



Production of Vitamin B₁₂ in Genetically Engineered *Propionibacterium freudenreichii*

遺伝子工学的に改良されたプロピオン酸菌におけるビタミンB₁₂の生産

(JBB, Vol.98, No.3, 167-173, 2004)

朴 永哲・山下 光雄*・河原市奈美・阿瀬川 亮・小野比佐好・室岡 義勝

プロピオン酸菌 (*Propionibacterium*) はグラム陽性で、胞子を作らない嫌気性細菌であり、プロピオン酸を主生産物として生成する。その系統樹は大きく2つに分かれ、一つは商業上重要な日常型で、もう一つはヒトの皮膚に見られる皮膚常在菌 (ニキビ菌) である。しかし、プロピオン酸菌に関しての分子生物学的情報はほとんどなく、チーズ、コバラミン (ビタミンB₁₂)、テトラピロール化合物、プロピオン酸生産に重要な *Propionibacterium freudenreichii* を遺伝子レベルで解析することから本研究を始めた。

まずプロピオン酸菌の分子育種を目指して、宿主ベクター系の開発を試みた。約7 kbの内在性プラスミドDNA, pRGO1の全塩基配列を決定し、6つのORFのうち2つは複製には関係しないことを見いだした。pRGO1必要断片にpUC18と選択マーカーのハイグロマイシン耐性遺伝子を連結したシャトルベクター、pPK705を構築した。エレクトロポレーション法を工夫し、世界で初めて高宿主域の宿主ベクター系を開発した¹⁾。

次に、遺伝子発現系を開発すべくpPK705とコレステロール酸化酵素遺伝子をレポーターとして保有するpCVE1を連結し、pPK705COと名づけた。プロピオン酸菌染色体DNA由来のプロモーターライブラリーから、高酵素活性を持つpPK705CO8とpPK705CO138を選択した。組換え菌は最低8日間は安定して高酵素活性が認められた。このように世界で初めてプロピオン酸菌で異種遺伝子の発現に成功した。同じく、ビタミンB₁₂の重要

な前駆体5-アミノレブリン酸 (ALA) の生産性向上を目指し、選択したプロモーター下に *Rhodobacter sphaeroides* 由来のC4経路のALA合成酵素遺伝子 (*hemA*) を連結した。*hemA* 遺伝子を含む組換えプロピオン酸菌は野生株と比較してALAとポルフォピリノーゲン (PBG) の生産量が各々2~8倍、10~40倍増加した²⁾。選択されたプロモーターを分子生物学的に解明した結果、プロモーター領域で保存されているコンセンサス配列 (-35, -10配列) 間に細菌では時として見られる、プロピオン酸菌特有のコンセンサス配列 (-16配列) を見いだした³⁾。

プロピオン酸菌ではビタミンB₁₂の生合成経路が全解明されておらず、関連酵素遺伝子を組換え発現することによって、ビタミンB₁₂の生産量に及ぼす影響を調べた。*hemA* と PBG 合成酵素遺伝子 *hemB*⁴⁾ を新規なオペロンとして発現させた組換えプロピオン酸菌では、PBG から Uroporphyrinogen (Uro) I, III および Coproporphyrinogen III といったポルフィリンが合成され、その総量が8.3 mg/lとなり、野生株に比べて約30倍多くなった。組換え Hema, HemB の高生産はポルフィリンの合成を盛んにしたが、ビタミンB₁₂合成への寄与は1.5倍であった⁵⁾。

そこでUro IIIからAdenosylcobalaminまでの合成に関与する遺伝子をデータベース上で探索し、5つ遺伝子 (*cbiL*, *cbiF*, *cbiEGH*) と、最終産物Adenosylcobalaminを生合成する遺伝子群 *cobUS* も新たにクローニングした。また以前クローニングしたUro IIIからPrecorrin-2を合成する *cobA*⁶⁾ 遺伝子を含めてこれら関連遺伝子を種々な形式で組換えたプロピオン酸菌でビタミンB₁₂量を測定した。その結果、*hemA*⁺, *hemB*⁺, *cobA*⁺を含む組換え菌で最高約1.7 mg/lになった (表1)。これは野生株の約2.2倍である⁷⁾。ビタミンB₁₂は構造が複雑なことから変異株を用いた発酵法で生産されており、我々の生産値より二桁ほど高い。全合成経路の解明、メタボローム解析によってビタミンB₁₂が安価になれば、新たな用途も広がることが期待される。

表1. コバラミン合成関連遺伝子を組換えプロピオン酸菌におけるビタミンB₁₂生産量

プラスミド	組換え遺伝子	ビタミン B ₁₂ (mg/l culture)
pPK705	—	0.77
pCobA	<i>cobA</i> ⁺	1.32
pCbiL	<i>cbiL</i> ⁺	1.00
pCbiLF	<i>cbiL</i> ⁺ , <i>cbiF</i> ⁺	1.46
pCbiEGH	<i>cbiE</i> ⁺ , <i>cbiG</i> ⁺ , <i>cbiH</i> ⁺	1.18
pCobU	<i>cobU</i> ⁺	0.96
pCobS	<i>cobS</i> ⁺	0.98
pCobUS	<i>cobU</i> ⁺ , <i>cobS</i> ⁺	1.00
pKHEM04	<i>hemA</i> ⁺	1.02
pKHEM05	<i>hemA</i> ⁺ , <i>hemB</i> ⁺	1.12
pKHEM06	<i>hemB</i> ⁺	0.82
pKHEM07	<i>hemA</i> ⁺ , <i>hemB</i> ⁺ , <i>cobA</i> ⁺	1.68

- 1) Kiatpapan, P. et al.: *Appl. Environment. Microbiol.*, **66**, 4688 (2000).
- 2) Kiatpapan, P. and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 1 (2002).
- 3) Piao, Y. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 310 (2004).
- 4) Hashimoto, Y. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 385 (1997).
- 5) Piao, Y. et al.: *Appl. Environment. Microbiol.*, **70**, 7561 (2004).
- 6) Sattler, I. et al.: *J. Bacteriol.*, **177**, 1564 (1995).
- 7) Piao, Y. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 167 (2004).

* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 (助教授) E-mail: yamashita@bio.eng.osaka-u.ac.jp