



第9回 微生物によるビタミン生産 —ビタミン命名100周年—

新城雅子

MS BioConsulting 〒248-0017 神奈川県鎌倉市佐助 2-2-12

Microbial production of vitamins — The 100th anniversary of vitamin concept —

Masako Shinjoh

MS BioConsulting, 2-2-12, Sasuke, Kamakura-shi, Kanagawa 248-0017, Japan

1. はじめに

2010年は、日本で鈴木梅太郎博士によるビタミンB₁発見(1910年)から100周年にあたり、多くのすぐれたレビューや講演会開催を目にした。特に鈴木梅太郎博士の弟子が創設され、5つの重要なビタミン生産プロセス研究をされた京都大学「発酵生理及び醸造学研究室」ご出身の清水昌先生のレビューでは、「微生物が支えるビタミン類の工業生産」をまとめられている(清水, 2012)。本稿では、「微生物によるビタミン生産」について、日本微生物資源学会誌読者の皆様に、生産プロセスで使用される主な微生物の紹介と筆者が研究生活を送ったロシュ社ビタミン部門(現DSM Nutritional Products AG)で行われたビタミン生産微生物の探索・育種研究開発の事例2つを含むミニレビューをお届けしたい。

2012年は、「ビタミン」という名称誕生の100周年であった。ポーランド人Casimir Funkが1912年に生命のアミンを意味するVitamine (Vital + amine; 後にamineが含まれない化合物に使用できるVitaminと改称された)という用語を提唱した。ビタミン原料の世界トップサプライヤーであったロシュは80年余前からビタミン研究開発製造を始めた。その非営利団体で、栄養研究で評価の高い世界的なシンクタンクのサイト・アンド・ライフ(Sight and Life)の出版物、世界の微量栄養素欠乏と人類の戦いに関する歴史につ

いての書籍「Micronutrients, Macro Impact: The story of vitamins and a hungry world (微量栄養素とその大きなインパクト: ビタミンと世界飢餓の物語)」からもグローバル視野でのビタミン生産の研究開発の歴史を引用し紹介する。

最近の話題を含め、「こんな菌がこんな役に立っているのか」とイメージして頂けるように、ファッションショー宜しく菌達に次々と登場してもらおう。

2. ビタミン命名から100年の歴史

ビタミンには、脂溶性4種[A, D, E, K]と水溶性9種[B₁, B₂, ナイアシン(B₃), パントテン酸(B₅), B₆, ビオチン(B₇), 葉酸(B₉), B₁₂, C]があり、その発見、単離、構造決定、合成が達成された歴史的経緯を表1に示す。8種類の水溶性Bビタミン群は最初は単一物質と考えられたが、後に化学的に別物であることが見出された。ほとんどのビタミンが20世紀初頭に発見され、それから20世紀半ばには、ほぼ全合成に成功している。ビタミンB₁₂は、その構造の複雑さから1972年になって初めて合成に成功している。「ビタミン」と「アルファベット」の組み合わせによるビタミンの命名法を1921年に提唱したのは、英国の生化学者Sir Jack Cecil Drummondである。最初にビタミンの統一命名法に従って命名されたのがビタミンAである。

プロビタミンAは、カロテノイドであるベータカロテンとして同定されたが、その他現在までに自然界

表1 The history of vitamins

Vitamin	Alternative name	Discovery	Isolation	Structure	Synthesis
Fat-soluble					
Vitamin A	Retinol	1909	1931	1931	1947
Provitamin A	β -carotene	1831	1831	1930	1950
Vitamin D	Calciferol	1918	1932	1936	1959
Vitamin E	Tocopherol	1922	1936	1938	1938
Vitamin K	Phylloquinone	1929	1939	1939	1939
Water-soluble					
Vitamin B ₁	Thiamine	1897	1926	1936	1936
Vitamin B ₂	Riboflavin	1920	1933	1935	1935
Vitamin B ₃	Niacin	1936	1936	1937	1994
Vitamin B ₅	Pantothenic acid	1931	1938	1940	1940
Vitamin B ₆	Pyridoxine	1934	1938	1938	1939
Vitamin B ₇	Biotin	1931	1935	1942	1943
Vitamin B ₉	Folic acid	1941	1941	1946	1946
Vitamin B ₁₂	Cobalamin	1926	1948	1956	1972
Vitamin C	Ascorbic acid	1912	1928	1933	1933

Micronutrients, Macro Impact: The Story of Vitamins and a Hungry World, Sight and Life より引用

から発見された600種以上のカロテノイドのうち50種以上がプロビタミンA様作用を示した。ベータカロテン以外のカロテノイドでは、カンタキサンチン、アスタキサンチンなどのキサントフィル類と分類される化合物が抗酸化物質として研究報告されている。

3. 微生物によるビタミン生産研究開発の源流の話

スイスパーゼルに本社を置く製薬企業であるロシュ社やノバルティス社の起源について少し述べよう。1758年にヨハン・ルドルフ・ガイギーが薬種店を開き、生薬や天然染料を扱った。19世紀末(1886年)の創業当初、スイス・パーゼルのライン川沿いで当時の贅沢品の絹リボンやアセテートの開発から作り出された生地のための染料産業とデザインも盛んになった。この染料を合成で生産する化学会社が現在のロシュ社やノバルティス社に発展している。今でもこのパーゼルでは薬草系のクスリが町の薬局でも多く販売されており、かつての染料取引所の瀟洒な建物がライン川沿いに保存されている。1900年には、京都で染料問屋として創業した長瀬産業がパーゼル産合成染料の日本への輸入を開始している。余談になるが、パーゼルではデザインも発展し、有名なデザイン学校パーゼル造形学校(Schule für Gestaltung Basel)や、世界的に有名な建築事務所ヘルツォーク & ド・ムーロン(Herzog & de Meuron)他多くの建築事務所がある。北京オリンピックの鳥の巣ドームの斬新なデザインをご記憶かもしれない。ロシュ社、ノバルティス社は、進取の気性を有する建築家による近未来的デザインの社屋建設

でも知られている。さて、この染料化学企業が活躍し始めたころ、1911年に前述のFunkは米糠から抗神経性因子を抽出し、1912年に“生命のアミン”を意味するビタミンと命名する(現在のビタミンB₁)。日本では、この1911年に先立つ1910年に鈴木梅太郎博士が脚気の研究中に“オリザニン”(後のビタミンB₁)を発見した。

ビタミンB₁とほぼ同時期にビタミンCが発見され、その後、1933年にライヒシュタイン(1950年ノーベル生理学賞)がその化学合成に成功する。このプロセスに酢酸菌によるソルビトールからのソルボース発酵が含まれている。ビタミンCは、近年まで「ライヒシュタイン法」を用いて、パーゼルから車で15分ほどのライン川沿いにあるドイツ・グレンザッハで、ロシュ社により長らく生産されていた。現在は、英国北部スコットランド地方ダルライにおいて品質の高いビタミンC“Quali-C”として、中国以外で西洋諸国唯一の生産を維持している。

ビタミンB₂(リボフラビン)は1920年に発見され、1933年に単離、1935年に全合成された。その後、ロシュ社ではビタミンB₁、E、K、パントテン酸、ビタミンB₆、Dと開発が続き、1960年代に精神安定剤が登場し売上世界1位の製薬会社になるまでの約30年、各種ビタミン生産で経営を牽引した。

4. 現在のビタミン微生物生産研究開発状況

現在までに、微生物生産が報告されているビタミンの例を表2に、カロテノイドの例を表3に示す。ビタ

表2 発酵生産プロセスが開発されているビタミン

ビタミン	工業生産法	醗酵生産・研究	
		使用微生物群	微生物名
D	化学合成	放線菌など	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (中間体 Ergosterol 生産)
K	化学合成	細菌	<i>Flavobacterium</i> sp. <i>Arthrobacter nicotianae</i> <i>Bacillus natto</i>
B ₁	化学合成	細菌	<i>Bacillus subtilis</i>
B ₂	化学合成または 発酵	細菌, 菌類など	<i>Ashbya gossypii</i> <i>Bacillus subtilis</i>
B ₆	化学合成	細菌など	<i>Flavobacterium</i> sp. <i>Rhizobium meliloti</i>
B ₁₂	発酵	細菌	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i>
C	化学合成および 発酵の併用	細菌	<i>Gluconobacter</i> <i>Ketogulonicigenium vulgare</i>
パントテン酸	化学合成	細菌	<i>Escherichia coli</i> <i>Corynebacterium</i>
	酵素反応	カビ	<i>Fusarium oxysporum</i>
ビオチン	化学合成	細菌	<i>Serratia marcescens</i>
			<i>E. coli</i> , <i>B. sphaericus</i>

Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors, Elsevier 1989, 発酵ハンドブック, 共立出版 2001, 微生物の事典, 朝倉書店 2008 より引用

表3 発酵生産プロセスが開発されているカロテノイド

カロテノイド	工業生産法	醗酵研究	
		使用微生物	微生物名
ベータカロテン	化学合成または発酵	微細藻類, 酵母, 細菌	<i>Dunaliella salina</i> <i>Blakeslea trispora</i>
アスタキサンチン	化学合成または発酵	微細藻類, 酵母, 細菌	<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Phaffia rhodozyma</i>
リコペン	植物抽出 (トマト)	細菌	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Streptomyces chrestomyceticus</i>
ルテイン	植物抽出 (マリーゴールド)	微細藻類, 菌類	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Dacrymyces deliquescens</i>
ゼアキサンチン	植物抽出 (パプリカなど)	細菌	<i>Flavobacterium</i> sp.
フコキサンチン	モズクから抽出	モズク盤状体	<i>Cladosiphon</i> <i>okamuraanus</i>

Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors, Elsevier 1989, 発酵ハンドブック, 共立出版 2001, 微生物の事典, 朝倉書店 2008 より引用

ミン生産菌 (ビタミン含有食品も含む) が実際に工業レベルで用いられているビタミンには, ビタミン B₂ (*Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*), B₁₂ (*Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium*), C (*Gluconobacter*, *Ketogulonicigenium vulgare*), パントテン酸の合成中間体であるパントラクトン (*Fusarium oxysporum*),

K (*Arthrobacter nicotianae*, *B. subtilis* (*B. natto*)) などがある. 最近のビタミンおよびビタミン様物質の微生物生産に関するレビュー (Hohmann & Stahmann, 2009) も参照されたい.

カロテノイド生産菌が実際に工業レベルで用いられているカロテノイドには, ベータカロテン (*Dunaliella*),

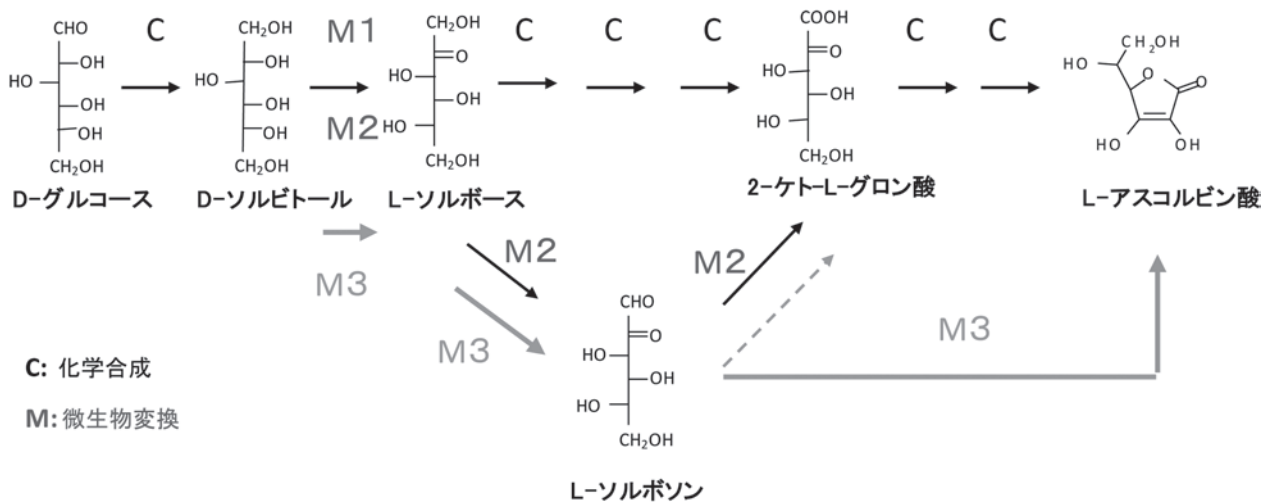


図1 ビタミンC発酵プロセス

M1: Reichstein法のL-ソルボース発酵

M2: L-ソルボースまたはD-ソルビトールからの2KGA発酵

M3: L-ソルボゾン, L-ソルボース, D-ソルビトールからのアスコルビン酸発酵

アスタキサンチン (*Haematococcus* など) がある。最近では、モズクのような大型藻類を微細藻類のように培養する系の開発 (伊波ら, 2011) も行われており興味深い。

5. ビタミンC発酵生産

微生物がビタミン生産に貢献した最初の例は、ビタミンC合成の中間体であるL-ソルボースをD-ソルビトールから酸化発酵で生成する酢酸菌の仲間である *Gluconobacter* 属の菌である (図1 M1 プロセス)。本連載の第7回で星野達雄氏により「微生物による有機酸発酵」がレビューされており、そのなかで、ビタミンC生産の中間体、2-ケト-L-グロン酸発酵について紹介されている (図1 M2 プロセス)。本稿では、微生物によるビタミンCの直接生産の例 (図1 M3 プロセス) を紹介する。

細菌によるビタミンC (アスコルビン酸) の直接発酵 (図1 M3 プロセス) は、主に2種類報告されている。L-ソルボースから2-ケト-L-グロン酸を効率良く生産する *Ketogulonigenium vulgare* が、L-ソルボゾンから2-ケト-L-グロン酸に加え、アスコルビン酸をも生産することが報告されている。基質をL-ソルボース、D-ソルビトールにしても、2-ケト-L-グロン酸とアスコルビン酸を同時生産した (Sugisawa *et al.*, 2005)。その生産に関与する酵素L-ソルボゾン脱水素酵素が精製、クローン化され、PQQを補酵素とする可溶性酵素であることが報告されている (Miyazaki *et al.*,

2006)。また、酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* からL-ソルボゾンから2-ケト-L-グロン酸に加えアスコルビン酸を生成するL-ソルボゾン脱水素酵素が精製、クローン化された (Berry *et al.*, 2005)。こちらの酵素もPQQ依存性であるが膜結合型であった。その塩基配列は前述の *K. vulgare* のものとは大きく異なっていた。

さらにアスコルビン酸生産改良に関与する遺伝子候補群が報告された (Beuzelin Ollivier *et al.*, 2006)。尚、上述の2つのL-ソルボゾン脱水素酵素の反応機構の考察を含むアスコルビン酸工業生産についてのレビューが最近まとめられた (Pappenberger *et al.*, 2013)。これら生育の早い細菌によるアスコルビン酸生産プロセスが工業生産に使用される日が待たれる。その他、アスコルビン酸の微生物生産に関するレビューを参照されたい (Bremus *et al.*, 2006; Hancock, 2009)。

6. ビタミンB₂発酵生産

*Bacillus subtilis*によるビタミンB₂生産菌の構築は、米国ボストンに所在するベンチャー企業OmniGeneで始められ (Perkins *et al.*, 1999)、ロシュ社で菌株育種、プロセス開発が続けられた。詳細は、最近まとめられた *B. subtilis* (図2) および *Ashbya gossypii* によるリボフラビン生産に関するレビューを参照されたい (Hohmann & Stahmann, 2010)。両菌によるリボフラビン生産プロセスは、現在実用化されている。

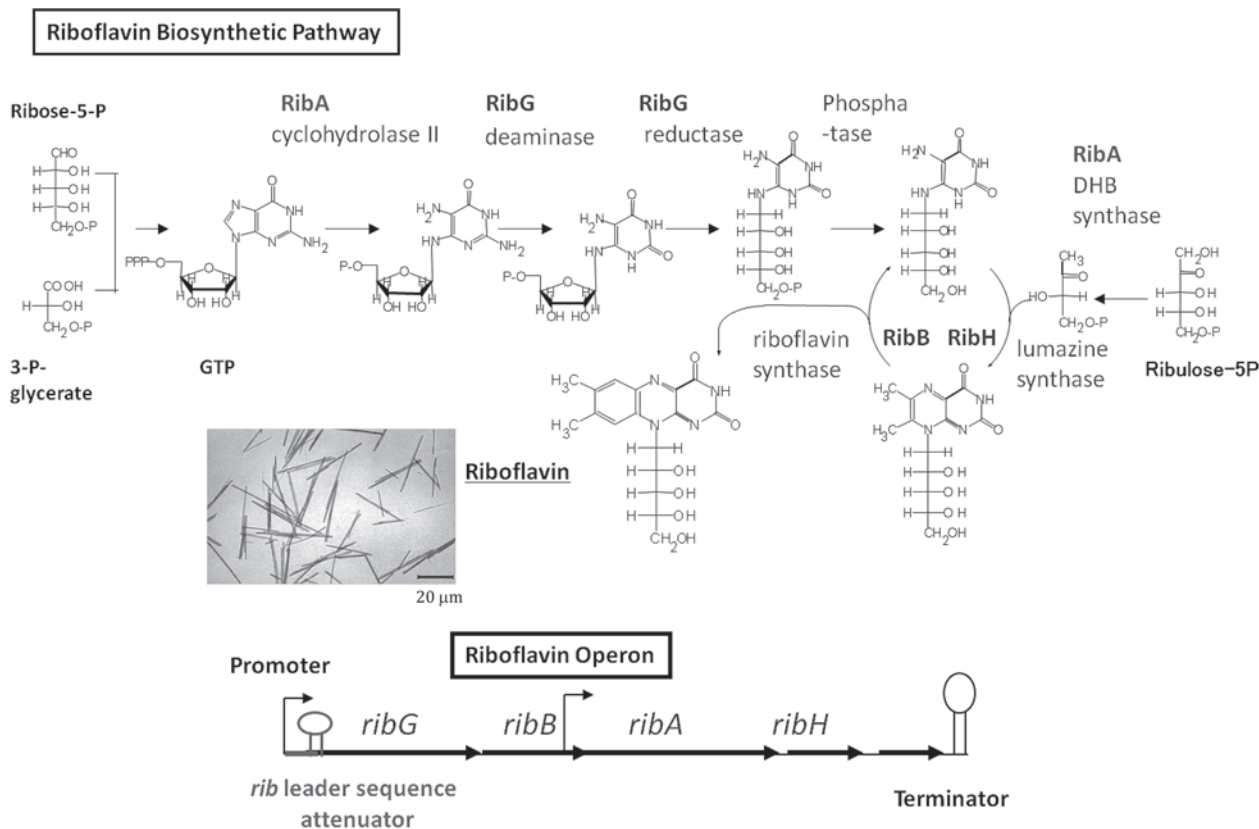


図2 *B. subtilis* のリボフラビン合成経路と関与酵素遺伝子

7. おわりに

100年に渡り研究開発されたビタミン、カロテノイド生産のバイオプロセスを駆け足でご覧頂いた。現在までに、ビタミンB₂、B₁₂、K、ベータカロテン、アスタキサンチンの微生物生産が商業化されている。今回まとめる機会を頂き、こうして眺めてみると工業化の途上にあたり、経済性などの理由から実施に至っていないものが少なからず存在する。生産性が工業化をうかがうところまで改良されたビタミンにはビオチンやカロテノイド（リコペン、ゼアキサンチンなど）がある。商業化生産プロセスの一部にバイオプロセスを用いるものでは、ビタミンC、Dやパントテン酸の生産がある。

現在は、微生物生産菌株の育種において、急速にコストが低下した次世代シーケンシングや化合物を分子量から同定できるほどの精度に到達している質量分析（LC-MS/MSなど）のような各種先端オミクス技術をより積極的に活用する段階に来ている。数十年に渡って、企業内に蓄積してきた変異株の系統解析により、重要な形質を付与する変異の同定を経る有用変異の組

み合わせも可能になってきた。さらに微生物発酵プロセスにおいても、オミクス技術が役立っている。微生物・ファージ汚染管理目的や最適微生物群の維持管理目的でのメタゲノミクス分析は実用レベルで活用され、「代謝工学」分野における発酵代謝物のメタロミクス分析を用いるプロセス理解・制御も研究開発されつつある。

今後、化学変異剤などを用いる伝統的菌株育種技術と上述のオミクスなどの先端技術を融合し、研究開発を進めることで、現在化学法で製造されているビタミン、カロテノイドがさらに商業レベルでバイオプロセスに置き換わっていくことが期待される。日本のお家芸、発酵で培ってきた菌株育種、プロセス開発・最適化のノウハウや人材が現在、バイオ燃料、バイオリファイナリー、バイオ医薬の巨大な市場に向けて、生かされ始めている。巨額の予算が注ぎこまれることで、技術はより高度かつ経済的なものに進化し、それが巡って、堅実な研究開発を行ってきた発酵工業へ生かされているのを見るのは感慨深いものがある。

さて、100年後のビタミン生産はどうなっているの

であろうか？

文 献

(財)バイオインダストリー協会発酵と代謝研究会(編)
2001. 発酵ハンドブック, 共立出版, 東京.

Berry, A., Lee, C., Mayer, A.F. & Shinjoh, M. 2005.
Microbial production of L-ascorbic acid.
WO2005017159 A3.

Beuzelin Ollivier, M.-G., Chevreux, B., Dalluege, M.,
Gelder, V.M., Goese, M., Hauk, C., Koekman, B.P.,
Lee, C., Mayer, A.F., Meury, A., Mouncey, N.J.,
Schipper, D., Shinjoh, M., Toepfer, C., Vollebregt,
A.W. 2006. Fermentative vitamin c production.
WO2006084719 A1.

Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., &
Sahm, H. 2006. The use of microorganisms in
L-ascorbic acid production. *J. Biotechnol.* **124**: 196-
205.

Hancock, R.D. 2009. Recent patents on vitamin C:
opportunities for crop improvement and single-
step biological manufacture. *Recent Pat. Food
Nutr. Agric.* **1**: 39-49.

Hohmann, H.P. & Stahmann, K.P. 2009. Vitamins and
Vitamin-like Compounds: Microbial Production,
Elsevier, London and New York.

Hohmann, H.P. & Stahmann, K.P. 2010.
Biotechnology of riboflavin production. *In* Mander,
L., Liu, H.W., *Comprehensive Natural Products II
Chemistry and Biology* Vol. 7, Elsevier, Oxford,
115-139.

伊波匡彦, 飯沼喜朗 2011. 油性組成物. WO
2011058773 A1.

Sight and Life (eds.) 2012, Micronutrients, Macro

Impact: The Story of Vitamins and a Hungry
World, Sight and Life Press, Basel.

[http://www.sightandlife.org/fileadmin/data/
Books/Micronutrients_Macro_Impact.pdf](http://www.sightandlife.org/fileadmin/data/Books/Micronutrients_Macro_Impact.pdf)

Miyazaki, T., Sugisawa, T. & Hoshino, T. 2006.
Pyrroloquinoline quinone dependent dehydroge-
nases from *Ketogulonicigenium vulgare* catalyze
the direct conversion of L-sorbosone to L-ascorbic
acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1487-1495.

Pappenberger, G. & Hohmann, H.P. 2013. Industrial
production of L-ascorbic acid (vitamin C) and
D-isoascorbic acid. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*
10.1007/10_2013_243 (Epub ahead of print).

Perkins, J.B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K.,
Zachgo, E., Erdunberger, T., Hannett, N.,
Chatterjee, N.P., Williams, V., Rufo Jr. GA., Hatch,
R. & Pero, J. 1999. Genetic engineering of *Bacillus
subtilis* for the commercial production of ribofla-
vin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 8-18.

清水 昌 2012. 微生物が支えるビタミン類の工業生
産. *化学と生物* **50**: 768-772.

Sugisawa, T., Miyazaki, T. & Hoshino, T. 2005.
Microbial production of L-ascorbic acid from
D-sorbitol, L-sorbose, L-gulose, and L-sorbosone by
Ketogulonicigenium vulgare DSM 4025. *Biosci.
Biotech. Biochem.* **69**: 659-652.

Vandamme, E.J. (eds.) 1989. *Biotechnology of
Vitamins, Pigments and Growth Factors*, Elsevier,
London and New York.

渡邊 信, 西村和子, 内山裕夫, 奥田 徹, 加来久敏,
広木幹也(編) 2008. *微生物の事典*, 朝倉書店, 東
京.