

連載「微生物の産業利用—はたらく有用微生物」



第1回 アミノ酸の製造

見島宏之

味の素ジェネティカ リサーチインスティテュート

Microbial production of amino acids

Hiroyuki Kojima

Ajinomoto-Genetika Research Institute, 1 Dorozhny pr., Moscow 117545, Russia

1. 前書き

「アミノ酸入り飲料」や「アミノ酸入りサプリメント」は最近では珍しいものではなくってきました。本誌読者の皆様も「アミノ酸が微生物を利用して作られている」ことは良くご存知と思います。アミノ酸の工業生産に使われている菌そのものは決して特別な微生物ではなく、土壌中などの自然界に普遍的に存在しています。しかし通常は野生株ではアミノ酸を作ることはできず、変異株を誘導することによって始めてアミノ酸の工業生産が可能になっています。現在では多くの種類のアミノ酸が微生物を用いた発酵により工業的に製造されています。本稿はアミノ酸の微生物による発酵生産をご紹介します。

2. アミノ酸発酵に用いられる微生物

アミノ酸の工業的製造には何種類かの菌が用いられています。微生物分類学の面からは旧知に属する菌株で、具体的には *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* 等が使用されています。アミノ酸を製造するために特定の菌株しか使用できない訳ではありません。化学従属栄養細菌は自らの生体構成成分であるアミノ酸を合成する能力を持っていますから、原理的にどんな菌株でもアミノ酸生産菌になり得ます。

化学従属栄養細菌を培養しても培地中に著量のアミノ酸が蓄積することは通常はありません。ほとんどの微生物ではアミノ酸等の生体成分の生合成経路は厳密に調整されています。アミノ酸の生合成経路はそのア

ミノ酸の存在によって転写レベル、翻訳レベル、そして酵素反応のレベルでそれぞれ阻害されることが知られています。その調節機構は複雑かつ巧妙であり、ある微生物の一つのアミノ酸の生合成経路に限っても複数の種類の調節メカニズムが巧妙にはたらいていることが知られています。化学従属栄養細菌も培地中にアミノ酸がある時はそのアミノ酸を利用して増殖します。また自らアミノ酸を生合成して生育している時も必要な量しかアミノ酸を作りません。アミノ酸の生合成のために微生物は貴重な炭素源やエネルギーを消費します。必要以上のアミノ酸を生合成してエネルギーを浪費しない機構が進化の過程で獲得されてきたのでしょう。読者の皆様も合成培地で生育可能な微生物も栄養培地ではより速く容易に増殖可能なことを良くご存知と思います。

化学従属栄養細菌が自ら持っているアミノ酸生合成の仕組みを利用してアミノ酸を工業的に生産するには、微生物が持っている「必要以上にアミノ酸を作らない」メカニズムを上手に破壊して、その潜在能力を引き出してやるように微生物を育種・改良することが不可欠です。これからアミノ酸発酵の実例をあげてさらに説明したいと思います。

3. 野生株によるアミノ酸発酵の例

先ほどほとんどの場合は野生株ではアミノ酸を全く作ることはできないと説明しましたが、唯一と言っても良い例外がグルタミン酸発酵です。1957年に協和発酵の鶴高らは今日 *Corynebacterium glutamicum* と呼ばれる菌がある条件で著量のグルタミン酸を蓄積することを発表しました。

E-mail: hiroyuki_kojima@agri.ru

グルタミン酸生産菌は当初は命名の混乱もありましたが現在は *C. glutamicum* に分類されています。この菌はビタミンの一種であるビオチンを生育に要求します。この菌にビオチンを生育に必需な量よりも少なく与えて（制限して）好氣的に培養すると著量のグルタミン酸を生成します。ビオチンが充足している条件では本菌は旺盛に生育するのみでグルタミン酸を生成しないことが明らかになりました。アミノ酸の工業生産には糖蜜に代表される安価な炭素源を使用することが求められます。糖蜜はそのままでは多量のビオチンを含むために L-グルタミン酸発酵の工業原料として利用できず、ビオチンを取り除くことも非常に困難でした。この難点を解決するための研究の過程で、ビオチンが充足していてもペニシリンを適量添加することによってグルタミン酸の発酵生産が可能になることがメルク社によって発見されました。さらにある種の界面活性剤の添加でも同じ効果があることが明らかになりました。そしてまた脂肪酸要求株を取得し、脂肪酸を制限して培養しても L-グルタミン酸を蓄積させることが可能であることも明らかになりました。このような知見から膜透過性が弱体化して細胞内に合成された L-グルタミン酸が漏出することが L-グルタミン酸発酵の成立因子と考えられてきました。また *C. glutamicum* には L-グルタミン酸の細胞内での直接の前駆体である 2-oxoglutarate を L-グルタミン酸ではなく succinyl-CoA へと代謝する oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) が存在しないとされてきました。

近年 *C. glutamicum* に ODHC の存在が確認され、また L-グルタミン酸の排出が漏出ではなく、能動的な排出系によることが明らかにされました。そして以前は膜透過性と関係があると考えられてきた上記の条件で ODHC 活性が著しく低下することがわかってきました。さらに ODHC 欠損変異株を単離するとビオチンを制限しなくても著量の L-グルタミン酸を生成することも示され、L-グルタミン酸発酵の成立因子と考えられてきた上記の現象は ODHC の活性を抑制することによる代謝フラックスの変化として現在は理解されています（図 1）。

グルタミン酸ナトリウムは 1908 年に東京大学の池田菊苗博士によって昆布のうま味成分として発見、特許化されて以降、コムギグルテン等のタンパク質の酸加水分解により工業生産が行われていました。グルタミン酸発酵の発見は微生物によってアミノ酸を生産できることを始めて示した画期的なものであり、今日世

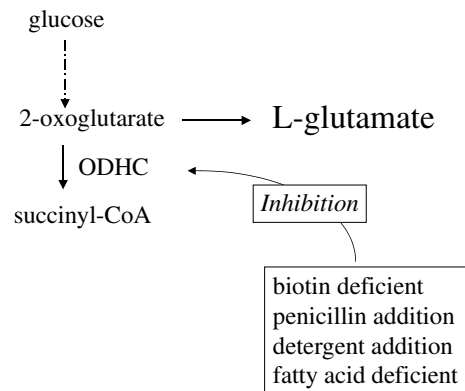


図 1 Mechanism of glutamate fermentation (L-グルタミン酸生合成経路とグルタミン酸発酵)

界的に数百万トンレベルへと発展し現在に至っているアミノ酸発酵工業の出発点となった技術と言えます。

4. 栄養要求変異株を用いたアミノ酸発酵の例

L-グルタミン酸発酵に用いられる *C. glutamicum* からホモセリン要求株を取得し、L-ホモセリン、あるいは L-スレオニンと L-メチオニンを制限して培養することにより著量の L-リジンが培地中に蓄積することが 1958 年に協和発酵の木下らによって報告されました。

C. glutamicum が含まれるコリネ型細菌のアスパラギン酸系アミノ酸の生合成と代謝調節を図 2 に簡単に示しました。L-アスパラギン酸から枝分かれをして L-リジン、L-メチオニン、L-スレオニンが生合成されます。L-アスパラギン酸をリン酸化する aspartate kinase は L-リジンと L-スレオニンの双方が存在するとその酵素活性が阻害されます。阻害に両方の因子が必需という意味で協奏阻害 (concerted feedback inhibition) と呼ばれます。また ASA (aspartosemialdehyde) から L-ホモセリン (Hse) を触媒する homoserine dehydrogenase の酵素活性は L-スレオニンによって阻害されます。*C. glutamicum* から homoserine dehydrogenase を欠損した変異株を L-ホモセリンもしくは L-スレオニンと L-メチオニン両方の栄養要求変異株として取得することができます。この変異株を上記の栄養要求物質を生育に必需な量よりも少なく与えて（制限して）培養すると著量の L-リジンを蓄積することがわかりました。この培養条件では菌体内の L-スレオニンが欠乏した状態になり aspartate kinase の L-リジンと L-スレオニンによる

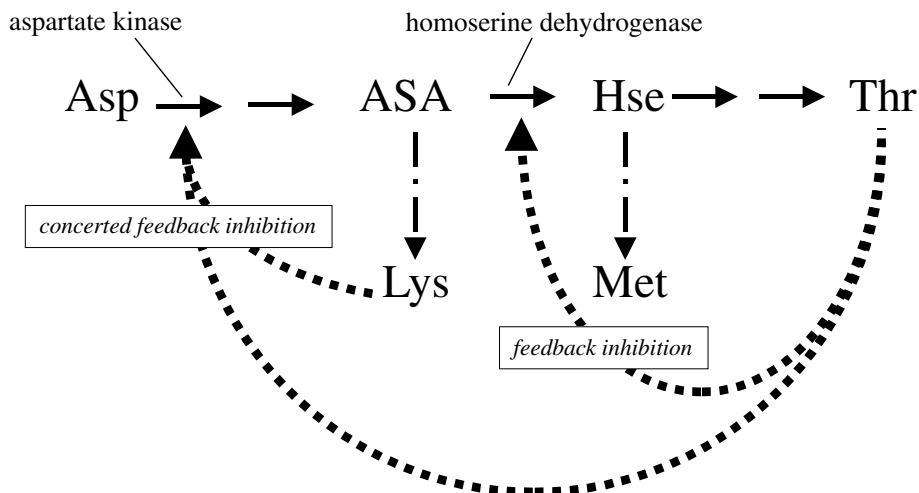


図2 Control mechanism of Asp family amino acids (アスパラギン酸系アミノ酸の生合成調節機構)

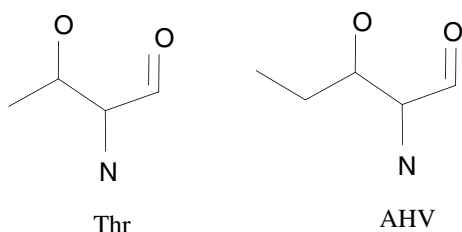


図3 Chemical structure of AHV and L-Thr (L-スレオニンアナログ AHV の化学構造)

協奏阻害がはたらかなくなった結果 L-リジンの生合成が止まらなくなったと考えられています (図2)。

今日世界中で L-リジンは家畜の飼料添加物を主用途として 60 万トン以上生産されています。本菌株を用いる L-リジンの発酵生産は代謝制御メカニズムを解除してアミノ酸の工業生産を可能にした点で L-グルタミン酸発酵と並ぶ画期的な技術革新であったと言えます。

5. アナログ耐性変異株を用いたアミノ酸発酵の例

先に説明した *C. glutamicum* の ASA から L-リジンへと代謝される経路を欠損させても L-スレオニンの生産菌を誘導することはできません。これは ASA から L-ホモセリンへの反応を触媒する homoserine dehydrogenase の酵素活性が L-スレオニンによって阻害される調節機構が別途存在しているからです。栄養要求変異株によるアミノ酸発酵はアミノ酸生合成調節機構の「隙を突く」とも言える手法であり、「隙が

ない」アミノ酸や菌株では適応が難しい面があります。この難点を解決するためにアナログ耐性変異株が用いられる方法が考えられました。

1969 年に味の素の椎尾と中森によって発表された *Escherichia coli* の L-スレオニン生産菌株の誘導を例に取って説明します。AHV (α -amino- β -hydroxyvaleric acid) は大腸菌の生育を阻害し、その生育阻害は L-スレオニンの添加によって回復します (図3)。

AHV の化学構造が L-スレオニンと似ているので AHV は L-スレオニンのアナログであると言います。AHV が L-スレオニンと同様に「偽のフィードバック阻害: false feedback inhibition」をおこし、L-スレオニンが菌体内に充足した時と同じ様に L-スレオニンの生合成が停止します。その結果 L-スレオニンの欠乏のために生育が阻害されてしまうのです (図4)。AHV による生育阻害が L-スレオニンの添加によって回復することは AHV による阻害の仕組みを良く説明しています。*E. coli* から AHV 存在下で生育可能になった変異株 (AHV 耐性変異株) を取得すると、L-スレオニンの生合成が AHV によって阻害されなくなり、AHV 存在下で L-スレオニンを添加しなくても生育できるように変化した変異株が取得できます。AHV と L-スレオニンが L-スレオニン生合成経路を同様に阻害しているため、この変異株は L-スレオニンの存在によっても L-スレオニンの生合成が停止しせず L-スレオニンを過剰生産すると期待されます。実際にそのような株が取得され、L-スレオニン生産菌が得られました。*E. coli* の AHV 耐性株では L-スレオニンによっ

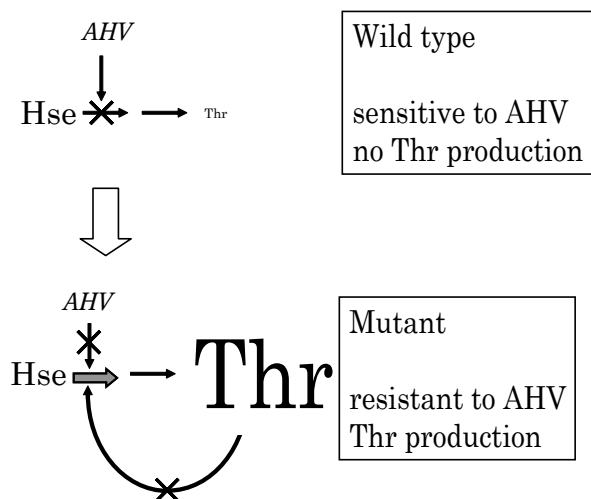


図4 Growth inhibition by AHV and L-Thr production by AHV resistant mutant (AHVによる生育阻害とAHV耐性株によるL-Thr生産)

てフィードバック阻害を受ける aspartate kinase と homoserine dehydrogenase の複合酵素に変異が入り、L-スレオニンによるフィードバック阻害を受けなくなっていることが判明しました。

このようなアナログ耐性株によるアミノ酸生産菌の育種はL-スレオニン以外にもL-リジン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ロイシン、L-アルギニン、L-グルタミン等のほとんど全てのアミノ酸生産菌の育種に応用されてきました。微生物のアミノ酸生合成経路は複数のメカニズムで複雑に調節されています。色々な種類のアナログを用いて順次耐性株を取得することにより、調節メカニズムを順次解除して発酵生産性を向上させることも可能になりました。

実際に工業的に使用される生産菌は栄養要求変異と多くの種類のアナログに対する耐性変異を持ち、数多くの変異により生産性を高めより純粋なアミノ酸を大量・安価に得られるように育種改良されてきています。

6. まとめ

アミノ酸の工業的な生産では微生物が元から持って

いる自らアミノ酸を作り出す潜在能力を利用しています。今まで説明してきたように変異株を巧みに誘導し、特定のアミノ酸を作る菌株を誘導することができます。微生物の能力と微生物についての生化学的、遺伝学的な知識、そして微生物を改良する技術を組み合わせることによってはじめてアミノ酸を工業的に生産することができるようになりました。

私たちは植物性、動物性タンパク質の双方を主に食糧から摂取しています。動物性タンパク質は飼料の植物性タンパク質に由来していますから、私たちが摂取しているタンパク質は全て植物性タンパク質に依存しています。植物は太陽のエネルギーを利用して炭酸ガスとミネラルと窒素源からアミノ酸、タンパク質を合成しています。植物によるアミノ酸の生合成経路は微生物によるアミノ酸合成経路と概ね同じで、アミノ酸の生合成にエネルギーや還元力が必要な点も同じです。

微生物を利用したアミノ酸の製造では炭素骨格とエネルギーの供給源である炭水化物の合成までを植物で行い、アミノ酸の生合成を微生物で行っていることとなります。技術集約の進んだ発酵工場で行うことでアミノ酸の生産効率は飛躍的に高まりました。効率だけではなく微生物を利用してアミノ酸を製造することではじめて目的のアミノ酸だけを自由に生産できるようになりました。

7. 将来の展望

近年多くの微生物のゲノムが明らかになり、先に述べた方法で育種改良されてきた菌株をさらに改良することだけではなく、今まではアミノ酸発酵の親株として利用されていなかったけれども、潜在的な能力が期待される全く新しい菌株から優れた性能を持つ菌株を育種改良することも可能になってきています。さらに微生物の分離・同定技術の発展により今まで知られていなかった微生物の存在も明らかになっています。このような技術革新が日本で始まり五十年の歴史を経ようとしているアミノ酸発酵の新しい発展に寄与してくれるものと期待しています。