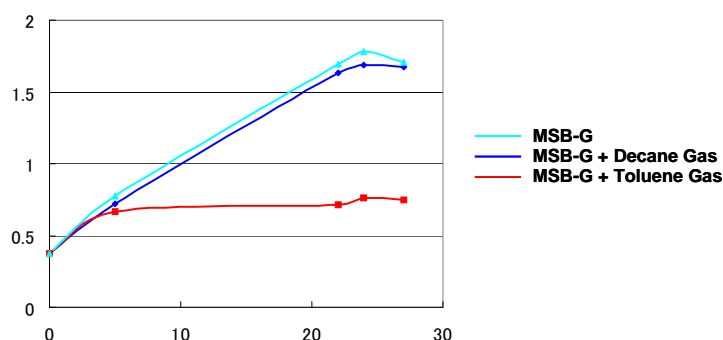
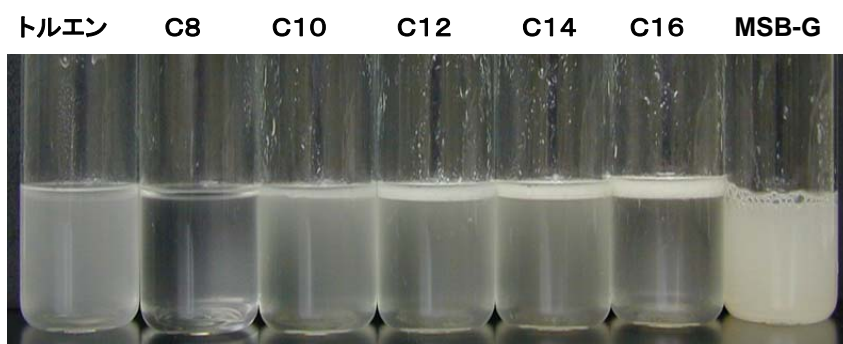


図-2 有機溶媒耐性劣化株の有機溶媒気相接触培養増殖曲線

広島大学において、*R. opacus* B4のSigB破壊株が有機溶媒耐性を欠損することが発見された。有機溶媒耐性機構の解明のため、*R. opacus* B4のSigB破壊株を*R. opacus* B4有機溶媒耐性欠損株として培養を行った。培養の結果、通常の水系培養では、*R. opacus* B4有機溶媒耐性株と同様の増殖を示した。*R. opacus* B4有機溶媒耐性株及び*R. opacus* B4有機溶媒耐性欠損株のプロテオーム解析の結果を比較検討することで、有機溶媒耐性機構の解明に有効なデータが得られる。

(4) 非水系バイオプロセス用有機溶媒の選定及び培養

有機溶媒耐性機構解明及び非水系バイオプロセスにおける菌体の挙動把握のため、重層する有機溶媒の種類について検討を行った。有機溶媒は、直鎖状アルカン(C8~16)及びオレイルアルコールを重層し培養を実施した。培養の結果、C12以上であれば溶媒中で良好に増殖することを確認した(図-3)。また、オレイルアルコールが菌体への影響が少なく、原料溶解性が高いことが判明したため、模擬的な非水系バイオプロセス用の重層溶媒はオレイルアルコールに決定した。



図－3 非水系バイオプロセス用有機溶媒の選定培養結果

模擬的な非水系バイオプロセスである有機溶媒重層ジャーフェーマンターによる培養を行った。培養の結果、*R. opacus* B4 有機溶媒耐性株は、オレイルアルコール重層による二相系培養では増殖することが確認された(図－4)。ただし、トルエンでは死滅することが確認された。



図－4 有機溶媒重層ジャーフェーマンターによる *R. opacus* B4 有機溶媒耐性株培養

2. 2. 6. 2 *K. rhizophila* DC2201 株の培養条件の検討

K. rhizophila DC2201 株による非水系バイオプロセスの実現のため、通常の培養方法及び有機溶媒を菌体に接触させる培養方法を検討した。*K. rhizophila* DC2201 株は、有機溶媒中で使用できる生体触媒として利用が期待されており、*K. rhizophila* DC2201 株の水系培養菌体及び有機溶媒接触菌体を採集し、網羅的プロテオーム解析を実施する。網羅的プロテオーム解析結果に基づき、水系培養に比べて、有機溶媒接触菌体に発現するタンパク質を確認し、有機溶媒耐性株の性質や有機溶媒耐性機構解明のための発現タンパク質リストを作成する。

(1) 解析対象菌株

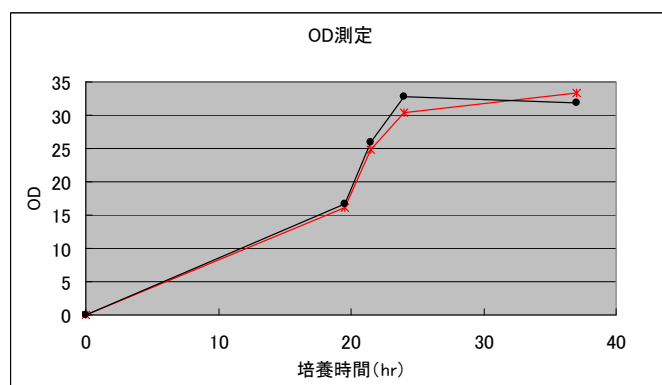
Kocuria rhizophila DC2201 ダイセル保存株 (NBRC1032170株と16Sで同等性を確認した。)

(2) 培地

培地は、*K. rhizophila* DC2201株の培養のためダイセルが検討した富栄養培地を用いた。

(3) 培養結果

K. rhizophila DC2201株の富栄養培地による培養結果を図-5に示す。培地と菌体を培養フラスコに入れ、回転培養を実施した。培養の結果、*K. rhizophila* DC2201株は、対数増殖期が24時間後に終了し定常期に移行した。



一次培養:24 時間
酢酸エチル時間:8 時間

図-5 *K. rhizophila* DC2201株増殖曲線

(4) 非水系バイオプロセス用有機溶媒の選定及び培養

有機溶媒耐性機構解明及び非水系バイオプロセスにおける菌体の挙動把握のため、重層及び接触させる有機溶媒の種類について検討を行った。8種類の有機溶媒に対する耐性を検討したところ、エタノール、イソプロパノール、ブタノール、酢酸エチル、オレイルアルコールの5種類の有機溶媒に実用的な耐性が認められた。酢酸ブチル、トルエン、ヘキサンの3種類の有機溶媒には実用的な耐性が認められなかった。汎用性や実用化を目指しているマンデル酸の製造を考慮し、接触有機溶媒は酢酸エチルとした。

K. rhizophila DC2201株を定常期まで培養し、その菌体を酢酸エチルに8時間接触させ、プロテオーム解析用菌体を得た(図-5)。

K. rhizophila DC2201株の物質変換を工業的に行うことを模擬した培養系による菌体の採集を実施した。*K. rhizophila* DC2201株は、菌体を生体触媒として用いることが研究されており、マンデル酸生産条件下の培養条件で菌体採集を実施した。模擬的な非水系バイオプロセスである有機溶媒重層ジャーファーメンターによる培養を行った(図-6)。培養の結果、*K. rhizophila* DC2201株有機溶媒耐性株は、酢酸エチル重層による二層系培養では菌体は増殖することはないが、生存しており、二層系培養の可能性が示された。

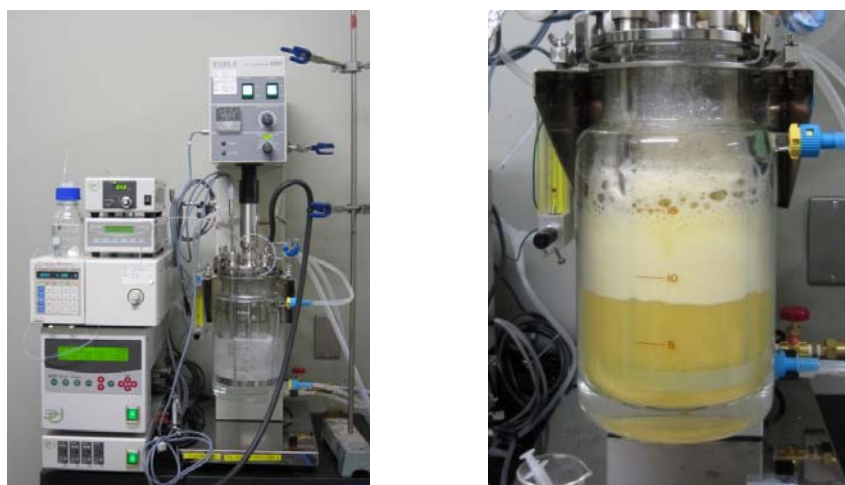


図-6 有機溶媒重層ジャーフェンターによる *K. rhizophila* DC2201 株の培養

2. 2. 6. 3 ショットガン法による網羅的プロテオーム解析

各培養により採集された菌体からタンパク質を抽出し、一次元電気泳動法 (SDS-PAGE) を用いタンパク質を分離した。分離されたタンパク質を酵素消化し、高速液体クロマトグラフィー・エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法 (LC-ESI-MS/MS) でペプチド断片を検出した。

(1) *R. opacus* B4株のショットガン法による網羅的プロテオーム解析結果

①有機溶媒耐性株 通常培養 (24時間後採集)

1,966種のタンパク質を検出した。*R. opacus* B4の総遺伝子8,366の23.5%に当たる。

②有機溶媒耐性劣化株 通常培養 (24時間後採集)

2,541種のタンパク質を検出した。*R. opacus* B4の総遺伝子8,366の30.4%に当たる。③

有機溶媒耐性欠損株 通常培養 (24時間後採集)

2,198種のタンパク質を検出した。*R. opacus* B4の総遺伝子8,366の26.3%に当たる。

④ 有機溶媒耐性株 有機溶媒接触培養 (24時間後、オレイルアルコール8時間接触)

1,997種のタンパク質を検出した。*R. opacus* B4の総遺伝子8,366の23.9%に当たる。

(2) *K. rhizophila* DC2201のショットガン法による網羅的プロテオーム解析結果

①通常培養 (24時間後採集)

1,118種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の47.5%に当たる。

②有機溶媒接触培養 (24時間培養後酢酸エチル5%添加、8時間接触後採集)

972種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の41.3%に当たる。

③有機溶媒接触培養 (22時間後採集、酢酸エチル3%含有培地)

1,146種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の48.6%に当たる。

④物質変換系培養 (ジャーフェンター通常培養、16時間後採集)

994種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の42.2%に当たる。

⑤質変換系培養(ジャーファーメンター通常培養、12時間培養後酢酸エチル5%添加、4時間接触後採集)

1,098種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の46.6%に当たる。

⑥物質変換系培養(マンデル酸生産条件菌体:生体触媒反応系)

919種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の39.0%に当たる。

2. 2. 6. 4 ペプチドマスーフインガープリント法による網羅的プロテオーム解析

各培養により採集された菌体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法(2D-PAGE)を用いタンパク質を分離した(図-7、8)。分離されたタンパク質を酵素消化し、マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)でペプチド断片を検出した。

(1) *R. opacus* B4株のペプチドマスーフインガープリント法による網羅的プロテオーム解析結果

①有機溶媒耐性株 通常培養(24時間後採集)

432種のタンパク質を検出した。

②有機溶媒耐性劣化株 通常培養(24時間後採集)

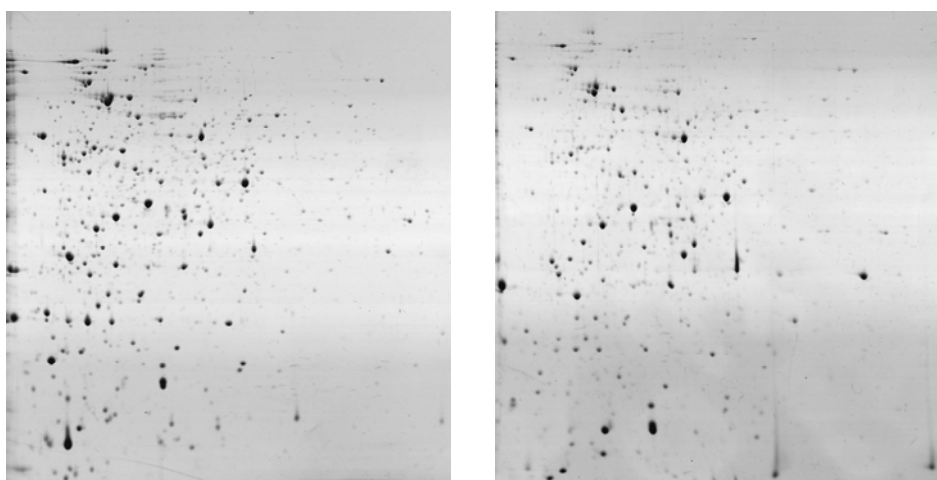
475種のタンパク質を検出した。

③有機溶媒耐性欠損株 通常培養(24時間後採集)

468種のタンパク質を検出した。

④有機溶媒耐性株 有機溶媒接触培養(24時間後、オレイルアルコール8時間接触)

467種のタンパク質を検出した。



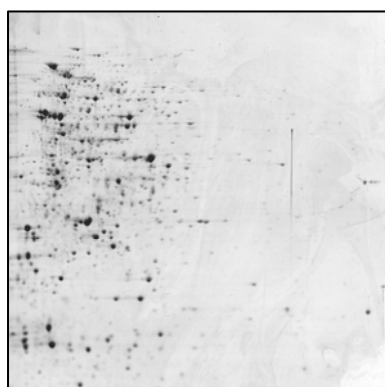
有機溶媒耐性結果株

有機溶媒耐性株

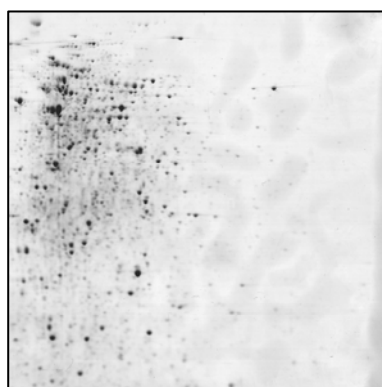
図-7 *R. opacus* B4の2次元電気泳動画像

(2) *K. rhizophila* DC2201のペプチドマスマスーフインガープリント法による網羅的プロテオーム解析結果

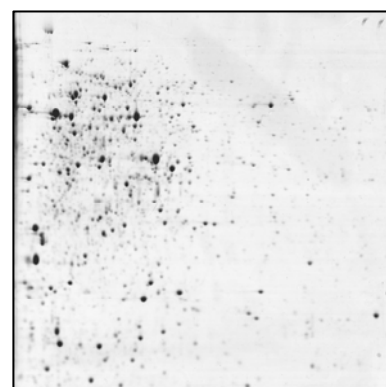
- ①通常培養(24時間後採集)
289種のタンパク質を検出した。
- ②有機溶媒接触培養(24時間培養後酢酸エチル5%添加、8時間接触後採集)
271種のタンパク質を検出した。
- ③有機溶媒接触培養(22時間後採集、酢酸エチル3%含有培地)
293種のタンパク質を検出した。
- ④物質変換系培養(ジャーファーマンター通常培養、16時間後採集)
241種のタンパク質を検出した。
- ⑤物質変換系培養(ジャーファーマンター通常培養、12時間培養後酢酸エチル5%添加、4時間接触後採集)
239種のタンパク質を検出した。
- ⑥物質変換系培養(マンデル酸生産条件菌体:生体触媒反応系)
174種のタンパク質を検出した。



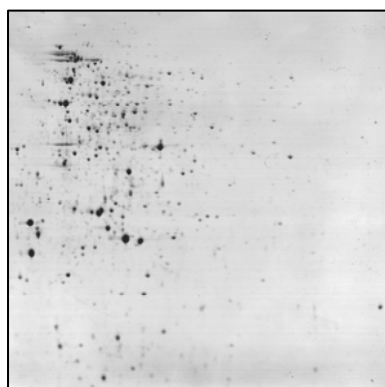
①通常培養



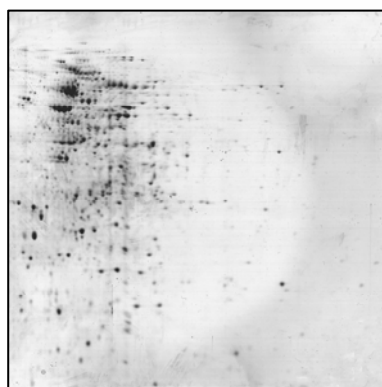
②有機溶媒接触培養



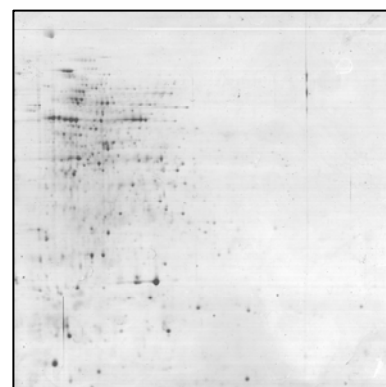
③有機溶媒接触培養



④物質変換系培養



⑤物質変換系培養



⑥物質変換系培養

図－8 *K. rhizophila* DC2201の2次元電気泳動画像

2. 2. 6. 5 エドマン分解法による有機溶媒耐性重要遺伝子の翻訳開始位置の決定

有機溶媒耐性機構の解明に重要と思われるタンパク質についてエドマン分解法による解析を行った。

(1) *R. opacus* B4のエドマン分解法によるプロテオーム解析結果

172種の発現タンパク質を検出し、同定及びN-末端アミノ酸配列を決定した。遺伝子翻訳位置の割合はATG:68.0%, GTG:31.4%, GGA:0.6%であった。他の生物種に比べて特異的であることから、有機溶媒耐性への関連が示唆された。

(2) *K. rhizophila* DC2201のプロテオーム解析結果

73種の発現タンパク質を検出し、同定及びN-末端アミノ酸配列を決定した。特に遺伝子翻訳位置の割合に特徴は見られなかった。

2. 2. 6. 6 膜タンパク質のプロテオーム解析技術の開発

有機溶媒耐性菌の有機溶媒耐性は、膜タンパク質が重要な役割をはたしていると考えられている。菌体破砕物からタンパク質を抽出するため、細胞膜類似構造の特殊両性界面活性剤(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS))及びジスルファイド結合(-S-S-)を開裂させ、タンパク質の立体構造を破壊する還元剤(Dithiothreitol(DDT))を同時に混合させるタンパク質溶解方法を新たに開発した。また、タンパク質を沈殿させるため、アセトンを加える条件を最適化した。他種類のタンパク質混合物である抽出液を強力なタンパク質溶解効果をもつ界面活性剤(Sodium *n*-dodecyl sulfate(SDS))を含有させる一次元電気泳動法(SDS-PAGE)にて分離・精製した。これにより、難溶性タンパク質も溶解させたまま分離・精製し、プロテオーム解析対象とすることが可能となった。

K. rhizophila DC2201株は、有機溶媒耐性機構が膜構造にあるとされ、強固であると想定されている。膜タンパク質を検出するため、菌体破砕方法として、従来の超音波式に変えて、高流速オリフィス式に変更し細胞破砕を実施した。

R. opacus B4及び*K. rhizophila* DC2201のショットガンプロテオーム法の結果では、有機溶媒排出ポンプとして機能している膜タンパク質をそれぞれ50種類以上検出することができた。しかし、検出した膜タンパク質のペプチド断片の位置を解析したところ、膜外部分に偏っていることが判明した。

2. 2. 6. 7 データ解析及び提供

(1) *R. opacus* B4株のデータ解析結果

R. opacus B4の有機溶媒耐性株及び耐性が減少した有機溶媒耐性劣化株の網羅的プロテオーム解析結果に基づき、水系の通常培養に比べて、有機溶媒重層培養菌体に発現するタンパク質を確認し、有機溶媒耐性株の有機溶媒重層培養時の性質や有機溶媒耐性機構解明のための発現タンパク質リストを作成した。

有機溶媒耐性株及び有機溶媒耐性劣化株の間で発現量の変動しているタンパク質の

解析結果から、変動タンパク質の機能分類を実施した。代謝変動の詳細をさらに明らかにするため、代謝パスウェイごとに構成遺伝子の発現の増減について解析を行った。結果として、有機溶媒に対してより高い耐性を示す有機溶媒耐性株は、有機溶媒耐性劣化株に比べて代謝系の発現が顕著であることが明らかになった。

R. opacus B4 株の SigB 遺伝子を破壊し有機溶媒耐性が無くなった有機溶媒耐性欠損株から検出した約 2,200 種の発現タンパク質及び二次元電気泳動の結果を解析したところ、*R. opacus* B4 の有機溶媒耐性株と類似のタンパク質発現状況であることが明らかになった。有機溶媒耐性に関係あると考えられている膜構造関連遺伝子の発現もあることから、有機溶媒耐性欠損の理由は膜構造ではなく、SigB 関連遺伝子による代謝が関係していると考えられる。よって、有機溶媒耐性には SigB 関連遺伝子による代謝と膜構造による2種類が存在すると推察される。

網羅的プロテオーム解析の結果から *R. opacus* B4 の有機溶媒耐性と非水系バイオプロセスによる物質生産のためには、膜構造の構築が重要であることが判明した。*R. opacus* B4 を通常の培養により、細胞外膜に親油性層を形成させた後に、有機溶媒と接触させる非水系バイオプロセスを模擬した培養方法が大阪大学で開発された。その菌体を有機溶媒接触株としてプロテオーム解析を実施した。検出した約 2,000 種の発現タンパク質及び二次元電気泳動の結果を検討したところ、*R. opacus* B4 の有機溶媒耐性株と類似のタンパク質発現状況であることが明らかになった。しかし、代謝関連遺伝子の種類の減少及び発現量の減少が見られた。また、代わりに、有機溶媒排出ポンプとして機能している膜タンパク質の発現が見られた。代謝を抑えて、有機溶媒排出を行っている菌体状態と考えられる。SigB 等有機溶媒ショック対応遺伝子からのタンパク質が検出されていない理由については不明である。これらの結果は、*R. opacus* B4 の特徴である有機溶媒耐性機構の解明及びバイオプロセスにおける菌体状態の把握に重要な情報であると考えられる。

(2) *K. rhizophila* DC2201株のデータ解析結果

K. rhizophila DC2201 の定常期までの培養菌体から検出した約 1,120 種の発現タンパク質と有機溶媒接触(酢酸エチル 3%含有培地)させた約 1,150 種の発現タンパク質及び物質変換系培養菌体を解析したところ、有機溶媒接触株は、代謝関連遺伝子の種類の減少及び発現量の減少が見られた。また、代わりに、有機溶媒排出ポンプとして機能している膜タンパク質の発現が見られた。代謝を押さえて、有機溶媒排出を行っている菌体状態と考えられ、*R. opacus* B4 とほぼ同様の結果となった。

K. rhizophila DC2201 株の物質変換系が有望であり、網羅的プロテオーム解析の解析結果の発現タンパク質リストは、生体触媒として活用する際の触媒反応酵素群のリストと考えることもできる。現状の発現タンパク質リストからは、アリキル鎖の修飾に関する遺伝子が見つかっている。また、アルケン化の可能性のある酵素もあり、高分子材料の生合成の可能性も見いだされた。

これらの結果は、*K. rhizophila* DC2201 の特徴である有機溶媒耐性機構の解明及びバイオプロセスにおける菌体状態の把握に重要な情報であると考えられる。

(3) データの提供

R. opacus B4株のプロテオーム解析結果について、共同実施先である大阪大学及び広島大学に提供した。

K. rhizophila DC2201株のプロテオーム解析結果について、共同実施先であるダイセル化学工業株式会社に提供した。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H19FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H20FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H21FY	0件	0件	0件	0件	0件	1件
H22FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件

（※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約）

2.3 バイオリファイナリー技術の開発

2.3.1 ソフトバイオマスの糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発 (財団法人地球環境産業技術研究機構)

2.3.1.1 研究成果の概要

本プロジェクトでは、日本における経済性優位なるバイオリファイナリー産業の早期実現を目指し、独自の革新的なバイオプロセス「増殖非依存型バイオプロセス」をコア技術として、ソフトバイオマス由来の糖を原料とした基幹化学物質製造プロセスの工業化技術の研究開発を行った。本技術開発は、ソフトバイオマスから糖を調製する糖化技術の開発((1)ソフトバイオマス糖化技術の開発)と糖から基幹物質を製造する糖変換技術の開発((2)増殖非依存型バイオプロセスの開発)に分けて実施し、また、双方の技術を連結したトータルシステムの開発((3)トータルシステムの開発)を平成19年度より実施した。平成20年度後半より、増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップ時の反応条件の最適化を検討した((4)ベンチプラントによる実証試験)。

「(1)ソフトバイオマス糖化技術の開発」に関わる基盤研究として、カリフォルニア大学デービス校に「(1)(a)-1. セルロソーム構造の発現、機能解析」を、石川県立大学に「(1)(a)-2. スーパーセルラーゼの創製」を、かずさDNA研究所に「(1)(a)-3. メタゲノム的手法によるバイオリファイナリー酵素の開発」を再委託して実施した。「(2)増殖非依存型バイオプロセスの開発」に関わる基盤研究として、北海道大学に「(2)(a)-2-5. *C. glutamicum*におけるピルビン酸キナーゼ活性変異株の取得と解析」を、東京工業大学に「(2)(a)-5-4. コリネ型細菌 *C. glutamicum* の細胞増殖機構の解析」を再委託して実施した。

これまでに得られた成果により、糖化技術の開発では、高機能糖化酵素(セルロソーム)を活用したソフトバイオマスの高効率糖化プロセスの基盤要素技術を確立し、目標を達成した。また、糖変換技術の開発では、増殖非依存型バイオプロセスによる各種有用化合物の高効率生産の基盤要素技術を確立し、D-乳酸、L-アラニン、キシリトール、バリンについて目標生産性 10 g/L/hを上回る高効率生成システムを確立した。さらに、ソフトバイオマス由来の糖を原料としたバイオプロセスの工業化の重要課題である、C6糖とC5糖混合糖の同時利用技術を確立した。

(1)ソフトバイオマスの糖化技術の開発

セルロソームは、絶対嫌気性細菌の *Clostridium* 属細菌等に見出される蛋白質・酵素高次構造複合体であり、既存の *Trichoderma reesei* 等のセルラーゼに比べて蛋白質当たりの活性値が数十倍高いことが知られている。しかしながら、セルロソームを生成する絶対嫌気性細菌は極端に増殖が遅いことから、経済的なセルロソーム製造は困難である。本プロジェクトでは、この高機能糖化酵素の実用的な製造技術を確立することを目指し、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum*(コリネ型細菌)によるセルロソーム生産(人工セルロソーム)の基盤技術開発を行った。

人工セルロソームにおけるセルラーゼ酵素の組み合わせをソフトバイオマスの分解に最適化するとともに、巨大な骨格蛋白質から酵素結合に必須ではないドメインの除去等による改良を加え、

新規骨格蛋白質を構築した。一方、高機能糖化酵素開発の基盤研究として、耐熱性セルラーゼの取得とその特性・構造の解明、酵素の耐熱性向上・活性向上技術の基盤となるライゲーションフリー・ランダム変異導入法の開発等を行った。また、高機能酵素遺伝子の取得方法としてメタゲノム的手法の基盤技術の開発および改良を行い、構築したメタゲノムライブラリーから得られた 28 種のセルラーゼ様遺伝子産物のセルラーゼ活性を確認し、4 個の新規酵素の特性を明らかにした。

Clostridium cellulovorans のセルロソームを構成するセルロース分解酵素の一つ (EngB) と骨格蛋白質の一部 (Cbpa) をコリネ型細菌において発現させ、細胞外に分泌されることを確認した。さらに、コリネ型細菌における異種蛋白質発現分泌系の効率化に利用するため、該細菌のゲノム情報解析に基づく分泌シグナルの探索を行った結果、106 種の新規分泌シグナルを確認し、このうち 31 種は既知分泌シグナルより高い分泌能を示した。また、高分泌能を示す変異株を取得し、新規分泌シグナルの利用等と合わせて、これまでのコリネ型細菌による異種蛋白質分泌量を大きく上回る高効率分泌システムを確立した。

高効率糖化プロセスの開発として、酵素再利用法による連続糖化システムを構築し、市販酵素を用いたリグニン含有古紙の糖化では糖化率 80% を維持したまま、400 時間超の連続糖化を確認した。本技術を確立することにより酵素再利用による酵素コストの低減が可能となり、ソフトバイオマスの糖化プロセスの工業化に有用と考えられる。また、市販酵素にセルロソームを添加した場合の糖化能の相乗的な促進効果を確認した。

(2) 増殖非依存型バイオプロセスの開発

コリネ型細菌は還元条件下において増殖は停止するものの主要な代謝系は維持され機能する性質を持ち、さらに、非増殖条件下では増殖条件下よりも、細胞当りの代謝活性が高く、より高い物質生産能力を有する。本プロジェクトではこの増殖非依存型バイオプロセスに関連する細胞機能を解明し、その知見を利用して高度経済性を有するバイオリファインリーの実現に必要なバイオマス由来糖類からの各種化合物高効率生成システムの基盤技術開発を行った。

コリネ型細菌の物質代謝や細胞複製に関与する様々な遺伝子の機能および発現制御機構を明らかにした。これらの解析の結果、コリネ型細菌が中央代謝系の制御や細胞複製について、モデル微生物として研究の進んでいる大腸菌や枯草菌とは大きく異なるシステムとなっていることが明らかになった。また、糖代謝関連遺伝子の欠損株・高発現株の糖代謝活性の解析を行った。これらの知見に基づき非増殖条件下で糖消費速度が向上する遺伝子改変株が得られ、また、解糖系酵素の発現量の改変による糖代謝機能強化・生産性向上の基盤要素技術を確立した。

物質生産細胞の遺伝子発現レベルの最適化の検討を行う際に重要なツールとなる、ベクター系と誘導プロモーターの開発を行った。新規プラスミド 2 種を単離し、これと既存のプラスミド 4 種、抗生物質耐性遺伝子 7 種を利用して、計 42 種の共存可能なベクターを構築した。また、コピー数を数十から数百まで増加させたプラスミドを開発した。網羅的遺伝子発現制御機構の解析に基づき、各種プロモーターを利用した遺伝子発現誘導系を確立した。さらに、新規プラスミドにランダム

変異を導入してスクリーニングを行い、効率的な染色体組換えが可能な温度感受性プラスミドを開発した。

有用化合物高効率生成システムの基盤技術開発として、有機酸、糖アルコール、アミノ酸、の各種化合物の生産細胞の構築を行った。解糖系のピルビン酸から一段階の反応で生成する D-乳酸と L-アラニン生産株では、増殖非依存条件におけるコリネ型細菌の高効率糖変換能が良く反映され、この基盤技術の適用により高い生産性を確認した。D-乳酸の生産性は目標とする STY 10 g/L/h を大きく上回った。L-アラニンに関しては、生産経路の構築により糖代謝速度が野生株と比較して低下したが、アンモニアからのアミノ基の供与と解糖系酵素の強化により目標生産性を達成した。キシリトール生産株の構築では、xylose reductase (XR) 遺伝子の導入、XR の補酵素特異性の改変、キシリトール取り込み経路の破壊等に加え、下記グルコース-キシロース同時利用技術の確立により、目標生産性を達成し、本プロセスにおいて XR によるキシリトール生産に必要な補酵素再生が解糖系との共役により効率良く行われることを示した。中央代謝系の Key 代謝物から反応段数の多い分岐鎖アミノ酸バリンの生産株の構築では、これまでに開発した要素技術を基盤として、改良を重ね、競合代謝経路遺伝子の破壊、バリン生合成経路遺伝子の発現最適化、フィードバック阻害の解除、アミノ基供与の効率化、細胞内酸化還元バランスの調整、解糖系強化等を行い、目標生産性を達成した。

(3) トータルシステムの開発

バイオマスの有効利用のためには、通常、微生物が利用しやすいグルコースだけでなく、バイオマス由来の様々な C6 糖と C5 糖の混合糖を効率的に利用する必要がある。また、糖化過程で生じるフェノール類、フラン類、酸による発酵過程の阻害が大きな技術障壁となっている。後者に関しては、これら発酵阻害物質により細胞増殖は阻害されるが、増殖非依存型バイオプロセスでは発酵阻害物質の影響は極めて小さいことが示された。前者の混合糖利用に関しては、コリネ型細菌の各種糖類取り込み・代謝経路に関する解析により得られた知見に基づき、糖利用能改変の基盤技術開発を行った。C5 糖利用能を付与したコリネ型細菌を用いた増殖非依存型バイオプロセスにより、バイオマス由来の主要な糖類であるグルコース、キシロース、アラビノース3糖混合糖の完全同時利用を確認した。さらに、マンノース利用能を向上させた。コリネ型細菌で確立したこの混合糖利用技術は、幅広いバイオマス原料から各種有用化合物の高効率生産システムの構築を可能とし、他の工業微生物と比較して高い優位性を持つと考えられる。

糖化工程での混合糖液による基幹物質生産への影響を把握するため、モデル糖液のグルコースとキシリトール混合糖からのキシリトール生産に対する基質の量比の影響を明らかにした。上記混合糖の同時利用技術により、キシリトールの生産性が著しく向上することを確認した。また、バリン生産株にキシロースとアラビノース利用能を付与することにより、グルコース、キシロース、アラビノース3糖混合糖が同時利用され、高効率でバリンが生成することを確認した。

フラスコスケールレベルで古紙を原料として基幹物質の生産実験を行った。増殖非依存型バイオプロセスにより実糖化液中のグルコースとキシロース等を含む混合糖が同時利用され、高効率

で D-乳酸が生成することを確認した。

(4) ベンチプラントによる実証試験

増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップの検討を行った。10 L 容量のジャーフェメンターを用いて反応を行ったところ、フラスコスケールレベルと同等以上の生産性が得られた。

2. 3. 1. 2 研究成果の詳細

(1) ソフトバイオマス糖化技術の開発

ソフトバイオマスの高効率糖化に利用可能な高機能セルラーゼ(セルロソーム)生産技術の基盤研究開発と酵素コストの低減が可能な酵素再利用法による糖化システムの構築を行った。

(a) セルロソーム酵素遺伝子群の機能解析と遺伝子改良

高機能セルラーゼとしてセルロソームに着目した。セルロソームはセルラーゼと骨格蛋白質の高次構造複合体であり、絶対嫌気性 *Clostridium* 属細菌が細胞表層に生成し、既存の *Trichoderma reesei* 等のセルラーゼに比べて蛋白質当たりの活性値が数十倍高いことが知られている。しかしながら、絶対嫌気性細菌は極端に増殖が遅いことから、経済性あるセルロソームの製造は不可能とされていた。本プロジェクトでは、高活性セルロソームの経済性ある製造法の確立を目指し、コリネ型細菌等の工業微生物によるセルロソーム生産(人工セルロソーム)の基盤技術開発を行った。カリフォルニア大学デービス校で「(1) (a)-1. セルロソーム構造の発現・機能解析」を実施した。また、高機能糖化酵素の開発の基盤研究として、石川県立大学で「(1) (a)-2. スーパーセルラーゼの創製」、かずさ DNA 研究所で「(1) (a)-3. メタゲノム的手法によるバイオリファインアリー酵素の開発」を実施した。

(a)-1. セルロソーム構造の発現・機能解析

(カリフォルニア大学デービス校 Roy H Doi 教授)

Clostridium cellulovorans のセルロソーム画分のアニオン交換カラムからの溶出パターンと2次元ゲルクロマトグラフィーによる解析から、セルロソームがサブ集合体を含むことを示した。また、*C. cellulovorans* をセルロース(アビセル)、キシラン、ペクチン、コーンファイバーで生育し、セルロソーム画分と非セルロソーム画分を単離し、それぞれの活性を調べ、さらに、両画分の混合物の活性比較により、異なる炭素源で生育した細胞由来のセルロソームの間で相乗効果があるかどうか検証した。全ての場合で、相加的な活性が観察されたが、相乗効果は認められなかった。この結果はそれぞれの炭素源で生育した細胞内でセルロソーム活性の最大化がおこっていることを示唆しており、興味深い。

C. cellulovorans のセルロソームの構造と機能の解析により、大きなセルロソーム遺伝子クラスターに存在する *hbpA* を見出した。この遺伝子がコードする HpbA 蛋白質は2個のドメイン、surface layer homology (SLH) ドメインとコヘシンドメインを有していた。この遺伝子を大腸菌で発現させて、

機能解析を行った。その結果、HpbAは *C. cellulovorans* の細胞壁に結合し、また、EngB や EngL などセルロソーム酵素に対しても結合能を有することが示された。HpbA とセルロソーム酵素複合体はアビセル、コーンファイバー、酸膨潤セルロースを分解した。これらの複合体はセルロソームに対して相補的に働くのではないかと考えられる。

セルロソーム酵素の sugar cane bagasse 分解に対する有効性を調べるため、XynA、ManA、EngEを大腸菌で発現精製し、それら単独および混合物の sugar cane bagasse、xylan、locust bean gum、carboxymethylcellulose (CMC) に対する活性を調べた。XynA:EngE:ManA を 25%:24%:50% の比率で混合することにより sugar cane bagasse に対する相乗的なセルロソーム酵素活性が得られた。sugar cane bagasse に対する XynA:EngE の最適比率は 75%:25%であった。これらの結果はセルロソーム酵素の最適な混合がバイオマス糖化に有用であることを示している。

ミニ骨格蛋白質のコヘシンの数がミニセルロソームの活性に影響を与えるかどうかを調べるため、コヘシンをそれぞれ1個、2個または4個含むミニ骨格蛋白質 CbpA を構築し、endoglucanase B (EngB)と混合し、活性に対する相乗効果がみられるかどうか解析した。興味深いことに、コヘシンの数が多いほど相乗的に活性が増加した。このことから、多くのコヘシンを持つ骨格蛋白質のターゲットサイトに酵素がより高濃度に配置されることにより、セルロソームの活性を促進することが示唆された。

(a)-2. スーパーセルラーゼの創製

(石川県立大学 熊谷英彦教授)

耐熱性のセルラーゼ類をさらに高耐熱性化、高活性化し、高温で効率よくセルロースを分解できるスーパーセルラーゼ類を創製することを目的として下記の研究を行った。

- i) 耐熱性カビ *Thermoascus aurantiacus* IFO9748 の β -グルコシダーゼ I の酵母での高発現と性質の解明 (Hong, J. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 80-88)。
- ii) 耐熱性カビ *T. aurantiacus* IFO9748 の β -グルコシダーゼ II の酵母での高発現と性質の解明ならびに有機溶媒による活性化機構の解明 (Hong, J. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 1331-133.)。
- iii) 耐熱性カビ *T. aurantiacus* の β -グルコシダーゼ I の結晶化と構造解析
- iv) 耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来 β -グルコシダーゼ (*KmBglI*) 遺伝子の取得と性質の解明 (Yoshida, E., et al. Structural Biology and Crystallization Communications 65:1190-1192.)。
- v) 耐熱性酵母 *K. marxianus* 由来の β -グルコシダーゼの結晶化と構造解析 (Yoshida, E., Biochem. J. [k2]:431:39-49 (本論文は、Nature Glycomics Gateway で紹介された))。
- vi) 耐熱性酵母 *K. marxianus* の耐熱性セルラーゼ類遺伝子発現株の分子育種 (Hong J., J. Biotechnol. 130, 114-123)。
- vii) 耐熱性や触媒活性向上のための変異導入技術の大腸菌におけるライゲーションフリー・ラ

ンダム変異導入法の開発 (Koyanagi, T., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 72, 1134-1137.)。

viii) 耐熱性カビ由来の β -グルコシダーゼを発現させた組み換え酵母 *K. marxianus* によるセロビオースからの効率的エタノール生産(学会発表予定)

ix) 耐熱性酵母を用いる糖化・発酵・蒸留連続システムの開発(特許出願中)

(a)-3. メタゲノム的手法によるバイオリファイナリー酵素の開発

(かずさDNA研究所 大石道夫所長)

i) 環境中の微生物ゲノムの効率的取得方法の開発

環境試料より効率的に微生物ゲノムを単離する方法と、それを用いて単離した環境 DNA を、Phi29 ポリメラーゼを用いて効率的に増幅する方法を確立した。

ii) 効率的平均化ライブラリー構築技術及び効率的な遺伝子取得技術の開発

縮退プライマーによるPCRを行う際に耐熱性 RecA を加えることにより、非特異的な増幅が劇的に抑制されることを示した。

セルラーゼを含んでいる糖質加水分解酵素ファミリー6、ファミリー9、ファミリー12、ファミリー45、ファミリー48 の遺伝子に対し CODEHOP 法による縮退プライマーを作製した。これを用いて耐熱性 RecA を添加した PCR を行うことで、微生物菌株より 10 個の既知糖質加水分解酵素と 42 個の新規糖質加水分解酵素の遺伝子断片をクローニングした。更に、環境サンプルとして、海底土壌及び堆肥よりそれぞれ約 50 種と約 10 種の新規糖質加水分解酵素の遺伝子断片をクローニングした。

得られた新規糖質加水分解酵素遺伝子の断片の情報を用い、微生物菌株より 8 個の遺伝子の全長を、堆肥より 37 個の遺伝子の全長を取得した。この他に、2 個の酸化還元酵素様遺伝子、2 個のキシラナーゼ様遺伝子、及び 2 個のエステラーゼ様遺伝子を持つオペロンのクローニングを行った。

iii) メタゲノムライブラリーの構築及びそれを用いた有用蛋白質の単離

環境試料から得られた 37 種のセルラーゼ様遺伝子から作られる 28 種の酵素は、平板培地を用いたセルラーゼアッセイにより、そのほとんどが活性をもつことが明らかになった。更に微生物株およびメタゲノムより得られた 29 個の新規糖質加水分解酵素に関して大腸菌での発現系を構築した。そのうち 10 個に関して発現を行い、SDS ポリアクリルアミドゲルを用いた活性染色により、これら酵素はセルラーゼ活性を有していることが明らかになった。次に糖質加水分解酵素 GH45 ファミリーに属する新規酵素を 3 個、GH6 ファミリーに属する新規酵素を 1 個精製し、セルラーゼ活性を生化学的に調べた。

7 個のメタゲノムライブラリーを作製した。

(論文発表:1件、学会発表:国際学会:2件;国内学会:7件)

(b) 人工セルロソーム触媒の開発

セルロソームは、セルラーゼ、キシラナーゼ等、多種類の多糖分解酵素が細胞表層で骨格蛋白質と高次構造複合体を形成することにより、高いセルロース分解活性を示すと考えられている。ところが、セルロソーム生産菌は、嫌気性細菌であり、培養条件の煩雑さや生育速度が遅いなど好気性細菌と比べ物質生産菌として不向きである。本研究では、この高機能糖化酵素の実用的な製造技術を確立することを目指し、有用工業微生物であるコリネ型細菌によるセルロソーム生産(人工セルロソーム)の基盤技術開発を行った。

コリネ型細菌には菌体外における蛋白質分解酵素の活性がほとんど検出されないことなどから、高効率な異種蛋白質分泌生産系の宿主としての可能性が期待される。これまで、amylase、nuclease、protease、transglutaminase、subtilisin-like serine protease、epidermal growth factor、green fluorescence protein、protein glutaminaseなどがコリネ型細菌における異種蛋白質の分泌例として挙げられる。コリネ型細菌の分泌蛋白質として知られている S-layer protein 2(PS2)の分泌シグナルを利用したセルロソーム構成成分分泌生産用プラスミドを構築し、コリネ型細菌に導入して、分泌生産が可能であるかを検証した。その結果、セルロソーム構成セルラーゼ、endoglucanase B(EngB) 遺伝子導入株の培養液中からザイモグラフにより該セルラーゼを検出した。一方、セルロソーム骨格たんぱく質の一部(ミニ骨格蛋白質、CbpA) 導入株の培養液中から、特異抗体を用いたウエスタン解析により、該蛋白質を検出した。

一方、コリネ型細菌における異種蛋白質発現分泌系の改良の基盤となる分泌シグナルの探索を行った。異種蛋白質の分泌に用いる分泌シグナルとして、コリネ型細菌の分泌蛋白質として知られるPS2の分泌シグナルが良く用いられてきたが、目的蛋白質によっては成熟型蛋白質の分泌が十分に観察されないことが報告されている。そこで我々は、コリネ型細菌(R株)の全ゲノム配列から、分泌シグナル予想ソフトSignalPを用いて、405個の予想分泌シグナルを抽出した。これらの予想分泌シグナルを *Geobacillus stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼに連結してコリネ型細菌に導入し、アミラーゼの分泌の検出により、分泌シグナルとして機能するか検証した。

405個の分泌候補シグナルによる分泌能の検証の結果、108個の分泌シグナルによるアミラーゼの分泌を確認した(うち106個は新規分泌シグナル)。Tat分泌経路欠損株を用いた解析や配列の特徴等によって、上記108個の分泌シグナル中、89個がSec型、11個がTat型、8個がLipo型シグナルであることが示唆された。同定された108個の分泌シグナル中、既知の分泌シグナルに対し分泌効率が優れているシグナルを同定するため、100 mLスケールで24時間培養し、分泌されるアミラーゼの活性を計測した。その結果、31シグナル(全て新規シグナル)で既知シグナル(PS2シグナル)を超える分泌効率を示した。このうちCgR0949シグナルはPS2シグナルに対して150倍以上高いアミラーゼ活性を示した(発表論文:Microbiology 155:741-750, 2009.)。得られた新規高効率分泌シグナルは green fluorescence protein(GFP)やセルロソーム構成セルラーゼ(EngBとEngL)の分泌においても、既知のPS2分泌シグナルと比較して、高い分泌能を示した。

また、高分泌能を示す変異株を取得し、新規分泌シグナルの利用等と合わせて、これまでのコリネ型細菌による異種蛋白質分泌量を大きく上回る高効率分泌システムを確立した。

(c) 高効率糖化プロセスの開発

ソフトバイオマス資源から糖類を生産する「酵素糖化プロセス」における、酵素コストの低減を目的として、“酵素再利用”による連続糖化プロセスを検討した。該プロセスは、バッチ糖化プロセスと比較して、“酵素再利用”による大幅な酵素コストの低減、と、生成糖の除去による生産物阻害の低減、が期待される。しかし、現有のバイオマス糖化プロセスについて“酵素再利用”による連続糖化プロセスの研究報告はほとんどなかった。我々は、リグニンを含まない上質古紙を対象として“酵素再利用”による連続糖化プロセスを確立し、酵素使用量の大幅削減によるコストダウンが可能となることを示していた。本プロジェクトでは、この技術をソフトバイオマスであるコーンストーパーおよびリグニン含有古紙に適用することを目指し、特に古紙原料からの混合糖製造に関する早期工業化に向けて開発を行った。

ソフトバイオマスを“酵素再利用”による連続糖化プロセスに適応すると、リグニンを含まない上質古紙の場合と比較して、リグニンが含有しているため糖化率の低下と未分解残渣への酵素吸着が観察された。このことより、以下の課題が挙げられる。

- ①糖化率の向上;ヘミセルロース分解酵素の増強
- ②酵素回収技術の確立;未分解残渣からの酵素の回収

本研究開発では、ソフトバイオマス資源としてリグニン含有古紙パルプを目的基質として市販酵素 (Genencor 社製、GC220) を用いた連続糖化プロセスを構築し、滞留時間や酵素濃度等の反応条件が糖化反応に与える影響を調べた。また、追加酵素として、*Clostridium* 属細菌が生産するセルロソームを用いて、各種基質に対する分解活性を評価し、目的とするソフトバイオマスに対して最適な酵素系を検討した。

“酵素再利用”による連続糖化プロセスに市販酵素を用いて、各種ソフトバイオマスの糖化を検討した。上質紙パルプでは糖化率 90%以上を維持したまま 1,200 時間の連続糖化を確認した。また、リグニン含有古紙パルプでは糖化率 80%を維持したまま、400 時間超の連続糖化を確認した。酵素の安定性については上質紙パルプにおける糖化反応では反応上清中に大部分の酵素が遊離していることが確認された。また、リグニン含有古紙パルプの場合には残渣の蓄積と共に遊離酵素の減少が認められ、未分解残渣からの酵素の回収が今後の課題である。本技術を確立することにより酵素再利用による酵素コストの低減が可能となり、ソフトバイオマスの糖化プロセスの工業化に有用と考えられる。

一方、セルロソームの糖化能を評価するため、各種セルロースを炭素源として用いて *Clostridium thermocellum* の培養を行った。得られた培養上清から回収したセルロソームのソフトバイオマスに対する糖化について市販酵素と比較した。難分解性の結晶性セルロース基質であるアビセルの場合は、同一酵素量においてセルロソームの方が市販酵素より 50%程度糖化率が高かった。

また、本研究開発のターゲット・バイオマスであるリグニン含有古紙パルプの糖化では、セルロソームは市販酵素より糖化率が 20%程度高いことが認められた。さらに、市販酵素と併用した場

合、反応初期の糖化速度が 40%程度向上する相乗効果が認められた。これらの結果から、セルロソームを添加酵素として利用することにより、糖化プロセスの効率化が可能であることが示唆された。

(2) 増殖非依存型バイオプロセスの開発

コリネ型細菌は還元条件下において増殖は停止するものの主要な代謝系は維持され機能する性質を持ち、さらに、この非増殖条件下では増殖状態よりも、細胞あたりの代謝活性が高く、より高い物質生産能力を有する。増殖非依存型バイオプロセスでは高濃度菌体による反応が可能のため高生産速度(高 STY)が期待でき、増殖に伴う副生成物が少ないことより目的生産物の分離・精製工程の効率化が可能となる。この増殖非依存型バイオプロセスの構築により、高度経済性を有するバイオリファイナーを実現するための基盤技術開発を行った。本開発は「(a) 増殖抑制下における細胞機能の統合的解明」、「(b) 基幹物質生産細胞の創製」、「(c) 糖からの各基幹物質製造プロセスの確立」の3つの研究項目より構成される。

コリネ型細菌における糖変換能向上のための基盤研究として、北海道大学に「(a)-2-5. *C. glutamicum* におけるピルビン酸キナーゼ活性変異株の取得と解析」を、東京工業大学に「(a)-5-4. コリネ型細菌 *C. glutamicum* の細胞増殖機構の解析」を再委託して実施した。

(a) 増殖抑制下における細胞機能の統合的解明

コリネ型細菌は古くからアミノ酸生産に用いられてきた有用工業微生物であるが、代謝工学的改変に必要な物質代謝に関わる細胞機能遺伝子に関する知見は非常に限られていた。そこで、増殖非依存型バイオプロセスの開発における代謝工学的改変の基盤情報として活用するため、コリネ型細菌の物質代謝に関する様々な細胞機能遺伝子について解析を行った。

(a)-1. 糖取り込み機構の解析

i) 糖取り込み系遺伝子の発現解析

ホスホエノールピルビン酸からのリン酸基の転移と共役した糖類取り込み系(PTS)は広く細菌に保存され、環境中の炭素源に応じた糖代謝調節機構において重要な役割を担うことが知られており、大腸菌や枯草菌ではその調節機構の解明が良く進んでいる。コリネ型細菌においても、PTS はグルコースやフルクトースなどの糖を取り込む主要経路であるが、その遺伝子発現制御機構や炭素源応答における役割はほとんどわかっていなかった。グルコース等の C6 糖はバイオプロセスの主な炭素源であることから PTS の機能・発現制御の解明はバイオプロセスの開発の基盤として重要である。

コリネ型細菌にはPTSを構成する因子として、全てのPTS糖取り込みに利用される細胞質共通PTS蛋白質である EnzymeI と HPr (それぞれ *ptsH*, *ptsI* にコードされる) が存在し、さらに糖特異的輸送蛋白質として それぞれグルコース、フルクトース、スクロースに特異的な EnzymeII (それぞれ *ptsG*, *ptsF*, *ptsS* にコードされる) と基質未知の EnzymeII が存在する。さらにコリネ型細菌

(R株)には β -グルコシド特異的な *pts* 遺伝子が存在する。しかし、これら *pts* 遺伝子の発現に関する報告はほとんどなかった。そこで本研究では *pts* 遺伝子の発現が PTS 糖の存在下でどのように制御されるのか解析した。

まず PTS 糖存在下と非存在下での発現をノザンブロットングで解析した。グルコース存在下で *ptsI*、*ptsH*、*ptsG* の発現が上昇した。フルクトース、スクロース存在下では全ての *pts* 遺伝子の発現誘導が観察された。また PTS 糖のなかではフルクトースが最も誘導効果が高かった。このことから PTS 糖の存在を感知し *pts* 遺伝子の発現制御につなげる機構の存在が示唆された。

次に転写制御機構の解明を行うため、それぞれの *pts* 遺伝子の転写開始点をプライマーエクステンション法で解析した。それぞれの *pts* 遺伝子の転写開始点上流にコリネ型細菌の-10、-35 配列に類似した配列が見出された。また、全てのプロモーター領域に TGTT(TTT)G の配列が見出された。

コリネ型細菌ゲノム上の *ptsI*、*ptsF* の遺伝子間に転写因子をコードすると推定される *fruR* が存在したので、この転写因子が *pts* 遺伝子の発現を制御している可能性を検討した。*fruR* 破壊株では、野生株と比較して、フルクトース存在下で *ptsI* と *fruR* 遺伝子の発現レベルが高いことが示された。このことおよび FruR が *ptsI*-*fruR* 遺伝子間に直接結合すること(後述)から FruR はフルクトース存在下で *ptsI*、*ptsF* オペロンの過剰な発現を抑制する因子として働くことが示唆された。また *fruR* 破壊の効果はフルクトース非存在下ではほとんど見られなかったことから PTS 糖非存在下で *pts* 遺伝子群を抑制する未知の転写因子の存在が予想された。これに関しては次節に報告する。

本研究により示された *pts* 遺伝子発現のフルクトース応答機構は大腸菌や枯草菌などのモデル微生物では知られておらず、コリネ型細菌がこれらモデル生物と異なる独自の *pts* 遺伝子発現制御機構を有することを示唆する。

以上の成果を論文として発表した(Microbiology 154:264-274, 2008.)。

ii) 転写因子 SugR による糖取り込み系遺伝子 *pts* の発現制御

前節の解析により、*pts* 遺伝子の発現が PTS 糖によって誘導されることが示された。このことから PTS 糖の存在で活性制御される転写因子の存在が示唆された。そこで、*pts* プロモーターに結合する蛋白質のアフィニティー精製を行ったところ、*ptsI*-*fruR* 遺伝子間領域に結合する約 28 kDa の 2 つの蛋白質を取得した。一つは前節に記述した FruR であり、もう一つは SugR と判明した。SugR は PTS 糖特異的輸送蛋白質遺伝子 (*ptsG*、*ptsF*、*ptsS*) の転写を抑制する因子として最近見出された。新たに *ptsI* プロモーターにより精製されたことから SugR が細胞質共通 PTS の発現も制御している可能性が考えられた。そこで *ptsI*、*ptsH* の発現を SugR が制御しているか検討した。RT-PCR による解析の結果、*sugR* 破壊株では PTS 糖非存在下において野生株のフルクトース存在下と比べても2倍以上の顕著な発現が観察された。*sugR* 破壊株をフルクトース存在下で培養すると *ptsI*、*ptsH* の発現は野生株の同条件と同程度になった。このことから SugR は *ptsI* と *ptsH* の発現を負に制御していることが明らかとなった。*sugR* 破壊株では PTS 糖存在下で発現が野生株の発現レベルまで低下したことは、FruR や他の未知の転写因子による制御によるものと考えられ

る。

DNase I フットプリンティング法により、SugR は *ptsI*-*fruR* 間 DNA に結合することが明らかとなった。SugR の結合する領域は *ptsI* のプロモーター領域と *fruR* 転写開始点下流に存在しており、この配置からも SugR が転写抑制因子として働くことが支持される。SugR の結合した領域には、TGTT(TTT)G の配列が繰り返して存在しており、これに変異を導入することにより、SugR の結合が抑制されることを、ゲルシフトアッセイにより確認した。この TGTT(TTT)G 配列は全ての *pts* 遺伝子のプロモーター領域に存在することから、SugR による制御のシス配列として機能すると考えられる。以上の結果から SugR が PTS 糖膜輸送蛋白質に加え、細胞質共通 PTS の発現も一括して制御するグローバルレギュレーターであることが明らかとなった。SugR を介した制御機構は大腸菌における Mlc を介した制御や枯草菌における GlcT を介した制御とは大きく異なることが示された。

以上の成果を論文上で発表した (Appl Microbiol Biotechnol 78:309-318. 2008.)。

iii) 第二の β -グルコシド PTS (*bglF2*) の同定および発現解析

我々は、コリネ型細菌(R株)には β -グルコシド特異的 PTS (*bglF*) が存在すること、その点変異導入によりセロビオースの取り込みが可能となること、を報告していた(2)。この *bglF* を欠損させても β -グルコシドの取り込みが観察されたことから、これとは別の β -グルコシド取り込み経路の存在が考えられた。ゲノム配列を検索したところ、*bglF* と相同性をもつ遺伝子 *bglF2* が見出された。*bglF*、*bglF2* 遺伝子それぞれ単独の破壊では β -グルコシドであるサリシンを単一炭素源とした生育に大きな影響は見られなかったのに対し、*bglF*、*bglF2* 二重破壊株は、同条件でほとんど生育できず、サリシン消費能は著しく低下することを確認した。このことから *bglF2* が β -グルコシド取り込みを行うことが示唆された。

bglF、*bglF2* 遺伝子と染色体上でそれぞれクラスターを形成する *bglG* と *bglG2* 遺伝子は転写アンチターミネーター様蛋白質をコードする。定量的 RT-PCR 解析により、*bglG* 破壊株と *bglG2* 破壊株では、それぞれ *bglF* と *bglF2* 遺伝子のサリシンによる発現誘導が消失することが示された。以上の結果、および、転写アンチターミネーターの認識配列 (RAT 配列) が *bglF* および *bglF2* 遺伝子上流域に存在することから、*bglF*、*bglF2* 遺伝子は転写アンチターミネーション機構により発現制御されていることが明らかとなった。さらに、*bglG* の破壊株で *bglF2* 発現が、*bglG2* の破壊株で *bglF* の発現がサリシンにより強く誘導されたことから、*BglG* と *BglG2* による制御システムのクロストークは存在しないことが示された。これまで他の細菌で報告されている多くのアンチターミネーション蛋白質は PTS からのリン酸化により活性制御されることが知られている。共通 PTS からのリン酸化を *ptsI* 変異株を用いて遮断することにより、*bgl* 遺伝子の発現誘導が消失したことから、コリネ型細菌における PTS からのリン酸化による制御機構の存在が示唆された。

以上の成果を論文として発表した (Microbiology 155:3652-3660. 2009.)。

iv) *bgl* 遺伝子のグルコース抑制機構の解析

多くの微生物において、グルコースによる他の炭素源取り込み・代謝遺伝子の発現阻害 (グル

コース抑制)が知られており、これにより代謝しやすい炭素源(グルコース)が優先的に利用される。バイオマス由来混合糖の効率的な同時利用技術の確立にはグルコース抑制機構の理解が重要である。前述の *bglF* と *bglF2* 遺伝子のグルコース感受性を、*lacZ* レポーター遺伝子との融合遺伝子の発現解析により調べたところ、*bglF* は強いグルコース抑制を受けるのに対して、*bglF2* はグルコース抑制に耐性を示すことが明らかとなった。*bglF* 遺伝子上流域の RAT 配列に変異を導入したところ (*bglF* Δ RAT-*lacZ*)、グルコース抑制が見られなくなった。このことはアンチターミネーションがグルコース抑制のターゲットであることを示唆している。さらに BglG アンチターミネーター蛋白質を plasmid により発現させた BglG 発現強化株ではグルコース抑制が観察されなかったことから、BglG のタンパク質発現量がグルコース抑制に対する感受性を決定する因子の一つであることが示された。*bglG* と *bglG2* 遺伝子の翻訳開始コドンと比較すると、*bglG2* の場合は効率的な翻訳開始の行われる ATG であるのに対して、*bglG* の場合は翻訳効率の低い GTG であった。そこで *bglG* と *bglG2* の翻訳開始コドンを入れ替え、その効果を観察した。その結果、*bglG* の翻訳開始コドンを ATG にして発現強化すると (*bglG*-ATG 株)、*bglF* 発現がグルコース抑制に耐性を示した。逆に *bglG2* の翻訳開始コドンを GTG にすると (*bglG2*-GTG 株)、*bglF2* の発現がグルコース存在条件下で強い抑制を受けた。以上の結果は、*bgl* の発現において転写アンチターミネーター蛋白質の翻訳効率がグルコース抑制に対する感受性を決める重要なファクターであることを示している。興味深いことに、グルコース抑制が弱まった *bglG*-ATG 株ではグルコースによる *bglF* の弱い発現誘導が観察された。BglF は PtsG ファミリーに属する糖輸送蛋白質であり、大腸菌においてはグルコース輸送能が示されている。コリネ型細菌 (R 株) では *ptsG* を破壊しても高いグルコース消費能が観察されるが、*ptsG*、*bglF* 二重破壊株ではグルコース消費が強く抑えられた。これに対して *ptsG*、*bglF2* 二重破壊株では *ptsG* 一重破壊株と同等のグルコース消費が観察された。このことは BglF がグルコース輸送能を有することを示している。通常、グルコース存在下では BglF の発現は強く抑制されるため機能しないと考えられるが、グルコース濃度低下条件や PtsG の発現低下条件下においては BglF を介したグルコース取り込みが行われる可能性がある。

以上の成果を論文として発表した(J Bacteriol 193:349-357. 2011.)。

(a)-2. 糖代謝調節機構の解析

(a)-2-1. 中央代謝系遺伝子・酵素の基礎解析

コリネ型細菌における糖代謝調節機構の基盤情報を得るため、解糖系酵素および TCA 経路の全遺伝子の転写単位を決定し、炭素源や増殖相に応じて、それぞれの代謝経路に関わる複数の酵素遺伝子群が協調した発現パターンを示すことを明らかにした (Microbiology 153:2190-2202. 2007.、J Mol Microbiol Biotechnol 15: 264-276. 2008.、Microbiology 154: 3073-3083. 2008.)。さらに、解糖系全酵素の精製・特性解析を行った。

(a)-2-2. 増殖非依存型バイオペロセスにおける網羅的遺伝子発現解析

増殖非依存型バイオペロセスにおける代謝調節機構の解明および後述する有用プロモーター

の探索を目的として DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。当研究室のゲノム解読により明らかにされたコリネ型細菌 (R 株) の全 3080 遺伝子(発表論文: Microbiology 153:1042-1058, 2007.)の内、3076 遺伝子(99.9%) の ORF を搭載した DNA マイクロアレイを構築した。好気増殖および増殖非依存型バイオプロセスにおけるコリネ型細菌の細胞それぞれから全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析および定量的 RT-PCR 解析を行った。その結果、好気増殖条件に比べ増殖非依存型バイオプロセス条件において、2 倍以上遺伝子発現比率が上昇している遺伝子が 161 個、1/2 以下に減少している遺伝子が 221 個確認された。これら発現が顕著に変化した遺伝子について NCBI COG (Clusters of Orthologous Groups) データベースにより機能別分類を行った結果、発現上昇した遺伝子では 161 遺伝子中 64 遺伝子が、減少した遺伝子では 221 遺伝子中 64 遺伝子が代謝関連遺伝子に分類された。

次に増殖非依存型バイオプロセスにおいて、糖代謝速度および有機酸生産能の増加が観察されることから、解糖系、アナプレロティック経路および TCA 経路の遺伝子について詳細な解析を行った。その結果、主要糖代謝酵素遺伝子 (*gapA*, *pgk*, *tpi*, *ppc*)、還元的 TCA 経路遺伝子の発現量の増加が観察され、また、対照的に、酸化 TCA 経路 (ピルビン酸→クエン酸→イソクエン酸→オキソグルタル酸→スクシニル CoA→コハク酸) の遺伝子発現量の減少が観察された。さらに、*gapA*, *pgk*, *tpi*, *ppc*, *ldhA*, *mdh* について好気増殖条件および増殖非依存型バイオプロセスにおける酵素活性について解析を行った結果、TPI と MDH 酵素の活性比率は、マイクロアレイ解析の結果よりも極めて高い値を示した。

また、還元条件下において、 H^+ -ATPase オペロン (*atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpD* および *atpC* 遺伝子) の遺伝子発現が好気増殖条件と比較して 1/2 から 1/4 のレベルに減少している事が確認された。これらの結果から、非増殖条件下において H^+ -ATPase 活性が減少することにより解糖系が強化されることが示唆された。このような現象は、 H^+ -ATPase 変異体を用いた大腸菌、枯草菌およびコリネ型細菌で報告されている。

増殖非依存型バイオプロセス条件下において 2 倍以上遺伝子発現上昇が認められた *gapA* オペロン、*ldhA* および *mdh* 遺伝子について培地中の溶存酸素濃度が遺伝子発現制御に与える影響について調べた。好気培養 4 時間後 (DO 6.9 p.p.m) に、通気を空気から窒素ガスに変えることにより嫌気状態 (DO 0.01 p.p.m 以下) にした細胞を用いて解析を行った。培養開始 5 時間後 (窒素通気開始 1 時間後) の遺伝子発現比率を定量的 RT-PCR により調べた結果、好気状態に比べ嫌気状態では窒素通気 1 時間後から全ての遺伝子において発現上昇が観察された。特に、*ldhA* 遺伝子の著しい発現上昇が観察され、窒素ガス通気直後より L-乳酸の生産も確認された。以上の結果から、増殖非依存型バイオプロセスにおけるこれらの遺伝子発現制御に、培養液中の溶存酸素濃度が関与する可能性が示唆された。

好気培養および還元条件の細胞を用いてプライマー伸長法により *gapA*, *ldhA* および *mdh* 遺伝子の転写開始点を決定した。その結果、これらの遺伝子の転写開始点は、好気増殖条件および非増殖条件下において同じであった。さらに上流配列の解析から、大腸菌の $\sigma 70$ プロモーターの共通配列との比較により-10 領域および-35 領域を推定した。

gapA, *ldhA* および *mdh* 遺伝子のプロモーター部位と *lacZ* 遺伝子の融合遺伝子を染色体に導入した株を用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定することにより発現の経時変化を調べた。その結果、好気培養の溶存酸素濃度が減少する定常期初期に、これらの遺伝子の発現上昇が観察された。また、この遺伝子発現レベルは還元条件に移行しても高い状態で維持されていた。

以上の成果を論文上で発表した (Microbiology 153: 2491-2504. 2007.)。

(a)-2-3. 解糖系酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子 (*gapA*) の発現制御機構

解糖系酵素の GAPDH は解糖系とペントースリン酸経路共通の代謝産物である glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) の酸化的リン酸化を触媒する酵素である。コリネ型細菌において、本酵素をコードする遺伝子 *gapA* は同じく解糖系酵素である、triose isomerase、phosphoglycerate kinase をコードする遺伝子 (*tpi* および *pgk*) とオペロンを形成していることから、このオペロンの発現調節はこの細菌の解糖系にとって非常に重要である。増殖非依存型バイオプロセス条件下でこのオペロンの発現が上昇することが明らかとなっており、また、GAPDH は反応産物である NADH によって阻害を受けることから、細胞内の酸化還元状態や糖代謝フローの調節に重要と考えられる。したがって、GAPDH 制御機構の解明は、増殖非依存型バイオプロセスにおける生産性向上のための基盤として重要である。本研究では、*gapA* の発現調節機構の解析を行った。

i) 転写因子 SugR による *gapA* 遺伝子発現制御

DNA アフィニティービーズにより *gapA* 遺伝子のプロモーター領域に結合する蛋白質を精製した。その結果、転写因子ホモログを 5 個取得した。得られた転写因子ホモログの 1 つ SugR は DeoR type の転写因子で、糖取り込み機構である PTS の構成因子すべての遺伝子の発現を糖非存在下で抑制することが我々を含め複数のグループから最近報告されている。ゲルシフトアッセイにより、SugR が *gapA* 遺伝子のプロモーター上の配列、TGTTTG、を認識して結合することを示した。次に、*sugR* 遺伝子欠損株における *gapA* 遺伝子の発現を調べた結果、糖非存在下において野生株よりも高いことを示した。このことから SugR が *gapA* 遺伝子の発現に対して抑制因子として機能していることが示された。異なる炭素源存在下での *gapA* 遺伝子の発現を調べたところ、酢酸やピルビン酸といった有機酸存在下においてはグルコース存在下と比較して *gapA* の発現は半分程度に減少していた。一方、フルクトースもしくはスクロース存在下における *gapA* 遺伝子の発現はグルコース存在下におけるレベルよりも高いことを見出した。これらの結果から、フルクトースもしくはスクロース特異的な代謝産物によって SugR による抑制効果が解除されると考えられた。

ゲルシフトアッセイによる SugR の DNA 結合解析の結果、SugR の *gapA* プロモーター領域への結合がフルクトースやスクロースの取り込みによって生じる fructose-1-phosphate (F-1-P) によって強く阻害されるとともに、糖代謝の中間産物である fructose-1,6-bisphosphate (F-1,6-P) によってもわずかに阻害を受けることを示した。フルクトース、スクロース特異的な中間代謝産物である

F-1-Pによって SugR の DNA 結合能が著しく阻害を受けることは、グルコース存在下よりもフルクトースやスクロース存在下における *gapA* の発現が高いことと一致している。グルコース存在下では SugR による抑制が F-1,6-P によってわずかながら解除され、フルクトース存在下では F-1-P によって抑制が完全に解除されると考えられる。SugR は PTS 遺伝子群全体の抑制因子として機能すること、および、これらの遺伝子のプロモーターへの結合が F-1-P や F-1,6-P によって阻害されることが明らかとなっている。以上のことから、SugR は糖非存在下において糖の取り込みと糖代謝両方の遺伝子発現における抑制因子として機能することが明らかとなった。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 81:291-301, 2008.)。

ii) LuxR type の転写因子 RamA による *gapA* の発現制御

前述の DNA アフィニティー精製により、*gapA* のプロモーター領域に LuxR type の転写因子 RamA が結合することが示された。RamA はグリオキシル酸経路の酵素および酢酸代謝に関わる酵素の発現活性化因子として同定され、*ramA* 遺伝子破壊株は酢酸を利用できないことが示されている。これまでに酢酸のトランスポーター、グリコーゲン代謝、エタノール代謝、TCA 経路といった様々な代謝経路から、細胞表層タンパク質や resuscitation factor などその他細胞機能に関与する蛋白質の発現活性化因子として機能することが報告されている。さらに、その遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析により、非常に多くの遺伝子発現を直接もしくは間接的に制御している主要なグローバルレギュレーターであることが近年分かってきた。RamA の DNA への結合に必要な認識配列として 5'-A/TG₍₄₋₆₎T/C-3'もしくは 5'-A/C₍₄₋₅₎A/G/T-3'が同定されているが、RamA が細胞内のどのようなシグナルを認識しているかは明らかとなっていない。

RamA が *gapA* の発現をどのように制御しているかを調べるために、*ramA* 遺伝子破壊株における *gapA* の発現を野生株と比較した。野生株では糖存在下において *gapA* の発現が対数期(3h)と比較して定常期入り口(6h)に 4 倍程度上昇するのに対し、非存在下では増殖相によらず変化がない。*ramA* 遺伝子破壊株では糖存在下の定常期入り口においても *gapA* の発現がほとんど上昇しなかった。その一方で非存在下の条件では野生株と大きく変わらない発現量を示した。これらの結果から RamA は糖存在下において *gapA* の発現を活性化することが示された。

gapA のプロモーター領域内の RamA の結合部位をゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティング法を用いて同定した結果、RamA は転写開始点から 84 bp、168 bp、198 bp 上流を中心とする3つの領域に結合することを見出した。これらの領域には RamA の認識配列である連続した G もしくは C が存在した。この G もしくは C を別の塩基と置換すると RamA の結合能が消失したことから、この配列を認識していることが明らかとなった。各 RamA 結合サイトに変異を導入したプロモーター活性を比較した結果、168 bp 上流に位置する結合サイト 2 が *gapA* の発現の活性化に最も深く関与していることが示された。また、一連のプロモーター活性の測定結果から RamA は炭素源に関わらず *gapA* の発現を活性化することが明らかとなった。

さらに、*ramA* 遺伝子破壊株においては前節で示した *gapA* 遺伝子の発現の抑制因子である SugR の発現が低下していることを見出した。これらの知見から RamA は直接的には *gapA* の発現

を活性化するが、抑制因子である SugR の発現を高めることで間接的に発現を抑えていることが明らかとなった。DNA アフィニティー精製では、さらに別の転写因子 GlxR が *gapA* プロモーター領域へ結合することを確認しているが、これが cAMP 依存的に *gapA* の発現を活性化することを明らかにしている(後述)。ここで示した各転写因子は自身の発現を抑制していることが報告されており、転写因子の発現レベルも複雑な制御を受けている。GapA が解糖系の流量制御だけではなく NAD の還元という細胞内の酸化還元バランスの調整にも寄与していることから、糖に応答する制御因子 SugR だけではなく、多様な細胞機能の発現制御に関与する RamA、GlxR というグローバルレギュレーターによって、他の代謝経路の遺伝子発現とのバランスをとりつつ発現が制御されていると考えられる。

以上の成果を論文として発表した(J Bacteriol 191:968-977. 2009.)。

(a)-2-4. 乳酸生成酵素 lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子 (*ldhA*) の発現制御機構

LDH は NADH を補酵素としてピルビン酸から乳酸への還元反応を触媒する酵素である。この酵素は大腸菌や枯草菌など多くの細菌に保存されており、細胞が低酸素濃度もしくは嫌気的な環境下におかれ好気呼吸が阻害された際に発現することが知られている。前述のとおり、増殖非依存型バイオプロセス条件(還元条件)下で *ldhA* の発現が上昇することが明らかとなっている。本条件では乳酸が主要な生成物であり、LDH は糖代謝によって生じた還元力(NADH)の再酸化による細胞内酸化還元バランスの調節に主要な役割を担っている。細胞内酸化還元バランスは増殖非依存型バイオプロセスにおける生産性を決定する主要な要素であり、その調節機構の解明は本プロセス開発の基盤として重要である。そこで、本研究では、*ldhA* の発現調節機構の解析を行った。

i) 転写因子 SugR による *ldhA* 発現制御

DNA アフィニティービーズにより *ldhA* 遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質を精製した。その結果、転写因子ホモログを3個取得した。このうち SugR は、前述のとおり糖非存在下において糖の取り込みと糖代謝両方の遺伝子発現における抑制因子として機能することが明らかとなっている。SugR によって *ldhA* の発現がどのように制御されているか、*sugR* 遺伝子破壊株を構築して解析した。グルコースを含む培地では、野生株における *ldhA* の発現は対数期でほとんど見られないが定常期入口において上昇した。グルコースを含まない培地では培養期間を通じて *ldhA* の発現はほぼ完全に抑制されていた。同条件で *sugR* 遺伝子破壊株における *ldhA* の発現を解析した結果、グルコースが存在する条件では対数期においても *ldhA* の発現がみられ、定常期入口で上昇し野生株よりも高い発現レベルを示した。グルコース非存在下では、培養期間を通じて *ldhA* の発現が検出された。これらの結果から SugR は *ldhA* 遺伝子の発現に対して抑制因子として機能していることが示された。

ゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティング法により、*ldhA* 遺伝子転写開始点のすぐ上流に位置する direct repeat (5'-CGGNCATAATCGGNCATAAT-3') が SugR の結合に必要で

あることが示された。この配列には我々とほぼ同時期に他のグループから報告された SugR の認識配列 5'-TCGGACA-3'が含まれていることもこの配列の重要性を支持するものである。結合サイトの位置から SugR が *ldhA* 遺伝子の転写開始を阻害することによって発現を抑制していると考えられる。

ゲルシフトアッセイによって SugR の *ldhA* のプロモーター領域への結合が fructose-1-phosphate によって強く阻害されるとともに fructose-1,6-bisphosphate によっても弱いながらも阻害されることが示された。また、フルクトース、スクロース存在下では *ldhA* 遺伝子の発現レベルがグルコース存在下におけるものより高いことを明らかにした。

一連の SugR による *ldhA* の制御機構は、前述した SugR によって制御を受ける他の遺伝子群のものと同様であることから、SugR は糖非存在下において糖の取り込みから糖代謝そしてその後の発酵まで、糖利用に関する代謝経路全体の抑制因子として機能することが明らかとなった。以上の成果を論文として発表した(*Appl Microbiol Biotechnol* 83:315-327, 2009.)。

ii) 転写因子 LldR による乳酸生成酵素 lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子 (*ldhA*) の発現制御機構

ldhA 遺伝子の発現に関与する新たな転写因子を同定する目的でトランスポゾンを用いて作成した突然変異株ライブラリーの中から、*ldhA* のプロモーター活性を指標に *ldhA* の発現が低下した株を取得した。複数の株においてトランスポゾンは *ldhA* 遺伝子に挿入されていたことから、LdhA が触媒する NADH 依存的なピルビン酸の L-乳酸への還元反応が *ldhA* 自身の発現制御に関与していることが考えられた。*ldhA* 遺伝子破壊株内で L 体ではなく D 体の乳酸を生成する別のタイプの LDH (D-LDH) を発現させても、*ldhA* の発現は回復しなかったことから、LdhA による L-乳酸の生成が *ldhA* の発現に重要であることが示された。

前述の DNA アフィニティー精製により、*ldhA* 遺伝子プロモーター領域に LldR が結合することが示されている。LldR は L-乳酸存在下で DNA 結合能が阻害される転写因子として報告されている。L-乳酸が *ldhA* 遺伝子の発現の活性化に必要であることから、LldR が *ldhA* 遺伝子の抑制因子として機能しており、*ldhA* 遺伝子破壊株では L-乳酸が生成されないため LldR による抑制が解除されず *ldhA* の発現が減少していることが考えられた。実際、*ldhA* 遺伝子破壊株内の *lldR* 遺伝子を破壊すると、*ldhA* の発現が野生株レベルまで回復したことから、推定どおり LldR が *ldhA* 遺伝子の転写抑制因子であることが示された。

SugR と LldR の2つの抑制因子がどのように *ldhA* の発現を制御しているか、*ldhA* プロモーター活性を指標に *ldhA* の発現レベルを野生株、各因子の遺伝子破壊株およびそれらの二重破壊株の間で比較を行なった。前節に示したように、野生株においては糖非存在下では *ldhA* の発現は抑制されている。そして、この抑制が SugR によるものであることが *sugR* 遺伝子破壊株の結果から分かる。*lldR* 遺伝子の単独破壊株は野生株と同様の *ldhA* の発現レベルを示した。*sugR* と *lldR* の二重遺伝子破壊株における *ldhA* の発現レベルは糖存在下では *sugR* 遺伝子破壊株と同程度であるが、非存在下では *sugR* 遺伝子破壊株よりも高いレベルを示した。LldR の欠損が単独では影

響しなかったのは、糖存在下では発現した LdhA によって生成された L-乳酸によって LldR の DNA 結合能がすでに阻害されており、抑制が緩和されているためと考えられる。また、糖非存在下で影響が見られなかったのは SugR による抑制効果が LldR より優位であるためと考えられる。これは *lldR* と *sugR* の二重遺伝子破壊株における *ldhA* の発現レベルが糖存在下では *sugR* 遺伝子破壊株と同程度であるのに対し、糖非存在下では *sugR* 単独破壊株のものよりも高いレベルを示したことによっても支持される。

ゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティング法により、LldR が *ldhA* プロモーター領域の -35 領域付近に結合することが示された。この領域には LldR の認識配列 (5'-TNGTNNACNA-3')(3)が含まれていた。SugR は *ldhA* プロモーターの -10 領域付近に結合することから、LldR より強く転写を抑制していることが考えられ、これは上記の二重遺伝子破壊株における *ldhA* の発現解析結果とも一致する。以上の知見から、*ldhA* は少なくとも 2 つの転写抑制因子 SugR と LldR によって制御されており、糖存在下生じる糖代謝産物に応じて SugR による *ldhA* の抑制が緩和され、その結果発現した LdhA によって生じる L-乳酸に応じて LldR による抑制が緩和されるという、2 段階の制御を受けていることが明らかとなった。このように *ldhA* の発現は自身の反応産物である L-乳酸および LldR を介した正のフィードバック制御を受けることが示された。本研究は微生物の LDH 遺伝子の中でこのような制御機構が働いていることを示した最初の例である。

LldR は L-乳酸を炭素源として利用するために働く乳酸デヒドロゲナーゼ Lld の発現抑制因子として同定された。培地中に L-乳酸が存在するとき LldR の DNA 結合能が阻害され Lld の抑制が解除される。Lld は LdhA と異なり NAD/NADH ではなく menaquinone/menaquinol を用いて L-乳酸の酸化を行なう。今回の結果をふまえるとコリネ型細菌は L-乳酸を生成する酵素 LdhA と利用する酵素 Lld の発現が同一の転写因子 LldR によって制御されていることになる。両方の酵素の発現が同時に脱抑制されるとすると、ピルビン酸と L-乳酸の間でサイクルが形成され、全体として NADH を用いて menaquinone の還元を行っていることになる。LDH が発現する微好気もしくは嫌気条件下では呼吸が阻害されるため、LDH を用いて解糖系より生じた NADH の再酸化を行なう必要がある。しかし、乳酸として炭素源をロスしてしまうため、同時に Lld の発現を高めることでピルビン酸を供給していると考えられる。このような自身の代謝産物を利用した酸化還元バランスの調節機構はバイオプロセスにおいても生産性を維持するために重要であると考えられる。

以上の成果を論文として発表した(J Bacteriol 191:4251-4258. 2009.)。

(a)-2-5. *C. glutamicum* におけるピルビン酸キナーゼ活性変異株の取得と解析 (北海道大学 横田篤教授)

Corynebacterium glutamicum は各種アミノ酸の工業的生産に用いられている産業上重要な細菌である。本研究では *C. glutamicum* のピルビン酸キナーゼ (PK) に着目した。この酵素の活性増減が本菌の糖代謝活性、代謝産物等におよぼす影響を明らかにし、高効率な糖変換技術の開発に資する基盤技術の提供を目的として研究を行なった。*C. glutamicum* ATCC 13032 から作

製した PK 欠失株と PK 過剰発現株をジャーファーメンターを用いて必須ビタミンであるビオチンを制限したグルタミン酸生産条件で培養を行ったところ、PK 欠失株では菌体あたりの糖消費速度が向上し、グルタミン酸生産量は野生株の 1.3 倍になった。PK 過剰発現株ではグルタミン酸生産量が 10%低下した。同様にビオチンを十分添加した培地で培養すると生育量が野生株と比べて PK 欠失株では 1.4 倍に増大し、PK 過剰発現株では 0.86 倍に低下した。これらの現象は PK 活性が変化しておこるホスホエノールピルビン酸の蓄積、および枯渇を調整するためにホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性が変化した結果であると考えられた。また、PK 欠失株の生育量増大を物質生産に応用するため PK 欠失株によるバイオプラスチック生産を行ったところ、菌体あたりの PHB 蓄積量が PK 欠失株において 1.7 倍に増大していた。

(a)-3. 遺伝子ネットワークの解析

(a)-3-1. グローバルレギュレーター GlxR の機能解析

大腸菌においては cAMP とそのレセプター蛋白質 CRP が糖代謝系遺伝子群の制御に重要な役割を担うことが知られている。コリネ型細菌における CRP type の転写因子 GlxR は cAMP 依存的に 5'-TGTGANNNNNTCACA-3' という DNA 配列に結合する。GlxR はグリオキシル酸経路の酵素 malate synthase をコードする *aceB* 遺伝子の発現抑制因子として同定されたのち、我々を含む複数のグループの研究結果から解糖系や TCA 経路といった中央代謝系をはじめ様々な細胞機能に関与する酵素遺伝子の発現制御に関与していることが示されている。コリネ型細菌のゲノム上の遺伝子上流域 215 箇所にも GlxR 結合配列とほぼ同様の配列が見出されている。大腸菌において cAMP はグルコース存在下で減少し、CRP の機能を抑制することでカタボライト遺伝子群の発現を抑える。一方、コリネ型細菌においてはグルコース存在下で cAMP 濃度が高まることが報告されているが、cAMP 濃度変化と GlxR の機能に相関が取れていない。また、cAMP 合成酵素遺伝子 *cyaB* の破壊株では cAMP 濃度が著しく減少するが、その生育は野生株とほとんど差がない。このように GlxR はその標的遺伝子は明らかになりつつあるが生体内でどのような環境もしくは細胞シグナルを感知し標的遺伝子の発現をどのように制御しているかは明らかとなっていない。

本研究では GlxR の生体内における DNA 結合領域を決定するとともにその生理的機能の解析を行った。ChIP-chip 解析により *in vivo* における GlxR の結合領域として 209 箇所を同定した。これらの領域には CRP と同様の保存配列が見出された。*in vitro* での DNA 結合実験および *in vivo* におけるプロモーターアッセイにより、GlxR は糖代謝、呼吸、細胞複製、ストレス応答に関与する遺伝子上流に cAMP 依存的に結合し、活性化因子として機能していることが示された。

(a)-3-2. 糖代謝遺伝子発現制御における RNA ポリメラーゼ σ 因子の役割

RNA ポリメラーゼの σ 因子はプロモーター配列の認識に関わるサブユニットであり、遺伝子発現の制御において重要な役割を果たしている。通常、細菌のゲノム上には σ 因子をコードする遺伝子が複数個存在し、それぞれが異なるプロモーター配列を認識する。細菌は複数の σ 因子を

使い分けることで、様々な環境条件下において特異的な遺伝子発現を可能にしている。コリネ型細菌のゲノム上には、7 個の σ 因子をコードする遺伝子 (*sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigM*) が存在するが、その機能に関する知見は限られている。

増殖非依存型バイオプロセスにおいては、糖代謝に関わるいくつかの遺伝子の発現量が増加する。この遺伝子発現制御機構の解明は、遺伝子発現レベルの最適化による糖代謝機能強化技術の重要な基盤となる。前述のトランスクリプトーム解析により *sigB* 遺伝子の発現量は、増殖非依存型バイオプロセス条件下において増加することを見出した。SigB はハウスキーピング遺伝子の転写に関わる SigA とアミノ酸配列の相同性が高く、これら 2 個の σ 因子はよく似たプロモーター配列を認識すると考えられているが、その生理的機能は良くわかっていない。グローバルな遺伝子発現制御に関わる σ 因子の還元条件下での転写制御における役割を解明するため、*sigB* 遺伝子欠損株を用いて SigB の機能解析を行った。

sigB 遺伝子欠損株は、好気条件下での増殖速度、グルコース消費速度に関しては野生株と違いはみられなかった。しかし、増殖非依存型バイオプロセス条件下における *sigB* 遺伝子欠損株のグルコースの消費速度は 3.3 ± 0.4 (mmol / h / g dry cells) であり、野生株 [4.3 ± 0.2 (mmol / h / g dry cells)] の約 75% に低下した。*sigB* 遺伝子欠損株に *sigB* 遺伝子を相補することでグルコース消費速度は野生株と同程度 [4.2 ± 0.2 (mmol / h / g dry cells)] にまで回復したことから、SigB は増殖非依存型バイオプロセス条件下においてグルコース代謝を活性化する機能を有することが明らかとなった。

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い、SigB が発現制御に関わる遺伝子の同定を行った。増殖非依存型バイオプロセス条件下 2 時間培養した野生株と *sigB* 遺伝子破壊株から RNA を抽出し、遺伝子発現プロファイルを比較した。*sigB* 遺伝子の不活性化により、45 個の遺伝子の転写産物量が 2 分の 1 以下に減少し、30 個の遺伝子の転写産物量が 2 倍以上に増加した。その中には様々な細胞機能に関わることが推定される遺伝子が含まれていたが、ほとんどは機能未知の遺伝子であった。SigB のグルコース代謝との関連を明らかにするため、増殖非依存型バイオプロセス条件下においてグルコースの代謝に関わると推定される 29 個の遺伝子に注目し、さらに解析を行った。定量的 RT-PCR により、グルコース代謝に関わる 9 個の遺伝子 (*pfkA*, *fba*, *tpi*, *gapA*, *pgk*, *eno*, *ppc*, *fum*, *pqo*) の転写産物量が *sigB* 遺伝子欠損株において減少していることが示された。2 分の 1 以下に転写産物量が減少した 2 個の遺伝子 *fba* と *gapA* に関して、それぞれがコードする酵素、fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の活性を測定した。FBA 活性は *sigB* 遺伝子欠損株においては野生株の 56% に低下し、GAPDH 活性は 70% に低下していた。さらに細胞内代謝中間体量を測定したところ、*sigB* 遺伝子欠損株においては FBA の基質となる fructose-1,6-bisphosphate (FBP) の細胞内濃度が 3 倍に増加していた。このことから、FBA 活性の低下がグルコース消費速度の低下の原因であると考え、FBA 活性増強株を作製した。*fba* 遺伝子を含むプラスミドを *sigB* 遺伝子欠損株に導入したところ、FBA 活性が約 4 倍に増強された。しかし、非増殖条件下でのグルコースの消費速度は *sigB* 遺伝子欠損株と変わらなかった。*sigB* 遺

伝子の不活性化により複数の解糖系遺伝子の発現が低下したことが、*sigB* 遺伝子欠損株のグルコース消費速度の低下の原因となっていると推測された。以上の結果から、SigB はグルコース代謝に関わる多くの遺伝子の発現を正に制御し、そして非増殖条件においてグルコース代謝を促進する機能を有することが明らかとなった。

解糖系遺伝子のプロモーター配列の解析を行い、SigB が認識するプロモーター配列を同定した。SigB による発現制御を受ける解糖系遺伝子のプロモーター配列のアライメントから、SigB が認識するプロモーター配列は-10 領域が tAnAAT、-35 領域が cgGCaa であると推定された。このプロモーター配列は SigA が認識すると考えられる配列と特に-35 領域において異なっており、SigB が SigA とは異なるプロモーター認識機構を有していることが示唆された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Environ Microbiol 74: 5146-5152, 2008.)。

(a)-3-3. 代謝遺伝子の機能および発現制御機構の解析

有用工業微生物であるコリネ型細菌の全ゲノム配列は 2003 年に公開され、その後、多くの研究グループが様々な細胞機能遺伝子に関する研究を進めており、全ゲノムレベルの遺伝子ネットワークに関する理解が急速に進んでいる。本プロジェクトでは、前述の糖代謝関連遺伝子の解析に加え、当研究室で決定したコリネ型細菌 (R 株) の全ゲノム配列とこれに基づくトランスクリプトーム解析を基盤として、物質代謝に関わる様々な遺伝子の機能および発現制御の解析を行った。

i) メチオニン合成系遺伝子群の発現制御機構

前述のトランスクリプトーム解析の結果からメチオニン合成系遺伝子の多くが増殖非依存型バイオプロセス条件下で高発現することに着目した。本プロセスにおける高効率有機酸生成には天然栄養源の添加を必要としない。RT-PCR 解析の結果、本プロセス条件におけるメチオニン合成系遺伝子群の高発現は主にメチオニン欠乏によることが示された。また、転写抑制因子 McbR の遺伝子欠損株における解析から、メチオニン欠乏による遺伝子発現の促進に McbR が関与することが示唆された。McbR の effector として報告されていた S-adenosylhomocysteine (SAH) に加え、S-adenosylmethionine (SAM) が McbR のメチオニン合成系遺伝子 (*metY*) プロモーター領域への結合に影響することを示し、細胞内における SAM と SAH のバランスに応じた転写制御機構の存在が示唆された。

(発表論文: Appl Microbiol Biotechnol 81: 505-513, 2008.)

ii) RNA ポリメラーゼ σ 因子 SigH の機能解析

RNA ポリメラーゼの σ 因子は、細胞内外の様々な環境変化に応じた遺伝子発現制御ネットワークにおいて重要な役割を担っている。コリネ型細菌のゲノムには 7 個の σ 因子をコードする遺伝子が存在しており、本プロジェクトでは、前述の SigB に加えて、ECF σ 因子をコードする SigH の機能解析を行った。様々な培養条件における *sigH* 遺伝子の発現解析の結果、ヒートショックにより転写産物量が増加することが示された。*sigH* 破壊株を用いてトランスクリプトーム解析を行い、

SigH の制御下にある遺伝子の同定を行った。その結果、広く細菌に保存されているヒートショック蛋白質 (HSP) 群に加え、様々な細胞機能に関する遺伝子を含む、45 個の遺伝子の発現制御に SigH が関与することが示唆された。HSP (分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼ) は蛋白質の quality control に重要な役割を担うと考えられる。HSP 遺伝子群の発現は特異的な2つの転写因子 HspR、HrcA とグローバルな役割を担う SigH により協調的に制御されることが示された。また、転写因子をコードする遺伝子 18 個が SigH の制御下にあることがわかり、複雑な転写制御ネットワークを形成することが示唆された。

(発表論文: J Bacteriol 191: 2964-2974. 2009.)

iii) レドックス応答性転写因子の解析

細菌では、細胞内酸化還元バランスの変化に応じた細胞機能調節に関わる様々なタイプの転写因子が知られている。しかしながら、コリネ型細菌のレドックス応答制御因子の報告はこれまでなかった。本研究では、コリネ型細菌の新規レドックス応答性転写因子 QorR による *qor2* (キノオキシドレダクターゼ) の制御機構を明らかにした。QorR は、DUF24 protein family に属する新規転写因子である。トランスクリプトーム解析により、QorR は *qor2* と *qorR* の発現を負に制御することが示された。また、ゲルシフトアッセイにより、*qor2* と *qorR* のそれぞれのプロモーター領域に QorR が結合することを確認した。*qor2* と *qorR* は、チオール基特異的な酸化剤であるジアミドによる発現誘導を受け、さらに QorR は酸化剤処理により 17 番目のシステイン残基を介して二量体化し、DNA 結合活性を失った。以上の結果より、QorR はレドックス応答性の転写因子であり、*qor2* の転写を制御することで酸化ストレス応答に関与していることが明らかとなった。QorR ホモログは多くの細菌に存在し、そのシステイン残基も保存されている。また、*qor2* と *qorR* の遺伝的編成、さらにはそれらのプロモーター領域にある QorR 結合配列も保存されている。このことから、多くの細菌において *qor2* の発現制御機構が保存されていることが示唆された。

また、転写因子 CyeR による *cye1* の制御機構を明らかにした。*cye1* 遺伝子にコードされる old yellow enzyme は細菌に広く保存されるフラビン蛋白質で酸化ストレス応答に関与することが示唆されているが、その機能の詳細は不明である。*cyeR* 遺伝子は染色体上で *cye1* オペロンの上流に位置し、逆向きに転写される。*cyeR* 破壊株における遺伝子発現解析により、CyeR は *cye1* オペロンと自身の遺伝子の発現の抑制因子として働くことが示された。また、ゲルシフトアッセイにより CyeR が *cyeR-cye1* 遺伝子間領域に結合し、その結合がジアミドおよび過酸化水素による酸化処理により阻害されることを示した。CyeR には 2 個のシステイン残基 (Cys-36、Cys-43) が存在し、前者をアラニンに置換しても DNA 結合活性に影響はみられなかったが、後者をアラニンおよびセリンに置換したところ DNA 結合活性が消失した。これらの結果から、CyeR はレドックス応答性転写因子であり、その活性制御に Cys-43 が必須であることが明らかとなった。

(発表論文: J Biol Chem 284: 16736-16742. 2009., Microbiology 156: 1335-1341. 2010.)

v) NAD *de novo* 生合成経路遺伝子群の発現制御機構

NAD は細胞代謝における様々な酸化還元反応の補酵素として働き、生命活動にとって重要な役割を担う。多くの細菌は、アスパラギン酸からの NAD *de novo* 生合成経路と、細胞外の NAD 誘導体取り込み利用経路を持ち、これらの経路が協調的に制御されることにより、細胞内 NAD 補酵素レベルが維持される。本研究では、コリネ型細菌における NAD *de novo* 生合成経路遺伝子群の発現解析を行った。NAD *de novo* 生合成経路遺伝子の *nadA* と *nadC* は、コリネ型細菌ゲノム上で、その他2つの遺伝子とクラスターを形成している (*ndnR-nadA-nadC-nadS*)。 *nadA*、 *nadC*、 *nadS* それぞれの遺伝子欠損株を作成し、それらが NAD 生合成前駆体として利用されるニコチン酸要求性を示すことを確認した。このクラスターの先頭に位置する *ndnR* がコードする NrtR タイプの転写因子は、比較ゲノム解析により NAD 生合成・分解・再利用サイクルの制御に関与する新規転写因子であることが、最近示唆されたが、細菌によりその制御下にある遺伝子が異なることが予想され、*in vivo* における役割は示されていない。 *ndnR* 破壊株における *nad* mRNA の発現および *ndnR* プロモーター活性の解析により、この NAD *de novo* 生合成遺伝子の発現がニコチン酸存在下で抑制され、NdnR が転写抑制因子としてその制御に必須の役割を担うことが示唆された。

(発表論文:Appl Environ Microbiol 76 : 5488-5495. 2010.)

vi) C4-ジカルボン酸輸送体の探索

TCA 経路の中間代謝物である C4-ジカルボン酸(コハク酸、リンゴ酸、フマル酸)は多くの細菌により炭素源やエネルギー源として利用され、その取り込みや排出、交換輸送に関与する様々なタイプの輸送体が報告されている。増殖非依存型バイオプロセスを行う還元条件では乳酸や酢酸とともにコハク酸が生成する。したがって、C4-ジカルボン酸の輸送機構に関する知見は本プロセスの開発における基盤情報として重要である。コリネ型細菌のゲノム配列には8個の該輸送体相同遺伝子が存在するが、それらの機能はわかっていなかった。これらの C4-ジカルボン酸輸送体相同遺伝子の破壊株を、トランスポゾンを用いて構築した遺伝子破壊株ライブラリーから選択し、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸を単一炭素源としたプレート培養を行った。その結果、これら C4-ジカルボン酸により生育できない株を見出した。この遺伝子産物(DcsT と名づけた)は、多様な細菌で C4-ジカルボン酸による好気生育に関与することが知られている DctA とは異なるタイプ、divalent anion/Na⁺ symporter (DASS)ファミリーに属する。コリネ型細菌野生株における C4-ジカルボン酸利用能は非常に低いが、*dcsT* の高発現により著しく向上することを示した。コリネ型細菌のゲノム上には、200 以上の各種輸送体様遺伝子が存在するが、その多くは機能がまだわかっていない。今後、これらの機能解析を進めることにより、コリネ型細菌における独特な代謝物輸送機構について理解が深まることが期待される。

(発表論文:Appl Environ Microbiol 74 : 5290-5296. 2008.)

以上、遺伝子ネットワークの解析により得られた、様々な遺伝子の機能および発現制御に関する知見は、今後の代謝解析研究などの発展とあわせ、コリネ型細菌の細胞機能制御機構の全容

解明に大きく貢献し、代謝工学の重要な基盤になると考えられる。

(a)-5. 細胞複製機構の解析

増殖非依存型バイオプロセスは、コリネ型細菌が増殖を停止しながら高い物質生産能を維持するという特性を利用している。そのメカニズムを理解し、これを他の微生物に応用するための基盤研究として、コリネ型細菌の細胞複製機構に関する遺伝子の探索を行った。

コリネ型細菌はグラム陽性細菌に分類される桿菌であるが、その細胞形態は一方の端が膨らんだ棍棒型であるのが特徴的である。また細胞分裂様式も独特であり、細胞中央から折れるようにして行われる(スナッピング)。しかしながら細胞形態を維持する細胞骨格蛋白質 MreB や細菌間に広く保存されている細胞分裂蛋白質 FtsA などと相同性のある蛋白質の遺伝子を有していない。これらのことから、コリネ型細菌はモデル微生物とは異なる細胞複製機構に関わる遺伝子を有していると考えられる。

(a)-5-1. SOS 応答時におけるコリネ型細菌の細胞分裂阻害機構の解析

SOS 応答は、染色体 DNA が損傷した際に DNA 修復遺伝子および細胞分裂阻害遺伝子を発現誘導する機構である。SOS 応答で誘導される遺伝子は SOS 遺伝子と呼ばれる。SOS 応答は細菌に広く保存され、DNA 修復遺伝子や DNA 損傷を感知する RecA、SOS 遺伝子を負に制御する LexA などは細菌間での相同性も高い。しかしながら細胞分裂阻害遺伝子は、DNA 修復が完了するまで細胞分裂を抑える働きをもつ重要な遺伝子であるにもかかわらず、大腸菌の *sulA*、枯草菌の *yneA*、*Mycobacterium tuberculosis* の *rv2719c* の 3 遺伝子しか明らかになっていない。各遺伝子がコードする蛋白質間の相同性は低く、それぞれの細胞分裂阻害機構も異なっている。これらのことから、コリネ型細菌が新規の細胞分裂阻害遺伝子を有することが予想された。

yneA と *rv2719c* は共に染色体上で *lexA* 遺伝子と隣接してコードされている。バイオインフォマテックス的手法により YneA と Rv2719c は膜貫通領域を持つと予想されている。コリネ型細菌(R株)では *lexA* 遺伝子と隣接して、機能未知遺伝子 *cgR1759* がコードされていた。CgR1759 は C 末端に YneA や Rv2719c と同じく膜貫通領域と予想される部位を持つが、その他の部分でのアミノ酸配列に相同性は見られなかった。CgR1759 ホモログは *C. glutamicum* ATCC13032、*C. efficiens* に存在しており、すべて *lexA* 遺伝子と隣接してコードされていた。

コリネ型細菌に DNA 損傷を引き起こす mitomycin C を処理し細胞形態を観察した。大腸菌や枯草菌では mitomycin C 処理により SOS 応答が誘導され、細胞がフィラメント状に伸長することが報告されている。mitomycin C を処理したコリネ型細菌野生株では未処理のものと比較して約 6 倍にまで伸長した細胞が観察された。これに対し *cgR1759* 欠損株および *recA* 欠損株では mitomycin C 処理を施しても細胞の伸長は見られなかった。次に SOS 応答による遺伝子発現誘導が見られるかを検討するため、mitomycin C を処理した野生株および *recA* 欠損株で Northern blot 法により *cgR1759* の発現を確認した。その結果、*cgR1759* は mitomycin C 処理した野生株での発現誘導は認められたが *recA* 欠損株では発現誘導されなかった。以上の結果より *cgR1759* は SOS 応答

で誘導される細胞分裂阻害遺伝子であることが示唆された。さらに、*recA* 欠損株および *cgR1759* 欠損株では mitomycin C への感受性が高まったことから、コリネ型細菌の *recA* 遺伝子および *cgR1759* 遺伝子は DNA 損傷時の生存にも寄与していることが示唆された。

大腸菌や枯草菌、*M. tuberculosis* では SOS 応答時に細胞分裂環である FtsZ ring の形成および隔壁形成が阻害されることが知られている。コリネ型細菌でも同様に SOS 応答時に FtsZ ring および隔壁の形成阻害が見られた。さらに CgR1759 過剰発現株では細胞伸長に加え、分岐や膨張した細胞が見られた。以上の結果より、CgR1759 は細胞分裂阻害能を持つ蛋白質であることが示された。

本研究により、コリネ型細菌における SOS 応答時に誘導される細胞分裂阻害遺伝子 *cgR1759* が明らかとなった。CgR1759 は既に報告されている SulA、YneA、Rv2719c とは異なる構造を持つ新規な蛋白質である。今後、CgR1759 の細胞分裂阻害機構を詳細に研究することにより、コリネ型細菌の細胞複製機構についてさらなる知見が得られることが期待される。

以上の成果を論文として発表した (Mol Microbiol 67: 597-608. 2007.)。

(a)-5-2. コリネ型細菌の細胞分離に関わる遺伝子群の解析

細胞分裂は、細胞中央での FtsZ ring 形成に始まり、隔壁の形成、それに続く隔壁の分解により細胞が分離されることで完了する。大腸菌や枯草菌などのモデル微生物では細胞の分離に関わる遺伝子が明らかにされてきているが、コリネ型細菌の細胞分離に関わる遺伝子についての報告はなかった。また、コリネ型細菌はスナッピングという独特の分裂様式をとることから、これに関わる新規の遺伝子を持つことが予想される。

大腸菌や枯草菌で細胞分離に異常が見られるものは、細胞伸長することが報告されている。そこで、コリネ型細菌 (R 株) の大規模ランダムゲノム削除法により得られた変異株の中から、細胞分離に異常が見られるものを顕微鏡観察により選別した。その結果、細胞が伸長し、内部に節のようなものが見られる変異株 RD41 を得た。RD41 は *cgR1595* から *cgR1604* までの 10 遺伝子を欠損していた。本形態異常の原因遺伝子を明らかにするため、*cgR1595* から *cgR1604* までの遺伝子を一つずつ RD41 に導入し細胞形態を観察したところ、*cgR1596* を導入した株でのみ細胞形態が野生型に戻ることが見出された。さらに *cgR1596* 単独欠損株でも RD41 と同様の細胞形態異常が観察されたことから、*cgR1596* がコリネ型細菌の細胞分離に関与することが示唆された。

CgR1596 は N 末端に細胞外分泌に関わるシグナル配列を持ち、C 末端には大腸菌や枯草菌の細胞分離に関わる細胞壁分解酵素によく保存されているドメイン (NlpC/P60 ドメイン) を有している。大腸菌や枯草菌では複数の細胞壁分解酵素が細胞分離に関わることから、コリネ型細菌における *cgR1596* 以外の細胞分離に関わる遺伝子を NlpC/P60 ドメインに着目して探索した。その結果、コリネ型細菌のゲノム配列から、CgR1596 の他に NlpC/P60 ドメインを持つ蛋白質 (CgR0802、CgR2069、CgR2070) をコードすると推測される遺伝子が 3 個見出された。これら 3 つの単独欠損株では細胞分離に異常は見られなかったが、CgR1596-CgR2070 二重欠損株では CgR1596 単独欠損株よりも重篤な細胞分離異常が認められた。以上の結果より、CgR1596 と CgR2070 がコリネ型

細菌の細胞分離に関わるタンパク質であり、CgR1596 が主要な役割を果たしていることが示唆された。

CgR2070 は CgR1596 と同様に N 末端に細胞外分泌シグナルを有していた。各シグナル配列と α -アミラーゼを融合させ細胞外分泌能を判定した結果、両シグナル配列とも機能することが示唆された。CgR1596 と CgR2070 の C 末端に myc-tag を融合させ、その局在部位を観察したところ、CgR1596 は細胞中央と細胞端に局在が認められた。しかしながら CgR2070 は局在が検出できなかった。以上の結果より、CgR1596 は細胞外に分泌された後に細胞中央の細胞分裂面に局在し細胞分離に関わることが示唆された。CgR2070 は細胞壁への結合力が弱いためにシグナルが検出できない可能性がある。

cgR1596 単独欠損株および *cgR1596 cgR2070* 二重欠損株を透過型電子顕微鏡で観察したところ、細胞内部に隔壁が多数観察された。以上の結果より、両遺伝子は確かにコリネ型細菌の細胞分離に関わることが示された。

本研究により、コリネ型細菌の細胞分離に関わる遺伝子が明らかとなった。本知見は、コリネ型細菌の細胞分裂機構と密接に関わるものであり、今後の研究によりスナッピングや他の細胞分裂蛋白質との相互作用などが明らかにされることが期待される。

以上の成果を論文として発表した (J Bacteriol 190: 8204-8214. 2008.)。

(a)-5-3. 硝酸存在下における嫌気増殖

増殖非依存型バイオプロセスは、還元条件下においてコリネ型細菌が増殖を停止しながら高い物質生産能を維持するという特性を利用している。該細菌の嫌気条件下における細胞増殖(停止)機構・代謝制御機構の解析により、増殖非依存型バイオプロセスの開発を進める上で有用な基盤情報が得られることが期待される。コリネ型細菌は一般的に好気性微生物と認識されており、嫌気条件下における細胞増殖や遺伝子発現制御に関する知見はほとんどなかった。一方、コリネ型細菌は分類学上、硝酸還元能を有することが知られている。また、近年明らかになった本菌の全ゲノム配列から、細菌に広く保存されている硝酸/亜硝酸トランスポーター NarK、膜結合型の硝酸還元酵素複合体 NarGHI に相同性の高い蛋白質群をコードする *narKGHJI* 遺伝子クラスターが認められた。そこで、我々はコリネ型細菌 (R 株) の嫌気条件下における硝酸呼吸による細胞増殖、硝酸呼吸に関与する *nar* オペロンの発現調節機構の解析を行い、さらに嫌気硝酸呼吸時のトランスクリプトーム解析を行った。

i) コリネ型細菌の硝酸呼吸に関与する *narKGHJI* オペロン

最小培地を用いて、硝酸塩存在下におけるコリネ型細菌 (R 株) の嫌気培養試験を行った結果、本菌が硝酸塩を電子受容体として嫌気的な生育(硝酸呼吸)を行う“通性嫌気性細菌”であることを明らかにした。また、*narG*、*narH* 遺伝子の破壊株を用いた解析により、これらの遺伝子が硝酸呼吸による生育に必須であることを示した。プライマー伸長法および定量的 RT-PCR 法を用いた *narKGHJI* 遺伝子領域の転写産物の解析結果から、*narKGHJI* 遺伝子群が *narK* を 5' 末端とする

単一のおペロンを形成し、同おペロンの発現が嫌気硝酸呼吸条件下において顕著に誘導されることを示した。

(発表論文:Appl Microbiol Biotechnol 75:889-897. 2007.)

ii) *nar* おペロンの新規転写抑制因子 ArnR の同定

narKGHJI おペロンのすぐ下流に位置する *arnR* 遺伝子がコードする ArnR (aerobic repressor of nitrate reductase R) による同おペロンの転写制御に注目した。アミノ酸配列比較解析から、ArnR は機能既知タンパク質と有意な相同性を示さなかった。*arnR* 欠損株 (Δ *arnR*) の硝酸還元能および *nar* おペロンの転写量の解析結果から、ArnR は好気条件下において *nar* おペロンの転写を抑制する転写因子であることが示唆された。嫌気硝酸呼吸条件下では、この ArnR による抑制が解除されることにより、*nar* おペロンの発現誘導が起こるものと考えられる。また DNA マイクロアレイを用いた Δ *arnR* 株の網羅的な遺伝子発現解析から、一酸化窒素 (NO) の解毒への関与が予想されるフラボヘモグロビンをコードする *hmp* 遺伝子の発現が、ArnR によって抑制されることを示した。ArnR タンパク質は、*nar* おペロンおよび *hmp* 遺伝子に加えて、自身をコードする *arnR* 遺伝子のプロモーター領域にも特異的に結合することから、これら3つの標的遺伝子の転写を直接的に制御することが明らかとなった。さらに、これら標的遺伝子のプロモーター領域内に存在するコンセンサス配列に ArnR が結合することを示した。

大腸菌や枯草菌では、嫌気条件下において *nar* おペロンを含む多数の嫌気代謝遺伝子の発現誘導に関わる転写因子 Fnr が知られている。Fnr は嫌気条件下で *nar* 遺伝子の転写促進因子として働くが、コリネ型細菌の ArnR は Fnr とは逆に好気条件下で転写抑制因子として働き、嫌気条件下における脱抑制により *nar* 遺伝子の発現が誘導されることが示唆され、構造・機能ともに Fnr とは異なる新規転写因子であることが示された。

(発表論文:J Bacteriol 190:3264-3273. 2008.)

iii) cAMP 依存性転写因子 GlxR による *nar* おペロンの発現制御

nar プロモーター領域の ArnR 結合サイトの upstream に、大腸菌においてカタボライト抑制に関与する CRP (cAMP receptor protein) のホモログである転写因子 GlxR が結合すると予想されるコンセンサス配列を見出した。まず、GlxR がこのコンセンサス配列に cAMP 依存的に結合することを確認した。*in vivo* において GlxR および cAMP が *nar* おペロンの転写制御に関与するかどうかを検討するために、*nar* プロモーター領域の GlxR 結合サイトへの変異導入の影響を β -galactosidase を発現レポーターとして評価した。その結果、好気および嫌気硝酸呼吸両条件下において、変異導入により、同プロモーター活性が顕著に低下することを認めた。*arnR* 欠損株においてもこの傾向は変わらなかった。次に、cAMP の合成に関与する *cyaB* 遺伝子の欠損による転写活性への影響を同様に評価した結果、好気および嫌気硝酸呼吸両条件下において、同プロモーター活性が顕著に低下した。以上の結果から、酸素またはレドックスに応答すると予想される ArnR の機能とは独立して、GlxR は *nar* おペロンの転写を cAMP 依存的に正に制御することを明らかにした。

「(2)(a)-3-1. グローバルレギュレーターGlxR の機能解析」で記したように、GlxR は中央代謝系や細胞複製を含む様々な細胞機能に関わる遺伝子の発現制御に関与するグローバルレギュレーターであり、大腸菌 CRP とは異なるコリネ型細菌独特の制御システムとして機能することが示唆されている。この cAMP-GlxR グローバル制御システムが嫌気代謝調節においてどのような役割を担っているのか、今後の解明が期待される。

(発表論文: Microbiology 157:21-28, 2011.)

iv) 嫌気硝酸呼吸時における遺伝子発現プロファイリング

嫌気硝酸呼吸時の遺伝子発現応答の全容を理解するために、トランスクリプトーム解析を行った。同条件下では好気条件下と比較して、80 個の遺伝子の発現が有意に上昇したのに対し、151 個の遺伝子の発現が低下した。硝酸呼吸 (*nar*) および *hmp* 遺伝子に加えて、炭素代謝、呼吸鎖コンポーネントを含む様々な細胞機能に関与する多数の遺伝子の発現変化を検出した。炭素代謝に関与する発酵性の L-乳酸脱水素酵素遺伝子 *ldhA* の発現上昇、TCA 経路遺伝子 (*gltA*, *icd*, *odhA*, *fum*) の発現低下を観察した。呼吸鎖コンポーネントについては、NADH 脱水素酵素遺伝子 *ndh* の発現低下、呼吸性の L-乳酸脱水素酵素遺伝子 *lldD* およびシトクロム *bd* オキシダーゼ遺伝子クラスター *cydABDC* の発現上昇を観察した。増殖非依存型バイオプロセスにおけるトランスクリプトーム解析の結果と同様、好気-嫌気代謝シフトが認められ、さらなる解析により本菌における嫌気応答システムの理解が深まることが期待される。

嫌気硝酸呼吸条件において、DNA 損傷に対するヌクレオチド除去・組換え修復、細胞分裂抑制、SOS 応答の発現制御に関与する“SOS 応答”遺伝子群の発現が誘導されることに着目した。本条件下において、SOS 応答の特徴である細胞分裂抑制因子の誘導による異常な細胞伸長も観察された。これらの転写および形態レベルの変化は、センサータンパク質として SOS 遺伝子群の転写活性化に関与する RecA をコードする *recA* 遺伝子の破壊株では観察されなかった。さらに、嫌気硝酸呼吸条件下における *recA* 破壊株の生存率が、野生株のそれと比較して著しく低下することを確認した。以上の結果から、RecA 依存的な SOS 応答が、嫌気硝酸呼吸条件下におけるコリネ型細菌の生存に重要な役割を果たしていることを示した。SOS 応答は、他の細菌において細胞壁ストレス、酸化ストレス、高圧等、様々な環境要因によって発動されることが知られているが、嫌気硝酸呼吸条件下における SOS 応答に関する報告は初めてであり、細菌における SOS 応答の新しい役割を示すものである。

(発表論文: J Bacteriol. (in press).)

(a)-5-4. コリネ型細菌 *C. glutamicum* の細胞増殖機構の解析

(東京工業大学 和地正明准教授)

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* には、グルタミン酸生産誘導処理のように細胞表層合成を阻害すると直ちに増殖を停止し、細胞の代謝を維持するという独特な細胞増殖の制御機構が存在する。本研究は、*C. glutamicum* の細胞増殖の停止を引き起こす要因を明らかにし、人

為的に本菌の増殖を制御する技術を開発することを目的とした。

C. glutamicum の増殖を抑制するような因子を見いだすために、ペニシリン処理した細胞のプロテオーム解析を行った。その結果、グルタミン酸生産におけるキー酵素である 2-oxoglutarate dehydrogenase の活性を阻害する OdhI タンパク質の発現がペニシリン処理により顕著に上昇することを見出した。*odhI* 遺伝子を多コピープラスミドにクローン化した OdhI 発現増強株はペニシリン誘導なしでも培養後期になるとグルタミン酸を生産した。この成果は「L-グルタミン酸の製造方法」として特許出願した(特願2007-330383)。OdhI のリン酸化部位である Thr-14 を Ala に置換した非リン酸化型 OdhI 変異体(OdhI-T14A)を発現誘導したところ、速やかに細胞増殖が抑制されることが確認された。これにより、IPTG 誘導により人為的に *C. glutamicum* の細胞増殖を抑制する系の開発に成功した。

(a)-6. 代謝産物のマテリアルバランスの解析／細胞内酸化還元状態の解析

基幹物質の高生産を目的とした代謝改変において、代謝改変の効果を細胞内代謝産物のレベルで解析し、その結果をさらなる代謝改変にフィードバックすることは迅速かつ効率的な生産菌の作出に必須である。従来の発酵法による物質生産では、目的とする生産物以外に細胞構造体等の増殖に必要な多種類の代謝産物が生成すること、さらにそれら代謝産物には微量なものも多数存在し、検出・定量が困難なことから代謝物を総合的に把握することは実質的に不可能であった。これに対して、増殖非依存型バイオプロセスによる物質生産は、目的の生産物の収率が発酵法と比較してはるかに高いという利点も加わり、細胞内外の代謝物の総合的な検出定量がはるかに容易かつ正確にできることから、代謝系の全容解明が可能となる。

そこで本研究では、代謝改変の効果を還元(非増殖)条件下のコリネ型細菌における細胞内代謝産物のレベルで解析することを目的とし、細胞内代謝産物をハイスループットかつ高感度、高精度で一斉定量可能となる分析系の開発を行った。

中央代謝系(解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 経路)の中間代謝産物は代謝が速いことからサンプリング時に菌体の代謝を瞬時に停止させること(クエンチング)、さらにその後細胞内代謝産物を効率よく抽出する必要がある。条件検討した結果、冷メタノールによるクエンチング、その後クロロホルムによる抽出を行うことにより高効率かつ再現性の高い抽出法が確立された。分離分析系には定量分析において感度、精度ともに優れている LC-MS/MS を採用した。標品を用いて分離系の確立を行い、イオンペア試薬を用いた逆相分離を行うことで測定対象化合物の分離に成功した。続いて MS/MS 分析条件の検討を行い、各化合物におけるイオン化条件の最適化、定量分析に用いるフラグメントイオンの選択を行った。各化合物の最適化測定条件をもとに MRM メソッドを作成し、メタボローム解析を可能とする一斉定量法を構築した。標品を用いて分析感度、精度を検証したところ、ほぼ全ての化合物において 0.5-100 pmol の間で再現性よく定量できることが明らかになった。

そこで実際にコリネ型細菌より水溶性代謝産物を抽出し、メタボローム解析を行ったところ、標品と同様の感度、精度で定量分析が可能であった。既に確立されているメタボローム分析法と比

較して、今回構築した分析法は解析対象化合物の種類、感度および精度、全てにおいて優れており、代謝改変による生産菌の作出に役立つことが期待された。

(b) 基幹物質生産細胞の創製

コリネ型細菌の物質代謝に関わる細胞機能解析により得られた知見に基づき、増殖非依存型バイオプロセスにおける生産性向上のための基盤要素技術開発として、糖代謝機能の強化、副生物代謝経路の抑制制御、代謝遺伝子の発現レベルの最適化などの研究課題に取り組んだ。確立した基盤要素技術を改良・統合して、有機酸、糖アルコール、アミノ酸、の各種化合物の高効率生成システムの構築を行った。

(b)-1. 代謝遺伝子の発現レベルの最適化

物質生産細胞の遺伝子発現レベルの最適化の検討を行う際に重要なツールとなる、ベクター系と誘導プロモーターの開発を行った。

i) コリネ型細菌におけるホスト・ベクターシステムの開発

コリネ型細菌を用いたバイオプロセスによる有用物質の高生産を達成するためには、代謝遺伝子を効率よく機能的に発現させるための遺伝子発現技術の開発やホスト・ベクターシステムの開発が必要不可欠である。いくつもの遺伝子を複数同時に発現させるためには目的遺伝子を導入したプラスミドベクターをコリネ型細菌に共存させる必要があり、そのためには複製起点と薬剤耐性マーカーがそれぞれ異なるベクターシリーズが必要となる。また、導入遺伝子の最適な発現レベルや活性レベルを維持するためには、ベクターのコピー数やプロモーターの強度により遺伝子の発現量を調整することが重要である。これらのことから、様々なコピー数、複製起点、薬剤耐性マーカーを持つコリネ型細菌のホスト・ベクターシステムの開発を行った。

これまでにコリネ型細菌において rolling circle 型のプラスミドである pBL1 ファミリーや pCG1 ファミリーのプラスミド、theta 型の pXZ10142 プラスミドファミリーが報告されている。コリネ型細菌のスクリーニングにより新規のプラスミドの単離を試みた結果、*Corynebacterium casei* JCM12072 株から pCASE1 プラスミドと、*C. glutamicum* ATCC14997 株から pCGR2 プラスミドの単離に成功した（発表論文：Appl Microbiol Biotechnol. 81:1107-1115. 2009.、Appl Microbiol Biotechnol. 87:1855-1866. 2010.）。系統学的分類により pCASE1 は theta 型の pXZ10142 プラスミドファミリーに属し、pCGR2 は rolling circle 型の pCG1 ファミリーに属することが明らかになった。またコピー数の測定の結果、pCASE1 は 11~20 コピー、pCGR2 は 4 コピーであった。さらにコピー数が 1 である pCG1 ファミリーに属する pBY503 の複製起点を新たに単離した。これらの結果、報告のある pBL1 プラスミド、pCG1 プラスミド、pCC1 プラスミドから取得した 3 種類の複製起点に加え、新規に pCASE1 プラスミド、pCGR2 プラスミド、pBY503 プラスミドの複製起点の単離に成功し、合計で 6 種類の異なる複製起点を持つベクターの作製に成功した。

耐性マーカーは Chloramphenicol、Kanamycin、Zeocin、Hygromycin、Erythromycin、

Streptomycin、Apramycin の 7 種類の薬剤耐性遺伝子を取得し、大腸菌の pBR322 複製起点と、コリネ型細菌の 6 種類の各複製起点のベクターにそれぞれ連結することで、複製起点と薬剤耐性マーカーの異なる合計 42 種類のシャトルベクターの作製に成功した。これらのシャトルベクターはいずれも共存可能であった。

また、コピー数の改変のため、antisense RNA によるコピー数制御に着目した。antisense RNA によるプラスミド複製制御はプラスミドのコピー数の決定要因の一つであることが知られている。antisense-RNA は、複製開始因子の発現の抑制因子として働くが、*Streptococcus* の pIP501 プラスミドで見られるような転写の減衰や大腸菌の R1 プラスミドで見られるような翻訳阻害など多様なメカニズムが知られている。antisense-RNA は、複製開始因子をコードする *rep* 遺伝子の 5' 非翻訳領域 leader region に逆向きにコードされ、相補する mRNA の leader 領域との相互作用により複製開始因子の発現を負に制御する。そこで、コリネ型細菌の pCGR2 と pCG1 プラスミドにおいて *rep* 遺伝子の leader 領域に antisense-RNA がコードされているかどうか検討した。両プラスミドは、それぞれ pCG1 family の中の異なる subfamily に属するが、いずれも antisense-RNA 遺伝子の存在は示されていなかった。RACE 法により、それぞれ 72 nt と 73 nt の antisense-RNA が発現していることを確認し、また、その上流に *rep* の ORF とオーバーラップしてプロモーターとして働くことが予想される配列が見出された。次に、それぞれ pCGR2 と pCG1 由来のシャトルベクターを構築し、antisense-RNA 遺伝子の推定プロモーター配列への変異導入の影響を調べた。その結果、Ribonuclease protection assay によって、それぞれ、antisense-RNA が検出され、プロモーター変異導入により、その発現が消失することを確認した。この antisense-RNA の消失に伴い、プラスミドのコピー数が 6-7 倍まで上昇した。さらに pCGR2 プラスミドの *rep* 遺伝子上流に位置する 2 つの遺伝子 *parA* と *parB* に着目した。これらは協調してプラスミド複製後の分配に関与すると推定される。antisense-RNA の発現阻害と *parB* の削除により、元のコピー数の 80 倍、200 コピーまでコピー数が増加したプラスミドが得られた(発表論文: Microbiology 156: 3609-3623.)。

この antisense-RNA と *par* 遺伝子の変異により、上記 7 種の薬剤耐性マーカーを導入した pCGR2 のハイコピーナンバープラスミドのシリーズを構築した。また、pCC1 の *repA* 遺伝子の 5'-UTP に変異を導入することで、コピー数が 300 コピーに増加することを見出し、これに基づいて、pCC1 のハイコピーナンバープラスミドのシリーズを構築した。

さらに、上記新規プラスミドにランダム変異を導入してスクリーニングを行い、温度感受性プラスミドを取得した。これを利用して、コリネ型細菌の複数の菌株の染色体組換えが可能であることを確認した。

ii) 誘導プロモーターの開発

コリネ型細菌でこれまでに遺伝子組換え技術に用いられたプロモーターは、コリネ型細菌プラスミド由来の配列やアミノ酸生合成系遺伝子のプロモーター等に限られる。これらは一般に恒常的に発現するタイプと考えられており、誘導発現が可能なプロモーターの報告例はほとんどない。このことから還元条件下で誘導可能なコリネ型細菌プロモーターの探索と機能解析を実施した。

トランスクリプトーム解析により、好気増殖条件と比較して増殖非依存型バイオプロセス条件下において高発現する遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子 (*lacZ*) を連結し、プロモーター活性の強度や誘導パターンを解析した。その結果、様々な強度や誘導パターンを持つプロモーターを取得した。また、トランスクリプトーム解析に基づき、 β -グルコシド、マルトース、グルコン酸により誘導するプロモーターを単離した(発表論文: Lett Appl Microbiol 50: 173-180. 2010.、J Bacteriol 193: 349-357. 2010.)。

さらに、大腸菌の *lacI* 制御系を利用した誘導プロモーターを開発した。

(b)-2. 増殖非依存型バイオプロセスにおける糖消費速度の向上

基幹物質生産性向上のためには糖代謝速度の向上が鍵となる。中でもグルコースはソフトバイオマスで最も多く含まれる糖源であることから、この代謝速度を上げることを重要課題として研究開発を行った。糖代謝遺伝子発現制御に関する知見から、糖消費速度が向上する遺伝子改変株が得られた。

(b)-3. 増殖非依存型バイオプロセスにおける酢酸生成経路の特定

発酵法等の既存のバイオプロセスにおいて一般的に、回収精製コストは、総コストの中で大きな割合を占める。この理由としては、目的産物の濃度が一般的にあまり高くは望めないこと、培地成分として天然栄養源が通常必要なことがあるが、特に副生物の種類、濃度が“相当なレベル”に達することがあげられる。

これに対し、増殖非依存型バイオプロセスでは、反応液組成に天然栄養源が不要であるというメリットは当然として、副生物の種類、量を極限まで低下させることが可能なことから、回収精製コストは大幅に低下する。更なる回収精製コストの低下を目指すためには、本プロセスにおいて主な副生物である酢酸生成を抑制させる必要があり、本研究では酢酸抑制に適した宿主作製のための基礎的知見として、コリネ型細菌の主要酢酸生成経路を特定した。

酢酸生成に関与する酵素遺伝子の特定

大腸菌や枯草菌、*Clostridium* 属等では既に酢酸代謝経路について報告がある。それらを参考に、コリネ型細菌における酢酸生成経路および関与する酵素(群)を推定した。その結果、ターゲットとなる酵素として、pyruvate:quinone oxidoreductase (PQO)、pyruvate dehydrogenase complex (PDHC)、phosphotransacetylase (PTA)、acetate kinase (ACK)、CoA-transferease (CTF) が挙げられた。PQO、PDHC、PTA、ACK に関しては、*C. glutamicum* ATCC13032 株で既に、各遺伝子 *pqo*、*aceE*、*pta*、*ack* についての機能に関する報告がみられ、R 株のゲノム配列中に 99%以上のアミノ酸相同性配列を示す遺伝子が 1 つずつ存在した。一方、CTF はコリネ型細菌における機能に関する報告はなく、機能が報告されている最も近種の菌株としては、同じグラム陽性細菌である *Clostridium kluyveri* の succinyl-CoA/CoA transferase が挙げられる。コリネ型細菌(R 株)中に、この遺伝子と配列上相同性のある遺伝子が 2 つ存在した(*ctfA*、*ctfB*)。

副生成物抑制株の構築

遺伝子工学的手法を用いてターゲットとなる遺伝子の破壊を行った。親株は、L-lactate dehydrogenase (LDH) 破壊株を使用した。作製した株について酵素活性測定により、ターゲットとなる酵素遺伝子が破壊されたことを確認した。作製した株を使用して増殖非依存型バイオプロセスを行い、グルコース添加 6 時間後の培養液中の酢酸濃度とグルコース濃度を定量した。各作製株のグルコース消費あたりの酢酸生成量から、各遺伝子破壊が酢酸生成に与える影響を調べた。

まず、ピルビン酸からの反応に関連する酵素、PQO および PDHC の遺伝子破壊が酢酸生成に与える影響を調べた。その結果、*pqo* 欠損株は親株と同程度の酢酸生成量であったのに対し、*aceE* 欠損株は、親株の 3% 程度量にまで抑えられた。*aceE* 欠損株に、さらに、*pqo* 破壊を重ねても更なる酢酸抑制がみられなかったことから、本条件下において、ほとんどの酢酸が、ピルビン酸からアセチル CoA を経由して生成されていることがわかった。

次に、アセチル CoA から酢酸への反応に関与する酵素である PTA、ACK および CTF の各遺伝子破壊が酢酸生成に与える影響を調べた。その結果、*pta-ack* 欠損株、*ctfActfB* 欠損株は親株と同程度の酢酸生成量であったのに対し、これらを同時に破壊した株、 $\Delta ctfA \Delta ctfB \Delta (pta-ack)$ 株では、酢酸が親株の 35% 量にまで減少した。すなわち、本条件下、コリネ型細菌では、PTA-ACK 経路と CTF 経路の両経路が酢酸生成に大きく関与することが示された。大腸菌では、アセチル CoA から酢酸経路が PTA-ACK の 1 経路だけであり、また、枯草菌においても、PTA-ACK 経路以外の経路も示唆されているものの、はっきりとその経路が知られていないことから、コリネ型細菌では、PTA-ACK 経路だけでなく、CTF 経路が主要経路であるという点で、これらの細菌と異なる可能性が示唆された。

さらに、機能未知の遺伝子 *ctfA*、*ctfB* のうち、どちらの遺伝子が酢酸生成に関与するのかを調べるために、 $\Delta ctfA \Delta (pta-ack)$ 株と $\Delta ctfB \Delta (pta-ack)$ 株との酢酸生成量を調べた。その結果、 $\Delta ctfB \Delta (pta-ack)$ 株は親株と同程度の生成量であったのに対し、 $\Delta ctfA \Delta (pta-ack)$ 株で $\Delta ctfA \Delta ctfB \Delta (pta-ack)$ 株と同様、親株の 35% 量にまで生成量が減少したことから、*ctfA*、*ctfB* のうち、*ctfA* が酢酸生成に関与していると考えられた。

以上の結果から、コリネ型細菌は、本条件下において、ピルビン酸から PDHC によりアセチル CoA を生成し、その後、PTA-ACK と CTF 両経路を介して、酢酸を生成することがわかった。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 77: 853-860. 2007.)。

(b)-4. D-乳酸生産細胞の創製

ポリ乳酸は、各国で食品包装材として利用が認可されたバイオマスプラスチックであるが、耐熱性が低いことから用途が限られている。その様な中、ポリ L-乳酸とポリ D-乳酸のステレオコンプレックス型ポリ乳酸が、高い熱安定性を有することが知られてきた。また乳酸は、年間 420 万トンの需要があるアクリル酸に、一段階の触媒反応によって変換可能であることが知られており、市場の大

きい基幹物質として可能性がある。そこで、高生産性(10 g/L/h 以上)の D-乳酸生産プロセスの構築を目的として、増殖非依存型バイオプロセスに用いるコリネ型細菌を代謝改変し、D-乳酸生産を検討した。

コリネ型細菌の L-lactate dehydrogenase 遺伝子(*ldhA*)欠損株にて、大腸菌、および *Lactobacillus delbrueckii* 由来の D-lactate dehydrogenase 遺伝子を発現した D-乳酸生産株を構築した。同遺伝子導入株の lactate dehydrogenase 活性を測定したところ、親株である D-lactate dehydrogenase 欠損株(Δ *ldhA*)では、その活性は認められなかったが、D-lactate dehydrogenase 遺伝子を導入した株では、lactate dehydrogenase 活性が検出され、導入遺伝子が機能していることを確認した。

続いて、これらの株の増殖非依存型バイオプロセスによるD-乳酸の生産試験を行い、株間のD-乳酸生産性を比較した。その結果、大腸菌由来のD-lactate dehydrogenase 遺伝子を導入した株(Δ *ldh/pCRB201*)よりも、乳酸菌由来の D-lactate dehydrogenase 遺伝子を導入した株(Δ *ldh/pCRB203*、 Δ *ldh/pCRB204*)の方が、高いD-乳酸生産性を示した。また、乳酸菌の D-lactate dehydrogenase 遺伝子導入株では、プロモーターの違いによって本酵素の発現量に差が認められたが、D-乳酸の生産性には顕著な差は認められなかった。従って、本条件下においては D-lactate dehydrogenase 発現量は充分であり、他の代謝系が D-乳酸生産の律速要因になっていることが示唆された。

次に乳酸菌の D-lactate dehydrogenase 遺伝子導入株を用い、高濃度の D-乳酸生産試験を行った。その結果、反応初期では 10g/L/h 以上の生産性にてD-乳酸が生成し、反応 24 時間時には、約 120 g/L の D-乳酸が生成されることが認められ、従来の D-乳酸生産株と比較しても、高生産性、高生産濃度であった。生産された D-乳酸の光学純度は、キラルカラムを装備したHPLCによって測定し、99.9%以上であることが認められた。

以上の成果を論文上で発表した(Appl Microbiol Biotechnol 78:449-454, 2008.)。

(b)-5. L-アラニン生産細胞の創製

L-アラニンは医療用の輸液や甘味料として使用されるアミノ酸の一種であり、これまでに微生物による L-アラニンの生産の方法が開発されてきた。生産方法は酵素法と発酵法の二つに大別される。酵素法の生産性は高いものの、基質が L-アスパラギン酸であること、発酵法は糖を原料に生産できるが増殖依存型の反応であり生産性が低いという問題点がある。我々が開発した増殖非依存型バイオプロセスは、糖を原料とし目的の基幹物質を高効率で生産することから、これらの問題点を解決することができると考えられる。

本研究では、増殖非依存型バイオプロセスでのアミノ酸生産の開発を目的とし、そのモデルケースとしてL-アラニン生産細胞の構築を行った。

コリネ型細菌に新たなアラニン生産経路を付与するため *Bacillus sphaericus* 由来の alanine dehydrogenase 遺伝子(以下 *alaD*とする)を *tac* プロモーター下流に連結したプラスミドを構築した。アラニンの生合成では、他のアミノ酸をアミノ基供与体として用いることが一般的であるが、該酵素

は、アンモニアをアミノ基供与体とするため効率的なアミノ酸生産に有効と思われる。構築したプラスミドを phosphoenolpyruvate carboxylase 遺伝子、lactate dehydrogenase 遺伝子、alanine racemase 遺伝子を破壊したコリネ型細菌に導入することで *alaD* 株を作製した。作製した *alaD* 株では、親株と比較してアラニン生産の向上が確認されたが、還元条件における糖消費速度が大きく低下した。該条件における糖代謝速度の律速因子として、NADH/NAD⁺のインバランスが考えられ、これを回避するために glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の高発現を試みた。GAPDH はグルコースの代謝過程で glyceraldehyde-3-phosphate を酸化する酵素であり、その反応において補酵素 NAD⁺を還元する。この反応により生成した NADH は GAPDH の反応阻害因子として作用することが知られており、NADH/NAD⁺ 比が糖代謝速度の制御に関与していることが明らかになっている。そこで、糖消費速度の改善を目的とし、*alaD* および *gapA* 遺伝子を高発現させた *alaD-gapA* 株を構築し、該菌株および *alaD* 株の L-アラニン生産を比較検討した。その結果、*alaD-gapA* 株は糖消費速度が向上し、*alaD* 導入株の約4倍のアラニン生産性を示した。アラニン生成条件における *alaD* 株、*alaD-gapA* 株の細胞内代謝物濃度を本プロジェクトにて開発された手法により定量分析した。その結果、*alaD-gapA* 株では、グリセルアルデヒド 3-リン酸の細胞内濃度が *alaD* 株と比較して半減していた。このことから、GAPDH を高発現することで細胞内の NADH/NAD⁺のインバランスが回避され、増殖非依存型バイオプロセスにおける糖消費速度、および L-アラニン生産性が向上したと考えられる。

さらに高生産速度(高 STY)の達成を目的に *alaD-gapA* 株を用いた増殖非依存型バイオプロセスによる高濃度の L-アラニン生産試験を行ったところ、最大生産性 10 g/L/h 以上、光学純度 99% のアラニン生産を確認した。また、これまでに報告されているバイオプロセスによる L-アラニン生産と比較して、非増殖・非通気条件である増殖非依存型バイオプロセスは、32 時間で最大生産量 104 g/L、最大生産速度 10.3 g/L/h と短時間に高濃度の L-アラニンを生産することができた。

以上の成果を論文上で発表した (Appl Microbiol Biotechnol 87:159-165, 2008.)。

(b)-6. キシリトール生産細胞の創製

キシリトールは、カロリーフリーな甘味料としての用途のほか、近年では、米国エネルギー省が選抜したバイオマスから製造の可能性がある有用物質トップ 12 に含まれるなど、各種化学製品の基幹物質として期待されている。現在キシリトールは、白樺などより単離したキシロースを水素化還元することで製造されている。この工程は非常に効率がよく、収率は約 99%である。しかし、該製造方法では、高度に精製されたキシロースを必要とし、製造コスト上昇の一因となっている。一方、微生物を用いたキシリトール製造法では、キシロースの精製が必要ないという利点を有するが、低生産性が工業化におけるハードルとなっている。微生物を利用した生産では、*Candida tropicalis* による研究が多い。*C. tropicalis* を使用した場合、キシリトール収率は、70-85 mol% xylitol / xylose、生産性は、cell recycle 法を用いた場合 12 g/L/h と報告されている。組換え微生物を使用した研究は、1991 年に Hallborn らにより報告された *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした研究を契機に、多くの研究が報告されている。組換え微生物を用いた場合、収率は理論収率

に近い値が報告されているが、生産性は2.5 g/L/h程度と低い。こうした背景から我々は、増殖非依存型バイオプロセスにおける高生産性キシリトール生産細胞の創製研究を行った。

コリネ型細菌に複数の微生物由来の xylose reductase (XR) 遺伝子を導入し、この中からコリネ型細菌に最も適した酵素遺伝子を選抜した。その結果、*Candida tenuis* 由来の XR 遺伝子が、最も高い活性を示した。該遺伝子を導入したコリネ型細菌株 (CtXR1) を用い、グルコースおよびキシロースを基質としたキシリトール生成を検討した。その結果、12 時間の反応により、3.5 g/L のキシリトールを生成した。

遺伝子組換えコリネ型細菌のキシリトール生産性の向上を目的に、①原料キシロースの取り込み強化、②細胞内酸化還元バランスの調整について検討した。①について、我々がこれまでに単離した新規アラビノーストランスポーター(AraE)は、アラビノースのみならず、キシロースの取り込み活性も示すことを明らかにしており、該アラビノーストランスポーター遺伝子を導入した組換え株を構築し、キシリトール生産性へ与える影響を検討した。②について、増殖非依存型バイオプロセスにおける主要な糖代謝物である乳酸生成の抑制、および NADH に対する反応性を高めた XR の利用を検討した。AraE 導入株(CtXR2)では、キシロース消費速度が顕著に上昇し、キシリトール最大生成速度が親株(CtXR1)と比較して、13 倍に向上した。次に CtXR2 の乳酸生成を抑制するために、*ldhA* 遺伝子を破壊し(CtXR3)、該菌株に NADH 高親和性 XR 変異体(K274R)を導入することで CtXR4 株を構築した。該菌株は、12 時間の反応により、26.5g/L のキシリトールを生成した。

キシリトールは、細菌の生育を阻害することが知られており、コリネ型細菌(R 株)においても、200 mM のキシリトールを含む最少培地では、生育速度が約 20%阻害された。キシリトールによる増殖阻害では、キシリトールリン酸の関与が知られており、該物質の生成には、大腸菌においてキシロキナーゼの関与が示されている。また、コリネ型細菌(R 株)においては、キシリトールの取り込みに PTS の関与が示されており、キシリトールの取り込みにともない、キシリトールリン酸の生成が推測される。これらの知見に基づき、CtXR4 のキシロキナーゼ遺伝子(*xyIB*)およびキシリトールの取り込みに関与する PTS fructose enzyme II (*ptsF*)遺伝子を破壊した CtXR7 株を構築した。該菌株は、CtXR4 株よりキシリトール最大生成速度が 1.6 倍向上した。そこで、該菌株を用いた高濃度キシリトール生成を検討した結果、最大生産性は目標とする STY 10 g/L/h を上回り、21 時間の反応により 166 g/L のキシリトールを生成することができた。この生産性は組換え微生物によるキシリトール生成において、最大の生産性であった。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 86: 1057-1066. 2010.)。

(b)-7. バリン生産細胞の創製

アミノ酸は、生物の成長に必要なタンパク質の原料であり、必須の栄養素である。アミノ酸の用途として、従来は栄養食品や医薬品など人に対するものが多かったが、近年は家畜用の飼料としての用途も増加傾向にある。今後人口の増加による世界のアミノ酸市場の拡大が予想され、アミノ酸製造法のコストダウンが求められている。

需要拡大が特に期待されているアミノ酸の一つとしてバリンが挙げられる。バリンはロイシン・イソロイシンと共に分岐鎖アミノ酸に分類され、高等動物には合成できない必須アミノ酸とされている。分岐鎖アミノ酸は蛋白質合成の素材として生体に不可欠であると共に、エネルギー源あるいは生体成分の前駆体として重要である。また、バリンには成長を促す働きがある他、血中の窒素の濃度調整機能を有し、輸液、サプリメントの原料として用いられている。現在、バリンは発酵法で生産されていることから、菌株の改良は重要な研究課題であり、高効率な製造法の確立によって安価で安定したバリン供給を行うことが期待される。

我々は増殖非依存型バイオプロセスによる基幹物質の生産を目的とした研究を進めており、本研究では当該プロセスにおけるアミノ酸群の生産の一環として、コリネ型細菌の代謝改変・有用遺伝子の付与によりバリン生産細胞の創製を行った。これまでに開発した要素技術を基盤として、改良を重ね、競合代謝経路遺伝子の破壊、バリン生合成経路遺伝子の発現最適化、フィードバック阻害の解除、アミノ基供与の効率化、細胞内酸化還元バランスの調整、解糖系強化等を行い、目標生産性を達成した。

(c) 糖からの各基幹物質の製造プロセスの確立

糖からの各基幹物質製造プロセスの開発では、主にコリネ型細菌を用いた増殖非依存型バイオプロセスに細胞を効率的に供給する、菌体触媒調製法の検討、および増殖非依存型バイオプロセスによって生産される基幹物質の回収精製法の検討を行った。

(3) トータルシステムの開発

バイオマスの有効利用のためには、通常、微生物が利用しやすいグルコースだけでなく、バイオマス由来の様々な C6 糖と C5 糖の混合糖を効率的に利用する必要がある。また、糖化過程で生じるフェノール類、フラン類、酸による発酵過程の阻害が大きな技術障壁となっている。本プロジェクトでは、これらバイオマス原料に由来する固有の研究開発課題に取り組んだ。

(a) 発酵阻害物質の耐性評価

酵素糖化を前提としたソフトバイオマスからの糖類生成では、高温・高圧による前処理が必要となるが、本処理過程では、バイオマスが過分解されアルデヒド類、フェノール類、および有機酸類などが副生成する。これらの糖類とともに発生する副生成物は、微生物に対し強力な増殖阻害作用を示す“発酵阻害物質”として、特に現在、セルロース系バイオマスからのエタノールの生産実用化における一つの障壁となっている。本プロジェクトにおける、ソフトバイオマスからの各種基幹物質生産の際にも同様に、発酵阻害物質によって、生産が阻害されることが考えられることから、増殖非依存型バイオプロセスに及ぼす該物質の影響について評価を行った。

供試菌株には、本プロジェクトを通じて利用しているコリネ型細菌のエタノール生産株をモデル株として用いた。該株を好気培養(触媒調製)し、得られた菌体を増殖非依存型バイオプロセスに供した。阻害の程度は、好気培養時は該株の増殖、増殖非依存型バイオプロセス時は物質の生

産速度にて評価した。

好気培養時には、furfural、5-hydroxymethylfurfural、4-hydroxybenzaldehyde、vanillin および syringaldehyde による増殖の阻害が認められた。一方で、増殖非依存型バイオプロセス時には、それぞれの物質に対して高い耐性を示し、同濃度の発酵阻害物質存在下において、エタノール生産微生物である酵母や大腸菌と比較して、コリネ型細菌を用いた増殖非依存型バイオプロセスは、高い耐性を有していることが認められた。増殖非依存型バイオプロセスが、ソフトバイオマス利用において、極めて実用的かつ新規性のある特性を有していることが示された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Environ Microbiol 73:2349-2353, 2007.)。

(b) ソフトバイオマス由来混合糖同時利用技術の開発

現在、エタノールをはじめとするバイオ燃料やバイオケミカルの原料は、コーンやサトウキビなどのデンプン系バイオマスが主に用いられているが、食料との競合や原料価格の高騰などの問題から不可食性資源の有効利用技術の開発が望まれている。特に、コーンストーバーや稲わら、バガスなどの農産廃棄物やスイッチグラスなどのエネルギー作物などのリグノセルロース系バイオマスが注目されている。ここにその一例として、コーンストーバーの組成を示した。セルロースに由来する glucose の他にもヘミセルロースに由来する xylose、galactose、mannose、arabinose など複数の糖類で構成される。C5 糖である xylose と arabinose は合計すると全体の 24% を占め、glucose について存在量が多いことから、リグノセルロース系バイオマスの有効利用を図る上で、生物的方法による効率的な xylose と arabinose 利用技術の開発が望まれている。また、リグノセルロース系バイオマスの利用技術においては、まずこれらの原料を C6 糖、C5 糖等単糖類への糖化分解が必要であるが、プロセス設計上、有機化合物産生培地にはこれら単糖類が共存することになる。しかしながら、バイオ燃料生産微生物として工業的に利用されている *Zymomonas* や *Saccharomyces* は、本来 C5 糖を利用できない。また、それらの株に C5 糖利用能を付与しても、glucose 存在下では glucose 抑制により、同時利用が出来なくなり、効率的な工業化利用技術確立の妨げとなっている。そのため、幅広い糖利用能を有する微生物の開発がリグノセルロース系バイオマスの工業的利用に向けた鍵となる。

そこで、本研究開発では物質生産に有用なコリネ型細菌の糖利用能拡大と、これを用いた増殖非依存型バイオプロセスによる C5 糖を含む混合糖の同時利用を検討した。

i) コリネ型細菌への xylose 利用能の付与

xylose 資化微生物では、2つの酵素 xylose isomerase (*xyIA* 遺伝子によりコード) と xylulokinase (*xyIB* 遺伝子) による 2段階の反応を経て、xylose をペントースリン酸経路の中間代謝物である D-xylulose-5-phosphate へと変換する。コリネ型細菌 (R株) のゲノム情報の解析により、現在データベースに登録されている他のコリネ型細菌と同様に、*xyIA* を持たないことを確認した。一方、R株のゲノム中には *xyIB* と高い相同性を示す ORF をひとつ確認した。これらの解析を基に、基礎的知見の多い大腸菌から *xyLAB* 両遺伝子をクローニングし、R株に導入して xylose 利用能を付与し

た組換え株を作製した。作製した組換え体は xylose を単一炭素源として増殖することを確認した。次に、glucose と xylose 混合糖液の利用を好気増殖と還元条件下(増殖非依存型バイオプロセス)でそれぞれ評価した。その結果、好気増殖では xylose の消費は glucose 消費期間中抑制されており、グルコース抑制がみられたが、非増殖条件では、このグルコース抑制は緩和され、glucose と xylose の同時消費による乳酸、コハク酸の生成が確認された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Environ Microbiol 72:3418-328. 2006.)。

ii) コリネ型細菌への arabinose 利用能の付与

リグノセルロース系バイオマス由来糖類の利用が可能な組換えコリネ型細菌の構築の一環として、arabinose 利用能付与を検討した。微生物における arabinose の代謝経路は、大腸菌や枯草菌で研究が進んでおり、arabinose は細胞内に取り込まれた後 L-arabinose isomerase (*araA* 遺伝子によりコード)によって、L-ribulose へ変換され、続いて L-ribulokinase (*araB* 遺伝子)によって L-ribulose-5-phosphate に、最後に L-ribulose-5 phosphate 4-epimerase (*araD* 遺伝子)によって、ペントースリン酸経路の中間代謝物である D-xylulose-5-phosphate に変換された後代謝されるが、既にゲノムが解読されているコリネ型細菌 (*C. glutamicum*, *C. efficiens*, *C. jeikeium*, *C. diphtheriae*)のいずれも、上記の3つの遺伝子を有していない。そこで、大腸菌の arabinose 代謝に関与する3つの遺伝子 *araA*, *araB*, *araD* により形成される *araBAD* オペロンをクローニングし、コリネ型細菌 (R 株)における発現系を構築した。作製した組換え株は arabinose を単一炭素源とする増殖が可能であることを確認した。組換え株を用いてリグノセルロース系バイオマスの組成に近似した glucose と arabinose を 5:1 の割合で含む混合糖を反応基質として、増殖非依存型バイオプロセスによる有機酸生成を評価した。その結果、arabinose は glucose の消費過程より消費され、arabinose は glucose 枯渇後も一定の速度で消費されて有機酸に変換されており、この組換えコリネ型細菌が arabinose を有機酸生成の基質として利用できること、また増殖非依存型バイオプロセスでは glucose と arabinose の同時利用が可能になることを明らかにした。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 77:1053-1062. 2008.)。

iii) コリネ型細菌の arabinose 代謝遺伝子の取得と機能解析

コリネ型細菌による arabinose 資化能についてはこれまで報告がなかった。我々は、*C. glutamicum* ATCC31831 株が arabinose 資化性を示すことを確認し、同株の arabinose 利用に関連した遺伝子の特定および、その機能解析を行なった。31831 株は arabinose を単一基質とした場合に、他の炭素源の場合と比較して効率的に増殖することを確認した。31831 株の染色体上の arabinose 代謝遺伝子群 *araBDA* を含む遺伝子クラスターの配列を決定した。

この *araBDA* 遺伝子の導入により、*C. glutamicum* R 株が arabinose 資化能を獲得することを確認した。さらに、arabinose transporter をコードすると予想された遺伝子 (*araE*) を染色体に導入することで、arabinose の利用能が向上することを明らかにした。

以上の成果を論文として発表した (Appl Environ Microbiol 75: 3419-3429. 2009.)。

iv) glucose、xylose、arabinose の 3 糖混合糖の同時利用

大腸菌由来の xylose 代謝酵素をコードする 2 つの遺伝子 *xyIA*、*xyIB*、arabinose 代謝酵素をコードする 3 つの遺伝子 *araA*、*araB*、*araD*、arabinose transporter 遺伝子 (*araE*) をコリネ型細菌 (R 株) の染色体に導入した株を作製した。構築した組換え株を用いてリグノセルロース系バイオマスの組成に近似した glucose、xylose、arabinose を 5:2.5:1 の割合で含む混合糖を反応基質として、増殖非依存型バイオプロセスによる有機酸生成を評価した。その結果、arabinose と xylose は glucose の消費過程より消費され、乳酸、コハク酸等が生成した。以上の結果から、この組換えコリネ型細菌を用いた増殖非依存型バイオプロセスにより arabinose と xylose を有機酸生成の基質として効率的に利用し、また、glucose、xylose、arabinose の 3 糖の完全同時利用が可能であることが示された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 85: 105-115. 2009.)。

v) mannose 利用能の向上と glucose との同時利用

マンノースはバイオマス構成糖の一つであり、特に、ハードバイオマスでは 20~30%含有することが報告されている。そこで、コリネ型細菌によるマンノース利用について検討した。

細菌におけるマンノースの取り込み系については、PTS による取り込みと非 PTS による取り込みが知られており、PTS の中でも、マンノース取り込み系として同定されたものだけでなく、グルコースやフルクトース PTS がマンノース取り込み能を持つ例が報告されている。PTS による取り込みではリン酸化との共役により mannose-6-phosphate として取り込まれ、mannose-6-phosphate isomerase により fructose-6-phosphate に変換されて解糖系に入る。一方、様々なタイプの非 PTS トランスポーターでの取り込みも知られるが、この場合は、hexokinase によりリン酸化されて mannose-6-phosphate が生成し、その後、解糖系へ入ると考えられている。mannose-6-phosphate isomerase をコードする遺伝子は大腸菌で同定され、その破壊により、マンノース利用能が消失することが報告されている。この遺伝子は広くバクテリアで保存されているため、マンノース代謝に共通の役割を持つと考えられている。コリネ型細菌のゲノム上でこの遺伝子のホモログが一つ存在していたため、まず、この遺伝子のマンノース利用への関与について検討した。

コリネ型細菌野生株によるマンノース利用能は著しく低い、マンノース代謝遺伝子ホモログ *manA* の破壊により、マンノースを単一炭素源として生育できなくなった。一方、*manA* の発現を強化した株ではマンノース利用能が著しく向上した。増殖非依存型バイオプロセス条件でマンノースの消費を調べた結果、野生株でマンノースの消費が確認されたが、*manA* 破壊株では、ほとんど消費されず、*manA* 強化株では、消費速度が向上した。これらの結果から、*manA* がコリネ型細菌のマンノース利用に関与することが示され、また、この強化がコリネ型細菌によるマンノース利用能の向上に非常に有効であることが示された。

次に、マンノースとグルコースの混合糖の利用について検討した。好気増殖における混合糖の

利用では、野生株でも、*manA* 強化株でも、グルコースが優先的に消費された後、マンノースが消費された。増殖非依存型バイオプロセスにおけるグルコースとマンノース混合糖の利用について調べた結果、好気増殖の場合と同様に、グルコースの優先的消費が観察された。そこで、グルコースとマンノースの同時利用を検討するため、まず、マンノース取り込みに関わる遺伝子の特定を試みた。

各種遺伝子破壊株のマンノースによる生育と増殖非依存型バイオプロセスにおけるマンノース消費速度を調べたところ、general PTSをコードする *ptsH* の破壊株ではマンノース消費がみられないことから、マンノースは PTS により取り込まれることが示唆された。*ptsG* の破壊ではマンノース消費速度は半分程度に低下し、これに *ptsF* の破壊を重ねた二重破壊株ではマンノース消費がみられなくなったことから、グルコース PTS である PtsG とフルクトース PTS である PtsF がマンノースの取り込みにも関与することが示唆された。*ptsF* 単独破壊株では、マンノース消費に影響はみられなかったことから、野生株では PtsG が主にマンノースの取り込み系として働き、PtsF は PtsG が働かない場合に機能すると考えられた。このことから、グルコースとマンノースの混合糖でグルコースが優先的に消費されるのは、両者の取り込み系として働く PtsG の性質に依存すると考えられた。そこで、マンノース取り込み能を持つことが示唆され、なおかつ、グルコースの取り込みには関与しないことがわかっている PtsF を強化することによって、グルコースとマンノースの同時利用が可能となるのではないかと考えた。実際、*ptsF* 高発現株では、好気増殖条件においても、増殖非依存型バイオプロセス条件においても、グルコースとマンノースが同時に消費されることが示された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 89: 1905-1916. 2011.)。

これまでの研究開発におけるコリネ型細菌の糖利用能の拡大により、バイオマス由来糖類のキシロース、アラビノース、セロビオース、マンノースの利用が可能となっている。本研究開発により、幅広いバイオマス原料からの各種有用化合物生産の実用化の鍵となる混合糖の完全同時利用技術が確立されたと考えられる。

(c) ソフトバイオマス由来混合糖からの物質生成

糖化工程での混合糖液による基幹物質生産への影響を把握するため、モデル糖液のグルコースとキシリトール混合糖からのキシリトール生産に対する基質の量比の影響を明らかにした。上記混合糖の同時利用技術により、キシリトールの生産性が著しく向上することを確認した。

また、モデル混合糖液からのバリン生産を行い、グルコース・キシロース・アラビノースを同時に消費してバリンを高い速度・収率で生産可能であることを確認した。この結果は、ソフトバイオマスを原料としたバリン生産プロセスの高い実現可能性を示すものといえる。

(d) 実糖化液からの D-乳酸の生成

トータルシステムの開発では、プラスコスケールレベル (基本的な反応条件の制御可能な機能

とする)にて、ソフトバイオマスを出発原料とした基幹物質生産までの一連実験がテーマとなっている。そこで、ソフトバイオマスの一つである古紙(脱墨パルプ)を糖化し、得られた糖化液から、基幹物質の一つであるD-乳酸の生産を行い、一連の評価を行った。その結果、増殖非依存型バイオプロセスにより実糖化液中のグルコースとキシロース等を含む混合糖が同時利用され、高効率でD-乳酸が生成することを確認した。

(4) ベンチプラントによる実証試験

本研究項目では、増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップの検討を実施した。バイオプロセスの実用化では、実験室レベルの成果を工業的規模の大規模発酵槽で安定的に再現するスケールアップ研究が、生産菌の育種と同様に重要である。コリネ型細菌によるアミノ酸発酵では、スケールアップにおいて、種々のパラメーター、例えば通気速度、攪拌速度、タンク内の圧力、原料糖の添加速度、pH、温度等が検討課題として挙げられるが、中でも通気・攪拌条件が生産性に大きな影響を与える因子と言われている。これは、酸素がコリネ型細菌の菌体増殖に不可欠な物質であることだけでなく、代謝の方向性を左右する因子となっているためである。また一般に、実験室レベルの通気条件を大型発酵槽で再現することは困難である。これは、発酵槽のサイズが大きくなればなるほど十分な攪拌が困難になり、層内が不均一な状態になるためである。従来の発酵法では、こうした複数の因子が混在する中で、最大の生産性が得られるプロセス条件を探索することになる。一方、増殖非依存型バイオプロセスでは、菌体増殖と物質生産反応が切り離されているため、スケールアップに伴う条件検討が従来の発酵法と比較して容易である。

本研究では増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップの検討を行った。10 L 容量のジャーファーメンターを用いて反応を行ったところ、フラスコスケールレベルと同等以上の生産性が得られた。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分	特許出願			論文		その他外部発表(プレス発表等)
	国内	外国	PCT*出願	査読付き	その他	
H18FY	2	0	0	15	9	90
H19FY	3	0	0	32	17	97
H20FY	1	3	1	21	10	73
H21FY	2	10	3	14	8	32
H22FY	0	0	0	25	10	22

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 3. 2 メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

2. 3. 2. 1 膜利用発酵リアクターの開発

(1) ラボ用膜利用発酵リアクター装置の設計

ラボ用膜利用発酵リアクター装置の開発に当たっては、装置組み立て、発酵試験ハンドリングを容易にするため、ラボ発酵装置(2L 容)内に、現在弊社が生物学的排水処理、河川水処理等の水処理に用いている PVDF(ポリフッ化ビニリデン)製精密ろ過(MF)平膜および中空糸膜を設置できるような膜エレメントを設計した。膜エレメントについては、次の6つの要求特性を満たすものを設計・試作した(図1、図2)。

- ①ラボ発酵装置に設置可能
- ②オートクレーブ可能(121℃、20分)
- ③MFろ過膜は機械的方法で脱着
- ④菌漏洩なし
- ⑤繰り返し利用可能
- ⑥取水に圧損のない構造



図1 平膜エレメント



図2 中空糸膜エレメント

この分離膜を用いた発酵リアクターを、膜利用発酵リアクター(MFR: Membrane-integrated Fermentation Reactor)とした。図3にラボ用膜利用発酵リアクターの概念図を示す。図中各部分は、1:発酵槽、2:分離膜エレメント、3:原料タンク、4:原料供給ポンプ、5:ろ過ポンプ、6:ろ過差圧計、および7:発酵路液タンクであり、分離膜エレメントで菌体を含む固液分離を行いながら、連続的に高効率で発酵生産可能な装置である(1)。

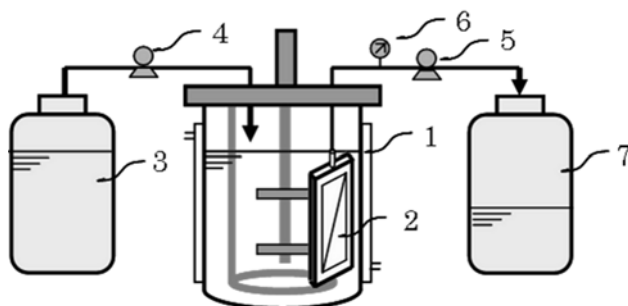


図3 膜利用発酵リアクター(ラボ用)

(2) ラボ用膜利用発酵リアクターによる有機酸連続発酵への適用

膜利用発酵リアクターによる連続発酵技術を確認するために、ピルビン酸発酵微生物 (*Torulopsis glabrata* NL2a株) を用い、連続発酵運転を行った。試作したラボ用 MFR 装置を用いて、連続発酵試験を行った。表1に平膜エレメントおよび中空糸膜エレメントを用いた連続発酵試験結果をまとめた。連続発酵により菌体濃度がバッチ発酵と比較して10倍程度に増加し、ピルビン酸生産速度がバッチ発酵の約4倍に向上することを確認した。発酵時間は500時間(約20日間)以上安定に運転可能であり、微生物の能力低下は観察されなかった。

表1 ピルビン酸発酵(バッチ発酵とMFR連続発酵の比較)

発酵形式	膜ユニット	発酵時間 (hr)	Na Pyruvate 収率 (w/w %)	STY (g/L/h)
バッチ発酵	—	66	65	1.0
連続発酵	平膜	300 以上	58	4.1
	中空糸	500 以上	52	5.1

(3) MFR のパイロット装置設計・導入

・装置構成

本装置の構成は、発酵原料を調整する原料調整槽、発酵原料を滅菌する原料滅菌槽、滅菌発酵原料を貯蔵するリザーバタンク、発酵生産を行う発酵槽、固液分離を行う分離膜モジュールで主に構成されるようデザインした(図4)。また運転は、装置ライン滅菌、原料滅菌、バッチ培養、ならびに連続培養の各工程をシーケンサーによって自動制御で行うことを前提にして、バルブ配置等を考慮に入れた設計とした。

それぞれの槽の配置に関しては、様々なデザインが可能であるが、メンテナンス時の利便を考

慮して、装置の前後からアクセスが容易なことが望ましい。検討の結果、それぞれの槽を一直線に配置したデザインとした。装置はスチール製フレーム上に固定し、用役(蒸気、圧縮空気、実験水、ドレイン)配管は、フレームの桁間を通した(図5)。

また MFR 装置の鍵となる分離膜モジュール部分については、様々な形式の分離膜モジュールを適用できるように、配管の取り回しはフレキシブルな構造とした。

・運転制御

連続発酵試験は装置の終夜運転を行うことから、自動制御による運転を行うことにした。制御法としては、シーケンサーによる自動制御法を採用した。運転制御を行うシーケンサーは、1)装置のライン、タンクの滅菌工程、2)発酵原料の滅菌、ならびに滅菌原料のリザーバタンク貯留、3)連続運転に供する微生物の前培養を行うための培地を滅菌する工程、4)発酵(バッチ、連続)の工程(発酵)、連続発酵を行うときの発酵槽～膜分離槽の培養液の循環、5)連続発酵時の発酵槽への原料の供給工程(流加)のそれぞれの工程を独立して稼働できるような設計とした。

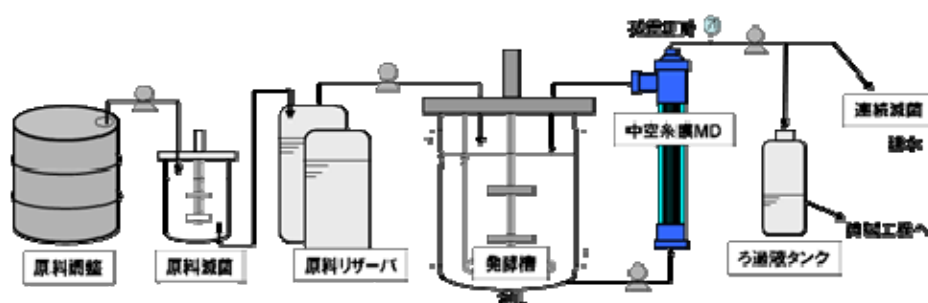


図4 MFR パイロット装置の概要



図5 MFR パイロット装置

(4) 膜利用発酵用分離膜モジュールの開発

これまで MF 膜を用いた分離膜モジュールは多種類開発されているが、発酵生産に適用できる大型モジュールが開発された例はない。MFR システムを工業的規模で実用化するためには、発酵生産用大型モジュールを開発する必要がある。そこで、分離膜モジュールの開発を進めた。モジュールは段階的にラボ用、パイロット用のスケールアップしたモジュールを設計、試作し、ラボ装置、パイロット装置に装着、D-乳酸連続発酵試験を行い、分離膜モジュールの改良を行った(図6)。これら、発酵試験で得られた知見から工業化用モジュールの基本的設計を完了し、試作を行った。分離膜モジュールの設計には、中空糸膜充填率、モジュール構造などは当社水処理の知見を応用して設計し、分離膜として、当社が開発した PVDF 耐熱性中空糸 MF 膜、筐体としてポリスルホン製を採用して、高圧蒸気滅菌可能で連続発酵に用いることができる。

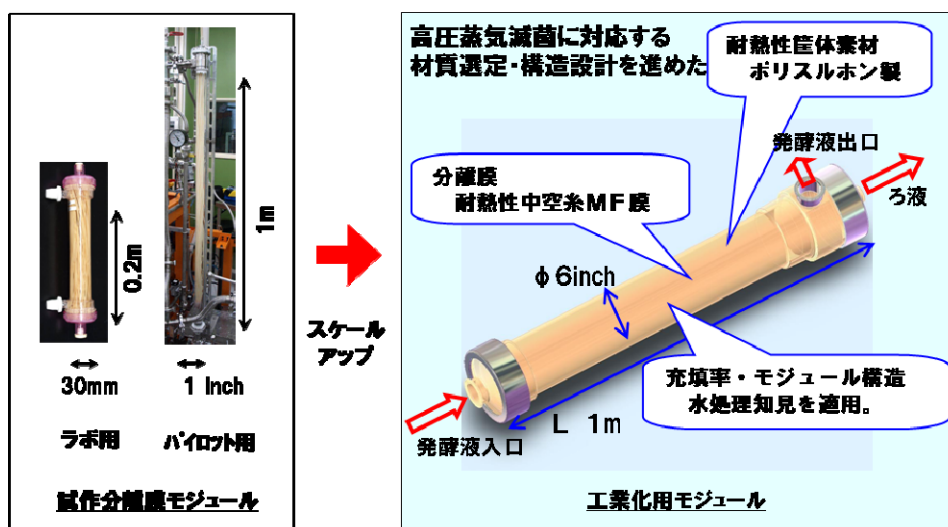


図6 MFR 用分離膜モジュールの開発

2. 3. 2. 2 D-乳酸製造用組換え酵母の創出

ポリ乳酸(PLA)はバイオプロセスで合成される代表的なバイオベースポリマーである。現在、ポリ L-乳酸(PLLA)が商業化されているものの、そのポリマー融点に課題がある。ポリ乳酸の融点向上には、原料となる乳酸の光学純度を高めることが有効であるが、更に D-乳酸を原料とするポリ D-乳酸(PDPLA)とPLPLAを混合してなるステレオコンプレックスPLA、ならびにそれぞれのブロック重縮合体であるステレオブロックPLAは耐熱性が著しく改善されることから(2)、市場の拡大が期待できる。また、これらステレオタイプ PLA においても、原料となる乳酸の光学純度が融点に影響を与えることが知られている。D-乳酸は、工業的な発酵生産は実施されていないが、D-乳酸生産微生物の探索などが進められており、生産性高い D-乳酸菌としては *Lactobacillus delbrueckii* などが知られているが、これまでに報告されているD-乳酸菌による乳酸発酵は、D-乳酸の対糖収率は高いものの、光学純度において課題がある。そこで、高光学純度でD-乳酸を産生するD-乳酸菌の開発に取り組んだ。更に、生産宿主として酵母を用いることとした。酵母は、乳酸の産生能力がないものの、乳酸のラセミ化能力がなく、高光学純度の D-乳酸を生産するポテンシャルを有する。高性能な D-乳酸脱水素酵素遺伝子を広くスクリーニングし、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に、導入してD-乳酸生産酵母の造成する検討を行った。

(1) 高性能D-乳酸菌の探索

ステレオコンプレックス PLA、あるいはステレオブロック PLA を製造するためには高い光学純度の D-乳酸を必要とする。そのため、D-乳酸連続発酵で、高光学純度 D-乳酸を生産するD-乳酸菌を適用することが重要である。そこで、自然界サンプルから D-乳酸菌のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果の一例を図7に示す。縦軸には対糖収率とD-乳酸光学純度を示し、横軸には候補 D-乳酸菌を示している。スクリーニングの結果、対糖収率 90%以上、光学純度 98%e.e.で

D-乳酸を生産するD-乳酸菌 *Sporolactobacillus laevolacticus* を獲得した。*S. laevolacticus* によるバッチ発酵を行ったところ、生産速度 0.5g/L/h、光学純度は 98%e.e.、対糖収率は 95%であった。

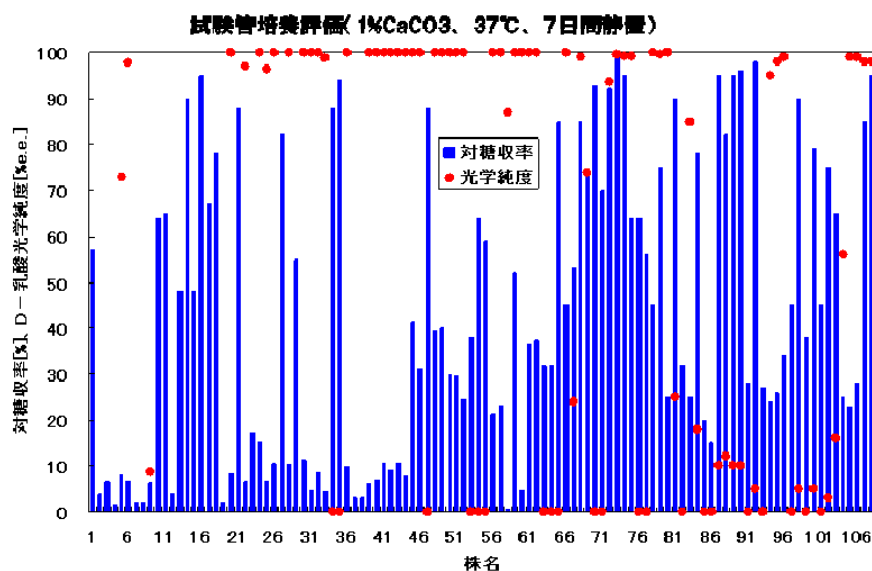


図7 高性能D-乳酸菌スクリーニング評価(評価結果の一部)

次に、獲得した *S. laevolacticus* を用いたラボ MFR 装置によるD-乳酸連続発酵を行った。バッチ発酵では生産速度が 0.5g/L/hであったのに対して、連続発酵を行うことにより生産速度を 11g/L/h まで大幅に向上した。また、光学純度は予想外にバッチ発酵では 98%e.e.であったのに対して、連続発酵を行うことにより 99.7%以上まで向上することを確認した。更なる効果として、低栄養源培地を用いても膜利用連続発酵では高生産速度及び高光学純度の D-乳酸生産が可能であった。バッチ発酵では栄養源として5g/Lの酵母エキスを加えることによって上記発酵成績を得たが、栄養源を低減させると、光学純度、生産速度、生産収率が低下した。一方、MFR による連続発酵では栄養源を実際に酵母エキスを 5g/L から 1g/L まで低減させても 11g/L・h の高い生産速度を維持でき、また 99.7%e.e.以上の高き光学純度を長時間にわたり維持可能であった(図 8)。

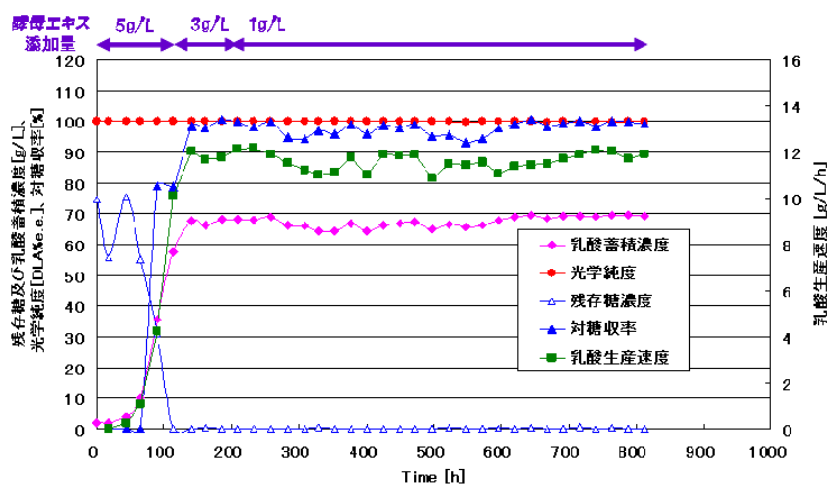


図8 *S. laevolacticus* による MFR 装置を用いた D-乳酸連続発酵

(2) D-乳酸発酵酵母育種における *D-LDH* の性能評価手法の開発

酵母を用いた D-乳酸生産を行う場合、様々な D-乳酸脱水素酵素遺伝子をクローニングして酵母に適した D-乳酸脱水素遺伝子 (*D-LDH*) をスクリーニングする必要がある。そこで、まず、適切な *D-LDH* を選択するための *D-LDH* の性能評価手法を開発した。手法開発には、これまでに報告されている L-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*L-LDH*) として L-乳酸菌 *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus sakei*、および *Pediococcus acidilactici* 由来の *L-LDH*、牛由来の *LDH-A*、*LDH-B* をクローニングし、これら遺伝子を用いて評価手法の有効性を検証した。*TDH3* プロモーター、ターミネーター間に MCS を挿入した発現カセット連結した *LDH* 性能評価用発現プラスミドを作製し、上記 *L-LDH* を酵母に導入し L-乳酸の対等収率を調べた。更に、それぞれの酵素の諸性質を調べ、乳酸の対等収率との関係を調べたところ、酵素のピルビン酸に対する基質親和性と L-乳酸の対等収率に相関があることが明らかになった。これらの結果より、ピルビン酸に対する基質親和性と D-乳酸の対等収率の相関を指標とした *D-LDH* の性能評価ができることを明らかにした。

(3) *S. laevolacticus* 由来 *D-LDH* の取得、評価

スクリーニングによって獲得した *S. laevolacticus* は高光学純度で D-乳酸を発酵生産できることから、*S. laevolacticus* 由来の *D-LDH* の性能が高いことが予想された。同細菌由来の新規 *D-LDH* のクローニングし、得られた *D-LDH* を開発した性能評価手法によって評価したところ、これまで知られている *Lactobacillus plantarum* ならびに *Pediococcus acidilactici* の *D-LDH* と比較して D-乳酸の対等収率が高いことが明らかになった (図9)。

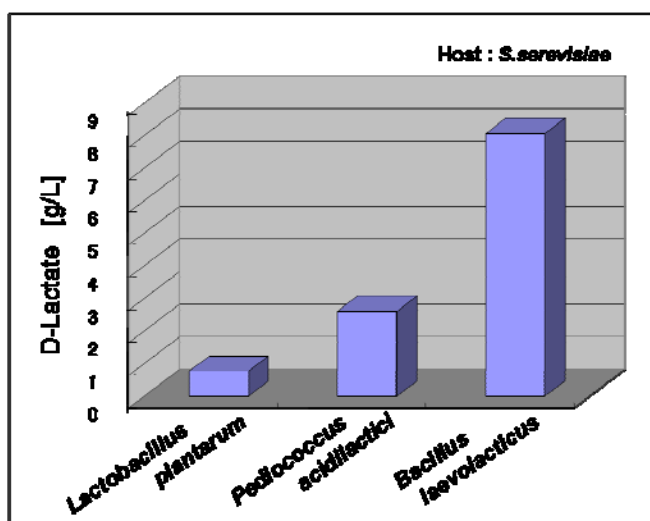


図9 *Bacillus laevolacticus* 由来 D-LDH の性能評価

(4) 酵母糖代謝経路の改変

酵母を用いたD-乳酸発酵を行う場合、副産物となるエタノール低減が課題となることから、酵母のエタノール発酵経路に関わる遺伝子の改変を行った。ターゲットとする遺伝子として、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子群(*PDC*)を改変した。これまでの報告では、酵母は *PDC*、あるいはアルコール脱水素酵素遺伝子群(*ADH*)を破壊し酵素活性を消失させるとグルコース培地上で、その生育が著しく低下することが知られている。従って、それぞれの酵素活性が低下した改変遺伝子の取得を行った。ピルビン酸脱炭酸酵素の活性低下変異の取得には *PDC5* をランダム変異法により温度感受性変異をスクリーニングすることで酵素活性低下遺伝子を取得した(図10)。それぞれの温度感受性変異の酵素活性を比較したところ野生型に対してピルビン酸脱炭酸酵素が1/3~1/5となった変異遺伝子 *pdc5^{ts}* を取得した(図11)。

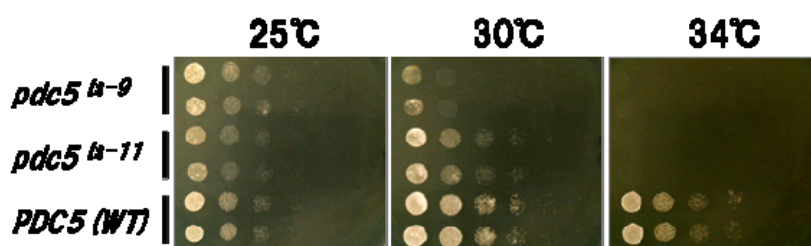


図10 *pdc5* 温度感受性変異の取得

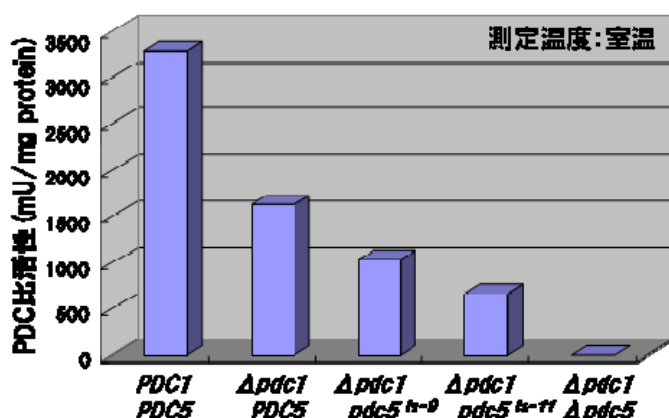


図11 酵母 *PDC5* のピルビン酸脱炭酸酵素活性比較

(5) 高性能 *D-LDH* の探索

高性能 *D-LDH* として、文献上で高いピルビン酸基質親和性を有するとされるアメリカカブトガニ由来の *D*-乳酸脱水素酵素 (表2) をコードする遺伝子クローニングを試みた。アメリカカブトガニ由来 *D-LDH* の核酸配列は知られておらず、タンパク質として単離・精製され、その存在が確認されているだけである。そこで、他生物由来の *D-LDH* において保存されている領域を参考にしたプライマーを用いて、cDNA ライブラリーからPCR法により *D-LDH* のクローニングを行った。その結果、二種類の遺伝子 (*D-LDH-1*、*D-LDH-2*) の取得に成功し、それぞれベクターに搭載した後、酵母に導入した。導入した遺伝子が高活性 *D*-乳酸脱水素酵素をコードしていることを、先に決定した性能評価手法によって評価を行った。その結果、*D-LDH-1*、*D-LDH-2* は、既にクローニングを行った *Sporolactobacillus laevolacticus* 由来 *D-LDH* 導入酵母よりも高い *D*-乳酸対糖収率を示すことがわかった (図12)。次に、得られたアメリカカブトガニ由来の二種類の *D*-乳酸脱水素酵素活性を測定した。活性は *D-LDH* を導入した酵母細胞の破碎液を用いることで行い、ピルビン酸および NADH に対する K_m 値を求めた。その結果、アメリカカブトガニ由来 *D-LDH-1* は既知の *D-LDH* よりも低い K_m 値を有していることがわかり、高活性を有する *D-LDH* であることを確認した。

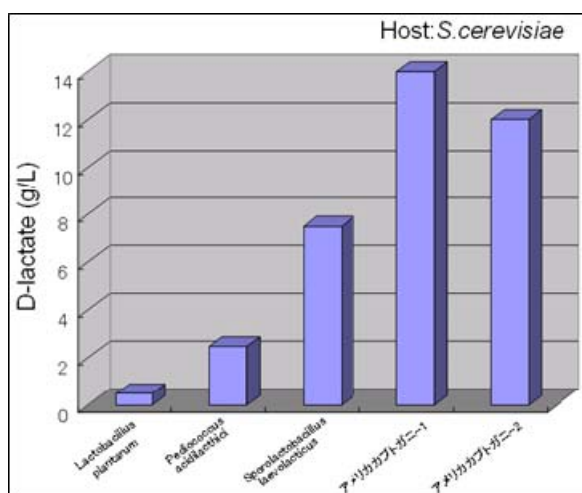


図12 アメリカカブトガニ由来 D-LDH の性能評価

次にエタノール発酵経路を抑制するためにピルビン酸脱炭酸酵素活性を低下させた変異 *pdc5^s* を導入し、D-乳酸生産性をさらに高めることに成功した。得られた酵母を用いてラボスケールにて膜利用連続培養を行ったところ、D-乳酸生産速度の大幅な向上を達成するとともに、D-乳酸収率が70%近くまで向上することがわかった。一方、連続培養途中でD-乳酸生産速度の低下が起きたことから、培養中のD-乳酸脱水素酵素活性を測定したところ、D-乳酸脱水素酵素活性の低下とD-乳酸生産速度の低下には相関があることが明らかとなった。

そこで、D-乳酸脱水素酵素活性を長期間維持可能な酵母へと改良を行った。D-乳酸生産速度の低下後のDNAチップ「3D-Gene Yeast Oligo chip 6k (出芽)」(http://www.3d-gene.com/products/pro_006.html)を用いて網羅的発現解析を行ったところ、複数の遺伝子が高発現していることが観察された。これら遺伝子のプロモーターを利用して *D-LDH-1* を発現させれば、長期間 D-乳酸発酵能力を維持可能な酵母を創出できるはずである。そこで、それらプロモーターのうち *SEDI* 遺伝子座に導入した酵母において連続培養中もD-乳酸脱水素酵素活性の低下しない酵母へと改良することに成功し、その結果、D-乳酸生産速度も高期間維持可能となった。また、*TDH3* 遺伝子座にも *D-LDH-1* を導入することで更なるD-乳酸脱水素酵素活性が増強でき、D-乳酸収率を90%まで向上した高性能D-乳酸発酵酵母を造成した。

(6) 膜利用発酵リアクターによる連続 D-乳酸発酵

育種したD-乳酸発酵酵母を用いてラボ MFR 装置によるD-乳酸連続発酵試験を行ったところ、STY10g/L/h、光学純度 99.9%e.e.以上、対糖収率90%で、700時間の連続発酵が可能であることを確認した。

次に、パイロット MFR 装置を用いてスケールアップ実証を行ったところ、*Bacillus Laevolacticus* では、STY11.2g/L/h、光学純度 99.7%e.e.以上、対糖収率95%で、800時間の、また、D-乳酸発酵酵母においては、STY10g/L/h、光学純度 99.9%e.e.以上、対糖収率90%で、700時間のそ

それぞれ連続発酵を可能であることを確認した。表5に、MFRによる上記パイロットMFR装置におけるD-乳酸連続発酵結果をまとめた。連続発酵の技術比較としては、工業化が可能であるかという比較が最も重要である。なぜなら、使用する膜面積を増やせば、生産速度は簡単に向上し、低速ろ過を行えば長期間の連続発酵も容易に実現するからである。そこで、新たに膜当たりの生産性という指標により技術の比較をおこなったところ、MFR技術は膜当たりの生産性が、従来技術(4, 5, 6, 7, 8)の10倍程度に達した。すなわち、MFRは従来の技術と比較して1/10の分離膜で高い生産性が得られることを意味していることから、コンパクトな連続発酵設備が実現し、工業化プロセス構築可能性が高いことを示している。

表2 D-乳酸連続発酵結果

微生物種	発酵方式	光学純度 (%e.e.)	収率 (%)	生産速度 (g/L·h)	膜当たり生産性 (g/cm ²)	連続発酵時間 (h)
乳酸菌	バッチ	99.0	95	0.5	—	800
	MFR	99.8	95	11.2	112	
組換え酵母	バッチ	99.9<	75	1.0	—	1000
	MFR	99.9<	90	10.0	87.5	

2.3.2.3 高選択性分離膜を組み込んだダウンストリーム開発

上述したように、PLA樹脂の高機能化(高耐熱性)には、PLLAならびにPDLAから構成される、ステレオコンプレックスPLA、およびステレオブロックPLAの実用化が望まれている。これら高機能化PLAを得るには原料となる乳酸の高い光学純度はもちろん、高いケミカル純度が重要であるが、乳酸発酵液には、発酵菌由来の多種多様な不純物が含まれており、これら不純物を効率的に分離精製可能な技術が望まれている。更に、D-乳酸発酵液に含まれるD-乳酸は高々10(w/w)%程度であり、その濃縮、すなわち水分除去には多大なエネルギーを投入しており、乳酸製造コスト増の大きな要因になっている上、プロセスから排出されるGHGも大きく環境負荷の大きい工程であった。そこで、乳酸の精製・濃縮に分離膜を用いることによる、精製・濃縮の効率化技術の開発に取り組んだ。

(1) 高選択性分離膜を用いた不純物および乳酸透過性の評価

発酵液からのD-乳酸の選択的な精製においてNF膜を適用した検討を行った。D-乳酸発酵液を想定したモデル水溶液を用いて、糖、タンパク質、カルシウムイオン、硫酸イオンと生産物であるD-乳酸の透過性試験を行ったところ、不純物である糖の除去率は95%であり、タンパク質、カルシウムイオン、および硫酸イオンの除去率は99%以上であった。一方、生産物であるD-乳酸は除去率が35%であったことから、NF膜を用いることで、効率的にD-乳酸を分離精製できることを確かめた(表6)。

表3 乳酸、および代表的な不純物の NF 膜除去特性

	NF膜透過前 (ppm)	NF膜透過後 (ppm)	除去率 (%)
残糖	1000	50	95
タンパク質	10	検出限界以下	>99
カルシウムイオン	600	4	>99
硫酸イオン	1400	7	>99
乳酸	50 (g/L)	33 (g/L)	35

(2) ベンチスケールテストによる膜利用精製プロセス基本技術確立

NF膜によるろ過操作によって、D-乳酸の選択的分離が可能であったことから、NF膜ろ過工程を含む D-乳酸精製基本フロー構築に向けた検討を行った。微生物による D-乳酸製造は、産生される D-乳酸の全てあるいは一部をカルシウムイオンで中和しながら、発酵生産する。ポリ乳酸原料としての D-乳酸としては、高純度の 90(w/w)%を得る必要があることから、分離膜を用いることによって、①微生物由来の不純物を含む発酵液からの D-乳酸の選択的な分離、②発酵液の水分の効率的な除去のそれぞれが可能なプロセスフローを検討した。

フリーD-乳酸を得るためには、乳酸塩(乖離乳酸)をフリー乳酸(非乖離乳酸)に変換する必要があることから、MFR 連続発酵で得られた発酵ろ液を濃硫酸によって解塩する工程を設定した。得られたフリー乳酸は、次工程でNF膜ろ過を行うことで、微生物由来の副生物、および解塩工程で生成されるカルシウムイオン、硫酸イオンを選択的に分離することが出来た。水分の除去、すなわちフリーD-乳酸の濃縮には RO 膜による水除去を考案した。RO 膜はフリー乳酸を阻止することから効率的に水分の除去が可能である。但し、逆浸透による水除去では、フリー乳酸濃度上昇に合わせてろ過圧をあげる必要があることから、フリーD-乳酸が濃度領域での水除去に RO 膜処理を行い、高濃度領域では従来の熱濃縮を併用する濃縮工程とした。熱濃縮後、蒸留を行うことで 90(w/w)%の高純度 D-乳酸を得る膜利用精製プロセス基本フローを構築した(図13)。

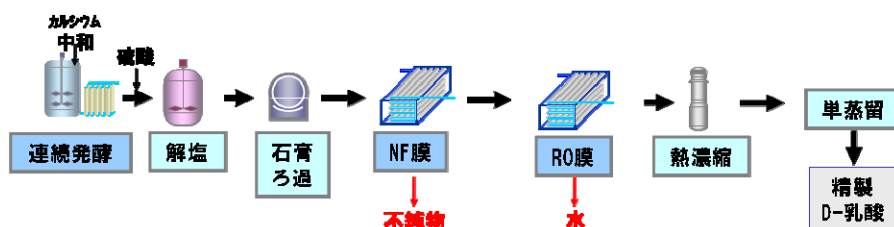


図13 D-乳酸膜利用精製プロセスフロー

次に本プロセスの実用性を評価するために、ベンチスケールでの精製実証を行った。ベンチスケール(図14)での精製検討には、D-乳酸発酵酵母、およびD-乳酸菌のパイロット MFR 装置によるD-乳酸発酵液を用いて行った。D-乳酸発酵酵母、およびD-乳酸菌の発酵液からのD-乳酸

精製結果を表4に示す。A 社品、B 社品は現状、入手可能なフリーD-乳酸製品として、最も高純度であるとされるが、膜利用精製プロセスによって得られた精製 D-乳酸は、それら高純度製品と同等以上の純度が得られた。更に、精製 D-乳酸を原料とした直接重合法による PDLA 重合評価を行った。PLA 重合法のうち、直接重合法は原料乳酸の純度によって重合される PLA の品位に大きく影響受けることから、精製法としての性能評価として適する。直接重合の結果、膜利用精製品からの PDLA は、高純度製品からの PDLA よりも、融点、分子量、および色調ともに高い品位の PDLA が得られることを確認し、膜利用精製プロセスを用いることにより極めて高い純度の D-乳酸が得られることを確認した(表4)。



図14 膜利用精製プロセス ベンチスケール試験装置

a. 膜利用精製試験装置(NF/RO 膜)、b.大型遠心ろ過装置(石膏ろ過)

表4 D-乳酸膜利用精製:精製 D-乳酸と精製 D-乳酸原料 PLA の品質

D-乳酸由来		膜利用精製		A社品	B社品
発酵微生物		酵母	乳酸菌	乳酸菌	乳酸菌
精製乳酸	光学純度(%e.e.)	99.9	99.5	98.6	98.3
	着色度(APHA)	2	5	5	7
直接重合 PLA	融点(℃)	168.0 (○)	167.9 (○)	165.1 (△)	163.4 (×)
	分子量(万)	19.5 (○)	18.0 (○)	12.9 (△)	12.0 (△)
	ポリマー色相(目視)				

(3) 逆浸透膜を用いた D-乳酸の濃縮効果

膜利用精製プロセスによる D-乳酸精製ベンチスケール検討を行い、精製プロセス各工程での投入エネルギーから、排出される二酸化炭素量を試算した。発電効率、冷却効率、エネルギー CO2 排出係数に関して、それぞれ前提をおいて算出した。濃縮工程に熱濃縮のみ、および RO

膜による濃縮併用(D-乳酸膜利用精製プロセスフロー参照)のそれぞれのケースに関する PDLA 1kg生産あたりの二酸化炭素排出量を比較した結果、熱濃縮のみの場合より、RO 膜による濃縮を併用することで、精製プロセスからの二酸化炭素排出量が半減することが明らかになった。

(参考文献)

- 1) Sawai H, Mimitsuka T, Minegishi SI, Henmi M, Yamada K, Shimizu S, Yonehara T. 2011. A novel membrane-integrated fermentation reactor system: application to pyruvic acid production in continuous culture by *Torulopsis glabrata*. Bioprocess Biosyst Eng. 2011 Feb 12. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00449-011-0521-3.
- 2) Tsuji H. 2005. Poly (lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation and applications. Macromol Biosci. 5:569-597.
- 3) Levente L.D., and T. Pllzanov. 2005 Membrane Fermentation of Lactic Acid. Inter. J. Appl. Sci. Eng. 3:19-
- 4) Hurok O., Young-Jung W., Jong-Sun Y., and Hwa-Won R., 2003 Lactic Acid Production Thorough Cell-Recycle Repeated-Batch Bioreactor. Appl. Biochem. Biotech. 105-108:603-613.
- 5) Sunhoon K., Lk-Keun Y., Woo G. L., and Yong K. C. 2001/ High-Rate Continuous Production of Lactic Acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a Two-Stage Membrane Cell-Recycle Bioreactor. Biotech. Bioeng. 73: 25-34.
- 6) Cirilo N-H, Toshiyuki M, Genta K, Kenji S, and Ayaaki I. 2002. Synchronized Fesh Cell Bioreactor System for Continuous L-(+)-Lactic Acid Production Using *Lactococcus lactis* IO-1 in Hydrolysed Sago Starch. J. Biosci. Bioeng. 93: 281-287.
- 7) Ryo O, Tomonori Y, and Takahiro S, 1999 Continuous Production of Lactic Acid from Molasses by Perfusion Culture of *Lactococcus lactis* Using a Stirred Ceramic Membrane Reactor. J. Biosci. Bioeng. 87: 647-654.
- 8) Danner H, Madzingaidzo L, Thomasser C, Neureiter M, and Braun R, 2002 Thermophilic production of lactic acid using integrated membrane bioreactor systems coupled with monopolar electrodialysis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 160-169.

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H18FY	12件	0件	0件	0件	0件	0件
H19FY	13件	0件	0件	0件	0件	0件
H20FY	15件	0件	3件	0件	0件	0件
H21FY	2件	0件	2件	0件	0件	4件
H22FY	0件	0件	0件	1件	0件	2件

（※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約）

2.4 総合調査研究(財団法人バイオインダストリー協会)

プロジェクトの一体的かつ円滑な推進および研究成果の検討による適切な研究の方向性の調整、研究者間の情報交換・意見交換による効率的な研究の推進等を目的として、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダー、プロジェクト全参加メンバー、外部有識者による研究開発委員及び関係者を交えて、研究開発委員会(本委員会)9回、分科会15回を以下のとおり開催した。

開催日	委員会名称
平成18年6月5日(月)	第1回研究開発委員会
平成18年12月1日(金)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第1回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第1回分科会
平成18年12月18日(月)	「バイオリファイナリー技術の開発」第1回分科会
平成19年2月28日(水)	第2回研究開発委員会
平成19年6月29日(金)	第3回研究開発委員会
平成19年12月25日(火)	「バイオリファイナリー技術の開発」第2回分科会
平成19年12月26日(水)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第2回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第2回分科会
平成20年2月26日(火)	第4回研究開発委員会
平成20年7月14日(月)	第5回研究開発委員会
平成20年12月15日(月)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第3回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第3回分科会 「バイオリファイナリー技術の開発」第3回分科会
平成21年3月2日(月)	第6回研究開発委員会
平成21年7月31日(金)	第7回研究開発委員会
平成21年12月25日(金)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第4回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第4回分科会 「バイオリファイナリー技術の開発」第4回分科会
平成22年3月1日(月)	第8回研究開発委員会
平成22年7月15日(木)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第5回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第5回分科会 「バイオリファイナリー技術の開発」第5回分科会
平成23年1月31日(月)	第9回研究開発委員会

また、成果の実用化および具体的出口イメージを念頭に置いて、METI および NEDO プロジェクト担当者、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダー同席のもと、各研究実施者よりヒアリングを行い、次年度に向けた研究計画の確認・修正、今後の具体的実施方針策定等について議論するための検討会を4回開催した(平成19年1月31日(水)、平成20年1月21日(月)、平成

21年2月2日(月)、平成22年2月8日(月))。

さらに、外部調査機関を利用して、平成18年度は、バイオリファイナリー技術(特にバイオマスから糖への変換技術を中心)に関する欧米の技術動向調査を実施、最新情報を収集して調査報告書「微生物機能を活用した高度調和型製造基盤技術開発関連の文献調査・抄録」を作成し、関係者へ提供した。

平成19年度は、微生物反応の多様化・高機能化技術(特に有機溶媒耐性微生物の開発と利用)に関する国内外の研究動向調査を実施、2004年から2007年の4年間に公表された学術文献・学会発表・レポートなどの最新情報を収集し、有機溶媒耐性微生物の探索・分離、有機溶媒耐性微生物の有機溶媒耐性機構、有機溶媒耐性微生物を用いたバイオ変換プロセスの開発、有機溶媒耐性酵素、有機溶媒耐性微生物の宿主ベクター系の開発について整理・解析して調査報告書「有機溶媒耐性微生物の開発と利用に関する研究動向調査」を作成し、関係者へ提供した。

平成20年度は、高性能宿主細胞創製技術に関わり、「systems biology」、「synthetic biology」、「synthetic genomics」などの研究分野で微生物に関連した国内外の研究動向調査を実施、1999年から2008年の10年間に公表された学術論文・総説・レポートなどの最新情報を収集し、シンセティックバイオロジーと代謝工学・遺伝子発現・細胞間コミュニケーション、シンセティックゲノミクスと合成ゲノム構築・ゲノム移植などについて整理・解析して調査報告書「微生物機能を活用した高度調和型製造基盤技術開発関連の文献調査・解析－微生物関連の *in vivo* シンセティックバイオロジーの研究動向－」を作成し、関係者へ提供した。

平成21年度は、本プロジェクト研究技術開発に関連するホワイトバイオテクノロジーの研究開発分野で微生物による物質生産に関わる海外(主に欧米)の研究動向調査を実施した。2005年から2009年の5年間に公表された学術論文・レポート・インターネットサイトなどからの最新情報を収集し、ホワイトバイオテクノロジーに関する現状、国家戦略、関連プロジェクト、企業動向、トピックスなどについて整理・解析して調査報告書「プロジェクト研究技術開発に関連するホワイトバイオテクノロジーの海外研究動向調査(主に欧米)」を作成し、関係者へ提供した。

平成22年度は、本プロジェクト研究技術開発に関連する、欧米における微生物機能を利用したバイオプロセス・バイオプロダクトの技術開発動向調査を実施した。主に2010年に公表された公式レポートやインターネットサイトなどからの最新技術情報を収集し、石油化学品に換わる微生物によるバイオ化学品をキーワードに、欧米の政府省庁や民間企業の技術開発動向、さらには産業・経済への波及効果、GHG(地球温室効果ガス)削減・省エネルギーなどの地球環境保全効果にまで展開して整理・解析して調査報告書「欧米における微生物機能を利用したバイオプロセス・バイオプロダクトの技術開発動向調査」を作成し、関係者へ提供した。

また、特許周辺情報の調査を行い、平成18年度は「特許調査報告」、平成19年度、20年度、21年度、22年度は「国内外研究動向調査結果報告」を各年度1報作成し、計5報を関係者に提供した。

IV. 実用化、事業化の見通しについて

1. 実用化、事業化の見通し

1.1 実用化、事業化の見通し

本事業の研究開発の成果から、以下のとおりの実用化の見通しが立てられる。

高性能宿主細胞創製技術の開発においては、大腸菌 DGF の研究開発で、作製した染色体縮小化株群は自社での利用以外にも他社へのライセンスアウトを交渉中である。また更に活用範囲を広げるため、アカデミアのグループへの分与を計画中である。2～3年後には、実用化の具体的な事例が出てくるように普及活動に努めている。実用化の事例がでてくれば、そこから2年以内には事業化に結びつくものとする。枯草菌 RGF の研究開発で、得られた高機能性宿主細胞を用いて、セルラーゼ、プロテアーゼなどの産業用酵素ならびに異種生物由来蛋白質の微生物工業生産技術を確立し、経済的生産性アップとコストダウンを実現する。また、得られた研究成果は国内外の学会発表及び論文発表として公開し、条件が合えば幅広くライセンスアウトし、実用化を加速する。分裂酵母 IGF の研究開発で、旭硝子における異種タンパク質生産受託ビジネスへのIGF 宿主ならびに技術の提供、および社外への積極的なライセンスアウトを行う。また公的・民間菌株分譲機関を活用し、宿主ならびに周辺ライブラリーを恒久的に保管・分譲し、かつ同様の技術移転機関を活用し、開発成果の普及を図る。

微生物反応の多様化・高機能化技術の開発においては、非水系反応場におけるバイオプロセスの構築で、有機溶媒耐性 *K. rhizophila* DC2201 に各種の反応を触媒する酵素遺伝子を導入することによって有機溶媒反応場で難水溶性化合物を原料にした医薬品中間体等の生産を 3～5年後の実用化を目指して、検討して行く。酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発で、プロジェクトで達成した成果をビタミンD類水酸化体の製造に活用を検討するほか、独自に保有する P450 水酸化酵素遺伝子ライブラリーを活用して、同様な開発手順で医薬としての新たな有用水酸化化合物の製造開発の展開を図ってゆく。酵素反応シミュレーション技術の開発で、将来的には、製薬企業や化学関連企業に向けた解析サービスやコンサルティングが事業として有望であるが、まずは、弊社内での実用化を検討する。具体的には、自社内で事業化に向けて研究開発を行っている抗体や酵素を利用した分子センサの高度化に利用する。補酵素再生系を含む複合酵素系による生産プロセスの開発で、非天然アミノ酸生産プロセス等の実用化レベルに達した生産プロセスについては、プロジェクト終了後数年以内での工業規模使用に向けて、製品の市場調査とコスト評価、及び技術導入時の経済的妥当性の検証を進め、必要に応じて製品化や設備取得に向けた工業化技術検討に移行する。非天然型抗生物質生産の基盤技術となる人工遺伝子クラスター法の開発で、非天然型抗生物質Bの培養生産性についてはほぼ目標を達成し実用化可能なレベルにある。一方、実用化のためには、本物質が新規物質であるため培養液からの精製プロセスの開発が必要である。また、本物質は医薬品原体の合成中間体として利用されるため、合成工程への適用確認、得られた原薬の不純物プロファイル等の確認も必要である。

また、発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、高性能宿主細胞 DGF は、代謝変化により、効率的な増殖を行

うことで製薬分野における利用が推進される。有機溶媒耐性株の非水系バイオプロセス中の酵素の発現状況が判明、物質変換可能な反応系が見いだされた。非水系バイオプロセスによる物質変換系が可能となった。

バイオリファイナリー技術の開発においては、増殖非依存型バイオプロセスの開発で、国内企業との共同により増殖非依存型バイオプロセスによる各種化学品・燃料の工業化研究を開始した。メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術で、本技術の実用化、事業化促進のため、有機酸以外の有用物質製造への適用実証、実用システム構築に重要な発酵・精製システムの運転技術開発、および汎用発酵システムとしての既存発酵システムとの優位性の明確化を行うことにより、高効率な微生物発酵プロセスの実用化・事業化に目処をつける。

研究開発項目毎の実用化の見通しは以下のとおりである。

1. 1. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発

1. 1. 1. 1 大腸菌 DGF (Designed Genome Factory) の研究開発 (協和発酵キリン株式会社)

(1) 成果の実用化可能性

本研究開発で作製した染色体縮小化株を用いた物質生産に関して、既存の菌株と比べた優位性を実証した。またプロモーター群もユニークな制御が可能なるものをコレクションしたので、プロモーター単独での使用も十分に実用的である。染色体縮小化株を宿主として、生産系遺伝子を発現させ、目的化合物に応じてチューニングすることで、効率的な物質生産系を構築することが可能である。実用化の可能性は高いと判断する。

(2) 事業化までのシナリオ

実用化・事業化に向けては、引き続き子会社で検討を継続する。また積極的なライセンスアウトや共同研究により更なるブラッシュアップを予定している。ニコチアナミンに代表されるような、これまでに製造方法が確立できなかったような、製造困難な化合物の生産プロセス構築に利用することで、既存の菌株に対する優位性が示され、事業化にも繋がりやすいと考える。そのようなターゲットも、ライセンスアウトや共同研究の中で試される予定。2～3年後の実用化を目指す。事業化に関しては、ターゲット化合物の需要の推移によるところも大きい。複数の実用化例が出れば、そこから2年以内には事業化例がでてくるものとする。課題としては、組換えの規制の問題がある。規制が厳しくなれば、事業化の可能性は低くなる。

(3) 波及効果

本研究開発成果に関して、ライセンスインの打診、共同研究に関する問い合わせなどがある。今後さらに波及効果が現れるものと思われる。

本プロジェクトの実施に際しては、ポスドク研究員を積極的に雇い入れた。ポスドクの皆さんには、応用研究、企業研究の手法に習熟していただいた。そのような方々が、アカデミアに戻られており、応用研究分野の活性化に少なからず寄与した。

1. 1. 1. 2 枯草菌 RGF (Refined Genome Factory) の研究開発 (花王株式会社)

ゲノムサイズを30%以上縮小することで、(1)糖消費効率の向上、(2)プラスミド DNA コピー数の増加、(3)細胞内代謝効率の向上など、酵素生産効率を大幅に向上させる事に成功した。また、培養後半の代謝活動も高レベルで維持できており、定常期以降の細胞当たりの酵素生産効率が向上したことで、生産性がさらに向上した RGF を創製できた。更に、本プロジェクトにおいて RGF 株のアミノ酸および糖の代謝をデザインしたことで生産性が 2.5 倍向上させることができた。

得られた高機能性宿主細胞を用いて、セルラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼなどの産業用酵素ならびにインターフェロンなどの異種生物由来蛋白質の微生物工業生産技術を確立し、経済的生産性アップとコストダウンを実現する。また、得られた研究成果は国内外の学会発表及び論文発表として公開し、条件が合えば幅広くライセンスアウトし、実用化を加速する。

1. 1. 1. 3 分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発 (旭硝子株式会社)

旭硝子における異種タンパク質生産受託ビジネスへの IGF 宿主ならびに技術の提供、および社外へのライセンスアウトを積極的に行う。また公的・民間菌株分譲機関を活用し、宿主ならびに周辺ライブラリーを恒久的に保管・分譲し、かつ同様の技術移転機関を活用し、開発成果の普及を図る。

1. 1. 1. 4 発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

本研究開発の結果、MGF-01 株の持つ特異な性質を、遺伝子の大量削除による遺伝子発現の変化として捉えることができた。これらの情報から異常増殖の仕組みが明らかになることで DGF 株の高度化に必要な情報となり、協和発酵キリンにおいてプロジェクト開始時に対して生産性を2倍以上に向上させた DGF 株の創製がなされるものと期待される。

1. 1. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

1. 1. 2. 1 非水系反応場におけるバイオプロセスの構築 (ダイセル化学工業株式会社)

有機溶媒耐性 *K. rhizophila* DC2201 にニトリラーゼ、酸化還元酵素、水酸化酵素遺伝子を導入することによって難水溶性化合物を原料にして有機溶媒反応場でマンデル酸等を生産する。また、水素酸化細菌を用いて不斉還元酵素とヒドロゲナーゼを共役させて原料と水素から医薬品の中間体となる光学活性化合物を生産する。いずれも、3~5年後の実用化を目指して、プロセス検討を行って行く。有機溶媒耐性菌は化学物質に対する耐久性が高いところから、物質生産ばかりでなく、有害な化学物質を分解させることにも応用可能であり、環境修復技術への利用も検討して行く。

1. 1. 2. 2 酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発 (メルシャン株式会社)

天然物由来の複雑な化合物における位置・立体特異的水酸化反応は、修飾標的の炭素原子

の不活性化、保護すべき反応基の存在、異性体の生成などの理由から化学合成的アプローチが最も困難とする反応である。P450バイオプロセスによる水酸化反応製造技術が確立すれば、これまで化学合成的に困難であった新規生理活性物質の創製や、導入水酸基を反応活性基点としたコンビナトリアルケミストリー的手法による医薬品中間体の調製、さらには汎用アルコール類の生産といった広範な産業用途の拡大が期待できる。

メルシャンは活性型ビタミンD3を含め水酸化反応による複数の製造品目を製造に結びつけたこれまでの実績から、本研究開発の成果を比較的短期間で自社で実用化することが可能である。例えば医薬または医薬中間体としての水酸化ビタミンD誘導体が実用化候補品目に挙げられる。さらに、本委託研究成果が、多くの有用なシトクロムP450モノオキシゲナーゼ(望ましくはさらに広範な酸素添加酵素)を活用したバイオプロセスに汎用的に応用できれば、様々な有用水酸化化合物の受託製造を外部企業から請け負うことで事業を展開することを考えている。

成果物については可能な限り特許出願し、化合物の水酸化を希望する企業・大学等には有償の実施許諾契約の下で貸与することも考慮する。

1. 1. 2. 3 高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気株式会社)

コンピュータの計算処理能力が飛躍的に増大する昨今、シミュレーションツールを活用して酵素や抗体などの高分子を設計するニーズは、今後増えていくと考えている。将来的には、このようなニーズがある製薬企業や化学関連企業に向けた解析サービスやコンサルティングが事業として有望であるが、まずは、弊社内での実用化を検討する。具体的には、自社内で事業化に向けて研究開発を行っている抗体や酵素を利用した分子センサの高度化に向けて、本研究開発の成果を反映させる。

1. 1. 2. 4 微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)

非天然アミノ酸生産プロセス等の実用化レベルに達した生産プロセスについては、プロジェクト終了後数年以内での工業規模使用に向けて、製品の市場調査とコスト評価、及び技術導入時の経済的妥当性の検証を進め、必要に応じて製品化や設備取得に向けた工業化技術検討に移行する。

1. 1. 2. 5 放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)

本研究開発のモデル化合物は、医薬品分野で極めて有用な物質である。現状、本モデル化合物は「天然型」生理活性物質を原料として化学プロセスによって製造可能であるが、多工程に及ぶ化学反応を必要とするため、収率が低く製造コストが高くなっている。本研究開発で得られた遺伝子組換え体を培養し、精製工程も含めて、化学プロセス法と競争可能な製造コストでモデル化合物を生産する技術が確立されれば、本物質及びその関連物質を明治製菓株式会社の国内工場生産し、国内外で販売する計画である。実用化時期は、本研究開発終了後3年以降を目

処としている。条件が合えば国内企業にライセンスアウトする。

1. 1. 2. 6 発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

本研究開発の結果、OSR 株の持つ有機溶媒耐性機構の解明の一端を掴むことができた。これらの情報については共同実施先の大阪大学、広島大学、ダイセル化学へ提供を行った。これらの情報からそれぞれの特徴を生かした OSR 株の持つ有機溶媒耐性機構を利用し、非水系バイオプロセスが実現に近づいたものと考えられる。特に *K. rhizophila* DC2201 の優れた有機溶媒耐性を利用した有機溶媒重層二層系培養の可能性が示されたことから、網羅的プロテオーム解析により得られた発現タンパク質のリストをもとに物質生産の設計が可能になり、新たな反応場の創製につながるものと期待される。

本研究開発の成果物である「創製された高性能宿主細胞」「OSR株」については、NEDO 及び研究実施機関が成果の普及に努めることとなっており、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝子資源部門(NBRC)への寄託が検討される予定である。これにより、広く普及し、研究開発、産業利用が進むものと期待される。

1. 1. 3 バイオリファイナリー技術の開発

1. 1. 3. 1 ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発

(財団法人地球環境産業技術研究機構)

(1) 実用化のシナリオ

日本の自動車、家電企業等は、再生資源からの材料使用率 up の早期実現を図るため一日も早い該材料の原料となるバイオリファイナリーによる“経済性ある化学品製造”が実現されることを望んでいる。

実際に、これらの企業は該化学品の製造に自ら乗り出すこと、もしくは化学系企業等との連携による製造も視野に入れている。RITE では、本研究開発に付随する活動として、バイオリファイナリー化学品の応用用途もしくは製造に関心ある企業情報を収集し、それを基に日本におけるバイオリファイナリー産業化の早期実現を目指してきた。

現在、本プロジェクトで開発したポリマー原料等の基幹物質製造技術に関して、複数の国内企業とプロジェクトの枠外にて実用化研究をスタートしており、今後 5 年以内に数種の本格的なバイオリファイナリー産業の構築が可能となる。特に D-乳酸、L-乳酸は、高機能バイオプラスチックであるステレオコンプレックス型ポリ乳酸(scPLA)の原料として近年再び注目を浴びている。これは、近年の樹脂合成技術の飛躍的進歩から従来バイオマスプラスチックでは達成できなかった石油系ポリエステル(PBT,PBT)に匹敵する高い耐熱性と易結晶化特性を有する産業用、耐久消費材に適したバイオマスプラスチックが合成可能となったことによる。現在、国内化学メーカーとの共同研究による工業化研究を実施中であり、数年以内に実用化予定である。

一方、本プロジェクトにおける基盤技術として先行して開発が進んでいる増殖非依存型バイオプロセスによるエタノールやブタノール生産については、プロジェクト枠外でそれぞれ複数の国内企業との共同により既に工業化研究を進めており、これらの工業化の実現に本プロジェクトの成果であるソフトバイオマス由来混合糖同時利用技術や発酵阻害物質耐性等が大きく寄与すると考えられる。

(2)波及効果

増殖非依存型プロセスは日本独自の技術で「ものづくりバイオプロセスのパラダイムシフト」を引き起こすことが可能であり、今後、バイオ化学品は自動車、家電等のエンドユーザーから切望され、コアプロセスとして、大きな波及効果が期待される。今後の具体的な出口の製品として、飼料用アミノ酸、バイオプロパノール、コハク酸などの樹脂モノマーがあげられる。さらに、燃料エタノール、燃料ブタノールの効率的生産にも大いに貢献する。

これらのバイオリファイナリー新産業創生は、自動車・家電メーカー等への再生可能資源由来の材料供給を可能とし、地球環境保護・循環型社会の構築に貢献する。また、新規市場開拓により、10万人以上の新規雇用が可能となる。

1. 1. 3. 2 メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

バイオリファイナリー技術の開発で取り組んでいる「メンブレン利用発酵システムによる有機酸製造基盤技術」は、有機酸に限らずその他発酵品目の生産に適用可能性の高い発酵生産システムである。実用的な物質生産プロセスを構築するにあたっては工業的規模で最終製品を適切なコストで生産できるようにプロセスの最適化を進める必要がある。このためには、発酵、精製を含む製造工程において原料から製品までの全体でプロセスを構築し、段階的なスケールアップ実証をすすめる必要がある。

本プロジェクトでは、適用可能性があり大きな需要が期待できる有機酸として D-乳酸を挙げて、効率的な発酵生産技術開発に取り組んだ。その結果、膜利用発酵リアクター(MFR)を開発し、新開発の分離膜モジュールを適用したパイロットスケール MFR 装置で STY10g/L/h 以上で 700 時間以上、安定して発酵生産できた。また、膜利用精製プロセスを開発して、NF 膜を用いることによって D-乳酸を効率的に精製し、RO 膜を用いることによって低エネルギーで D-乳酸を濃縮できた。また、別途検討から、本発酵・精製プロセスは有機酸以外の物質生産へも適用可能性を見出しており、汎用性の高い技術として展開できるポテンシャルを有している。

これら確立した基盤技術を、今後実用化・事業化を促進するためには、本技術の有機酸以外の有用物質製造への適用実証、実用システム構築に重要な発酵・精製システムの運転技術開発、および汎用発酵システムとしての既存発酵システムとの優位性の明確化を行うことにより、本技術による高効率な微生物発酵プロセスの実用化・事業化に目処をつける必要がある。本システムを実用化できれば、微生物発酵による物質生産コストを飛躍的に低減できることから、バイオリファイナリーによる様々な物質生産プロセスの実用化につなげることができる。