2009年 生物工学賞 受賞



生物プロセスシステムの 最適化に関する研究

塩谷 捨明



Optimization of bioprocess systems

Suteaki Shioya (Department of Applied Life Science, Graduate School of Engineering, Sojo University, 4-22-1 Ikeda-cho, Kumamoto-city, Kumamoto 860-0082) Seibutsu-kogaku 88: 2–10, 2010.

1. はじめに

生物機能を利用した製品が工業化され生産されるためには、生産システム(生物プロセスシステム)の最適化は不可欠な道程である。生物プロセスシステムの最適化は、与えられたプロセスを品質や環境影響に対する仕様を満足しつつ最も経済的に設計運転することと理解される。しかし、設計の原点に返れば、プロセス仕様をも含めて合理的に設計されねばならない。筆者はこのような観点に立って、生物機能を利用した有用物質生産プロセスの上流から中流・下流プロセスまでを最適化する方法(生物プロセスシステム工学)について研究してきた。個々のテーマは図1を参照していただければわかりやすい。本稿ではこれらの研究について概説したい。

2. プロセスモデリングと最適化・制御

2-1. モデリング 時系列的にまとめれば、まず微生物反応プロセスの最適化と制御に研究の中心をおいた. すなわち、まず微生物反応プロセスのモデリング¹⁾とパラメータ推定の方法論を確立し、またパラメータ感度や推定誤差を考慮した設計余裕の見込み方などについて研究した. また、活性汚泥水処理プロセス²⁾と有機酸発酵プロセスのモデル化と最適化について研究した³⁾. さらに気泡塔バイオプロセスのモデル化⁴⁾についての研究を行い、これら方法論を微生物プロセス以外の古紙回収シ

2

ステムにも応用し5)、成果をあげた.

2-2. 最適化と制御 次に培養プロセス操作の中心をなす回分,流加(半回分)培養系における最大生産^{6,7)}について最適解の発見とその証明⁸⁾,それを実現する制御システムの設計論を展開してきた.最適解は菌体増殖期と目的生産物生産期との二段切り替えという至極当たり前の解であるが,これが理論的に保証されたことは大きな成果であり,その後理論適用範囲のより一般化に成功している⁹⁾.次に研究の中心をこの最適生産方法を実現できるような運転制御方法の研究に移し.流加培養系

上流プロセス

●育種

 代謝工学、網羅的解析 に基づく効果的な分子育種 浸透圧耐性酵母など (25,26,27)

- ●システム構成 - 共培養システムの検討 乳酸菌・酵母の共培養 (30,31,32,33)
- リク・ノセルロース分解系 (34,35)

中流プロセス

- ●設計 ・モデル化と最適化
- (1,2,3,4,5) ・流加培養系での最大生産 微生物、動物細胞培養による 種々の有用物質生産 (6,7,8,9,12,13,14,15,20,21,22,23,24)
- ●運転・制御
 - 流加培養系の制御 ファジー制御、モデル予測制御 適応制御、加マンフィルター 繰り返し学習制御 (10,11,16,17) ・異常診断 ANNによる異常診断と連転 (18,10)
- ●分離を含むプロセス構成 ・表層提示系の利用 (28,29)

図1. 生物プロセスシステム最適化の研究テーマ

著者紹介 崇城大学大学院工学研究科応用生命科学専攻(教授) E-mail: shioya@life.sojo-u.ac.jp

下流プロセス

●アフィニティー分離

・リガンド選択の基礎

特有のフィードフォワード・フィードバック制御システムを確立した¹⁰⁾. これらの方法論を種々の生物プロセス,アミノ酸生産,抗体生産,生理活性物質,抗生物質,生分解性ポリマー生産,遺伝子組換え菌による外来タンパク質の生産などのプロセスに適用し、実証してきた¹¹⁻¹⁷⁾. また制御ほどの正確さを要求はしないが、ほぼいつも通り正常にプロセスが稼働しているかどうかの判断(一種の異常診断)への方法論も確立した^{18,19)}. この二段培養について今一度まとめておこう.

2-3. 二段培養の合理性 与えられた操業時間内で、いかに大量の製品を生産するかは、工業生産の目標の一つである.ここでは「運転時間 t_f と初期条件が与えられたとき、得られる生産量を最大にすること」を考える.すなわち、評価関数 f を

J={tfにおける反応器中の全生産物量−

生産物量の初期値》(1)

と定義し、このJを最大にすることを考える。この場合、 生産物の単位時間あたりの生産量、すなわち生産速度は、

生産物生産速度=比生産速度
$$(\rho(\mu)) \times$$
 菌体量 (2)

と表せる. 反応速度がすべて菌体量に比例するのが微生物反応の特徴であり, 菌体増殖速度も菌体量と比増殖速度に比例する. さて, ある期間にできる生産物量は生産速度を時間について積分すればよい. すなわち (1) 式のJは (2) 式の定積分値になるので, これを改めて書き直すと,

$$J = \int_0^{t_f} \text{比生産速度×菌体量} dt \tag{3}$$

この積分値を考えると、比生産速度や菌体量は大きく(多 く) なるほど有利なことがわかる. 比生産速度を上げる 条件と菌体量を増やす(比増殖速度を増やすと言い換え ても良い)条件が一致する場合の話は簡単で、この条件 を目標に制御すればよいことは自明である. 問題は比生 産速度を上げる条件と増殖速度を上げる条件が一致しな い場合である. たとえば、横軸に代表的な培養環境条件 である制限基質濃度をとって縦軸に比増殖速度、比生産 速度をプロットした場合、異なる基質濃度のところにそ れぞれの最大値があることを想定していただきたい. ど んな基質濃度を保つのが最大生産量を得ることができる のか自明ではない. この問題を解く従来法は、比生産速 度や比増殖速度を環境濃度(たとえば制限基質濃度)の 関数と表現し、望ましい環境濃度(パターン)を実現す るような流加速度を求めるものである. しかし、この解 は、それぞれの関数を表現するため実験データから求め られる多くの未知パラメータを含むことが多い. ここで 多くのパラメータを含めば含むほど最適解が本当に現実 の解となるか疑問となり、信頼度が下がってくる. すな わち、モデルと実プロセスとのギャップが問題となる.

モデル化の困難性は、主に反応槽内環境濃度変化を記述しようとしたことに起因するので、筆者らはまったく違った観点から最適化の実現をはかろうとした。すなわち、培養状態を表現する状態量として比増殖速度 μ や比生産速度 ρ をとり、これらの量を被制御量や操作量などの変数と捉えていこうというのが基本的な考え方である δ と結局、最適な環境濃度パターンを実現するのではなく、反応速度 μ や ρ の最適なパターンを求め、これを培地流加量変化によって実現していこうと考えた。その後、この考え方はもっと一般化されて、筆者らのグループでは最大生産量問題に広く応用してきたので、次にその概略を紹介する.

この問題の理論解は最大原理を用いて解ける. 以下に 結果だけを紹介し、詳細は別稿8,9)を参照願いたい、い ま、図2に示すように $\mu-\rho$ 平面において、右下がりの傾 向を持つデータがあったとしよう. このような状況には しばしば遭遇する. たとえば. 菌体生産に適した条件と 生産物生産に適した条件は異なるのが普通である. すな わち、比生産速度最大を与えるµcと、比増殖速度最大を 与える μmax が異なって存在する場合には(3)式 被積 分項の要素、比生産速度と菌体濃度を両者とも最大にす るμは存在しない、結局この場合の結論、理論解は、培 養前半は $\mu = \mu_{\text{max}}$, 培養後半は $\mu = \mu_{\text{c}}$ の二段切り替え培 養が最適であることになる8). 培養前半は菌体増殖が最 大, すなわち増殖フェーズ, 培養後半は生産速度最大, すなわち生産フェーズと名づけ、最大生産の最適解は (増殖フェーズ+生産フェーズ)の二段培養と結論づける ことができる. 非常に単純な答えであり、また美しい答 えでもある. "Simple is best"ともいえ,正解は単純で あるという科学の法則を実感する.

この理論解は、 μ - ρ 平面において上に凸な多面体のようなデータが与えられる場合にも拡張でき、一般解が求められる。このとき、多面体の端点を次々と採る操作が最適となり 20)、最終は $\mu = \mu_c$ で終わる。また、この直線上を連続的に移動できる操作方法がなくても良いことに

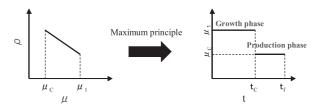


図2. 二段培養による最大生産

2010年 第1号 3

注意したい。まったく種類の異なる操作で多面体の端点から端点に飛ばすことができれば最適解という点では何の問題もない。したがって、 ρ を μ の線形関数で近似するという概念はどこにも使っていない。

このような最適化のアプローチは、グルタチオン発酵²¹⁾、ヒスチジンやリジンなどのアミノ酸発酵^{12,22)}、生分解性ポリマー PHAs生産^{17,23)} などに適用され、成果をあげている。また必ずしも流加培養系だけではなく、温度感受性遺伝子組換え酵母を用いたイネ由来 α -アミラーゼ生産の回分発酵における最適な培養温度パターンの決定にも有効に利用されている。

1)流加培養によるグルタチオン最大生産 上述のアプローチに基づく最適生産の例として Saccharomyces cerevisiae を用いたグルタチオン (GSHと略す)生産をあげる. GSHはアミノ酸のトリペプチドで医薬品原料として用いられている. 指数流加培養実験から比増殖速度と比グルタチオン生産速度との関係が得られる $^{21)}$. なお, GSHは菌体内に蓄積される. ある比増殖速度の値 μ cを境に比生産速度が減少するのは、糖の過剰流加による Crabtree効果によってエタノールが生成することに起因するものと考えられている. さて、この酵母の培養では、糖濃度を変化させることによって、データ点間を移動させることができるので、GSH最大生産のためには μ を μ_{\max} から μ_{c} へと変化させるのが最適なことは今までの議論から明らかである.

2) 遺伝子組換え酵母によるイネa-アミラーゼの生産 培養温度による組換え遺伝子の発現制御を可能にした株では、培地中の無機リン酸濃度が非常に低い (P枯渇) 状態で温度を下げることによってイネアミラーゼ遺伝子が 発現され生産される。この系で、培養温度とリン酸濃度 をいろいろと変化させた状態で回分培養した時の実験 データを μ - ρ 平面にプロットしたのが図3である。無機

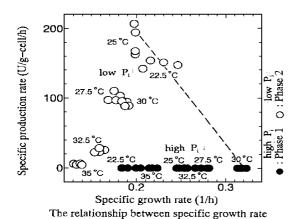
リンの充分な存在下で温度を変えたデータ(\bullet)と P枯渇下で温度を変えた実験データ(\circ)をプロットしている. この図から、わずかな差ではあるが、2回の切り替えが厳密に最適であることがわかる 9,24 .

3. 上流プロセスの最適化, 育種

3-1. 網羅的解析に基づく分子育種に関する研究一酵母代謝経路モデリングに基づく育種 酵母 S. cerevisiae は古くから醸造、食品製造などに多く利用されてきた微生物であり、遺伝子組換え技術、宿主ベククター系の開発、流加培養プロセス開発など、物質生産のための汎用微生物としての条件を備えている。また、有用微生物の中でもゲノムが非常に早い段階で解読されたこともあり、遺伝子発現アレイシステムの開発、ゲノムデータベースの整備など研究分野でも多大な蓄積のある生物種である。

筆者らのグループでは、汎用微生物を用いて有用物質生産を目的とする際に、どのように微生物を改変し、どのようにプロセス開発を行えばよいかを細胞モデリングを通して体系的に確立することを目的とした技術開発研究を行っている。ここでは、一つの具体例として高浸透圧耐性株の育種を目標とし、各階層のネットワークの特徴づけ、相関関係の解析を行い、高浸透圧条件下を表現できる酵母代謝経路モデルの構築とその育種を行うこととした^{25,26)}.

1) モデリング技術の開発 筆者らが提唱した技術開発手法の概要を図4に示す.物質生産を目的とした場合,科学的な研究の興味のみならず,目的物質の生産収率,生産性の向上,副生物質の削減などが体系的に実行されることが望まれ,そのために必要な新しい細胞機能を賦与したり、冗長不要な機能を削除したりした細胞創製が必要となる.また,これを実現できるような微生物



and specific production rate

図3. 比増殖速度と比生産速度の関係

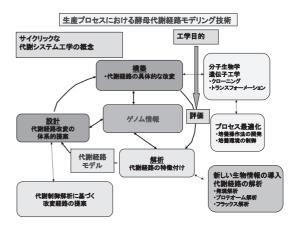


図4. サイリックな代謝経路モデリングによる最適化の概念

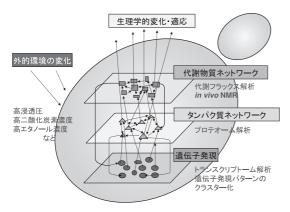


図5. 多階層的ネットワークと代謝経路モデリング

機能を持たせる工学的設計も微生物創製技術として重要 である.

図4には細胞モデリングを基盤としたサイクリックな手順による微生物創製とプロセス最適化の手法を示している。与えられた目的達成のため、必要代謝経路を記述するためのモデル開発、モデルによる代謝経路改変の提案、その実現と創製微生物の能力を最大限発揮できるプロセス開発と創製微生物の最終評価、必要ならば更なる改変を、というサイクリックな手順を示している。このアルゴリズムを具現化する際には図5に示したように、細胞内での、ゲノム、トランスクリプトーム、メタボロームという多階層ネットワークがどのように相関して代謝ネットワークが変化するかを明らかにすることが最も重要と考えられ、これを表現できるモデルの構築が必要である。

図4の方法論では、サイクルが回るにつれてモデル精度が上がり、より精緻なモデルが作られていく。そして最初に立てた工学目的にかなった時、代謝経路モデルは完成する。原理から言えばこれはあくまで一つの工学目的にかなった代謝経路モデルであって、その工学目的が変われば、モデルの検証・修正を余儀なくされる。したがって、基本的には終わりのないエンドレスの作業が続くということになるが、実際上はいろいろな目的でモデルを積み重ねていけば、いわゆる積み上げ方式で到達できるモデルに近づいていくことになろう。

以下では、一つの具体例として高浸透圧耐性株の育種を目標とし、遺伝子発現、タンパク質発現、代謝産物各階層のネットワークの特徴づけ、相関関係の解析を行い、高浸透圧条件下を表現できる酵母代謝経路モデルの構築とその育種を行うこととした。そのため、実験室酵母 S. cerevisiae FY834 株(MAT・his・200 ura3-52 leu2・202 trp1・63)(以下、実験室酵母)および高浸透圧ストレスに耐性を示す日本酒醸造酵母 S. cerevisiae IFO2347

株(協会7号酵母)(以下,醸造酵母)を用い,高浸透圧条件下で得られる細胞の状態や代謝の変化を,標準的な好気撹拌培養系のものと比較し,遺伝子発現やタンパク質発現の網羅的解析,代謝プロファイルの解析を行うことにより,どのような遺伝子発現の変化により,どのような代謝フラックス変化がもたらされるのか,また希望の代謝プロファイルや表現型を得るためにはどのように微生物創製を行えばよいかを解析できるシステムの開発を行っている.

2) 代謝システム解析 網羅的遺伝子発現解析実験 結果の一例を図6に示す、これは、実験室酵母において、 終濃度 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 Mになるよう NaClを添加し て培養したときの遺伝子発現の変動を DNA マイクロア レイで解析したものである. さまざまな濃度の NaCl を 添加してからの遺伝子発現の変動を NaCl 添加直前の各 遺伝子の発現を基準にして比較し、横軸に NaCl 添加前 の各遺伝子の発現量の対数を縦軸に NaCl 添加後の発現 量の対数をとった scatter plot である。 傾き1の直線を基 準にどの程度ばらついてプロットが存在するかで NaCl 添加による遺伝子発現の変動を評価することができる. 0.25-0.5 MのNaClを添加した場合は、NaCl添加後15分 で浸透圧の変化に応答して遺伝子発現を変動しその後変 動が小さくなっていく様子が観察された. それに対して. 1 Mという高濃度のNaClを添加した場合には、NaCl添 加後すぐには浸透圧の上昇には応答せず、NaCl添加から 30分経過後に遺伝子の発現が開始され、60分後でその変 動が最大となり120分後には変動が収束する様子が観察 された. 以上のような傾向は、個々の遺伝子の発現につ いても見いだされた.

中央代謝経路の酵素をコードする遺伝子の発現に着目 すると、実験室酵母、醸造酵母ともに解糖系や酢酸やエ タノール合成系酵素の遺伝子の発現上昇が観察された.

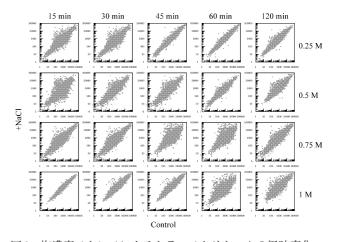


図6. 塩濃度ストレスによるトランスクリトームの経時変化 (実験室酵母)

2010年 第1号 5

	FY834(実験室酵母)		IFO2347(醸造酵母)	
	0.5 M NaCl 添加	1 M NaCl 添加	0.5 M NaCl 添加	1 M NaCl 添加
解糖系路	$\; \Longleftrightarrow \;$	\iff	$\qquad \Longleftrightarrow \qquad$	\iff
ペントースリン酸経路	$\qquad \Longleftrightarrow \qquad$	$\; \Longleftrightarrow \;$	$\; \Longleftrightarrow \;$	\iff
グリセロール合成	1		1	Î
エタノール生成		•	1	1
酢酸生成	1		•	1
TCA サイクル	1	1	1	①

↑, NaCl 添加後上昇; , NaCl 添加後減少; ⟨二⟩, NaCl 添加後変化小.

また高浸透圧環境下で細胞内に蓄積されているグリセロールやトレハロースの合成や分解にかかわる酵素の遺伝子の発現上昇が認められた。実験室酵母ではグリセロール合成にかかわる GPDI やトレハロース合成にかかわる TSLI やTPS2, 酢酸合成にかかわる ALD2, ALD3 において、NaCl 添加により 50 倍以上の発現上昇が観察されたが、醸造酵母のこれら遺伝子ではこうした高い発現上昇は認められなかった。

同様な高浸透圧下におけるタンパク質発現網羅的解析を二次元電気泳動により行った.詳細は省くが中央代謝経路に関与するタンパク質の発現をみると、実験室酵母でも醸造酵母でも、グリセルアルデヒド-3-リン酸からホスホエノールピルビン酸までの経路を担う酵素のタンパク質発現量はNaCl添加前も後もほとんど変化は見られず、DNAマイクロアレイを用いた発現解析データやフラックス解析のデータとも一致していた。ただし、グリセルアルデヒド3リン酸からグリセロール合成へ向かう経路の最終反応段階を触媒する酵素であるGpp2pの発現量が唯一増加していることが明らかとなった。

代謝フラックス解析するため、S. cerevisiae の中央代謝経路における化学量論バランスを基軸とした細胞モデルを、酵母培養系の代謝経路第1世代モデルとして構築した。また、in vivo NMR 解析結果より培地中に添加されたグルコースは数分のレベルでエタノールなどの代謝物質に変換され、検出されたことから、本研究では基本的に応答遅れを考慮しない化学量論モデルを基礎にすることが妥当であると判断した。フラックス解析から両株においてストレスを与えた後グリセロール合成系のフラックス上昇に共通した変化が見られることが分かった(表1).

3) 代謝経路モデリング技術 本研究の大きな目標

の一つは、DNAマイクロアレイなどのバイオインフォマ ティックデータを基礎に代謝経路改変の合理的設計を行 うことはできないか、という点にある. これまでに、こ の目的に対し、自己組織化マップ (self organizing map: SOM) の基本設計を行い、その有用性をインターネット 上に公開されている出芽酵母の同調培養により得られた 遺伝子発現プロファイルデータに適用し、基本的な有効 性を確認した. この手法をさらに発展させるとともに. 本研究で得られた実験室酵母における高浸透圧条件下で の遺伝子発現データに対して適用した. また. このよう な遺伝子発現データからの情報抽出を行う過程におい て、実験で生じるマイクロアレイ解析データの誤差の大 きさを踏まえて遺伝子発現パターンの類似性を判断する ことが重要であることが分かってきた. 浸透圧ストレス に対する遺伝子発現データを、SOMを用いてさまざまな マップサイズにおけるクラスタリングを行い、赤池情報 量基準(AIC)により適切なサイズを決定した.しかし、 実際のアレイデータには誤差が含まれていると考えられ るので、誤差を考慮した移動距離を階層的クラスタリン グ(群平均法)におけるクラスタ数決定の閾値とし、SOM によるクラスタに適用することで SOM のクラスタ境界 を決定した. この境界が、アレイの誤差を考慮した際、 これ以上分類できない最小のクラスタを示すことにな る. クラスタリングを行った結果. 21個のクラスタが決 定された.

4) グリセロール合成系を増強させた株の構築と評価得られたデータをもとに、図4に示した方法論に従ってサイクルを回し、その評価を行った。DNAマイクロアレイ解析、プロテオーム解析、代謝フラックス解析の結果から、高浸透圧ストレス環境下においてはグリセロール

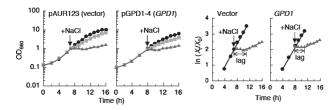


図7. *GPD1* 遺伝子増強による塩濃度耐性の向上. ●, Control; ■, +0.5 M NaCl; ▲, +1 M NaCl.

合成系が強く応答していることが明らかとなった。そこで、グリセロール合成にかかわるグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする*GPD1*遺伝子をPCR増幅して構成的発現プロモーターである *ADH1* プロモーターの下流に連結させたプラスミド pGPD1-4を構築し、構築したプラスミドを実験室酵母FY834株に導入することで、*GPD1*遺伝子発現増強株を構築した²⁷⁾.

構築した株は NaCl 添加という高浸透圧ストレスに若干耐性を示す株であることが示された(図7、lag期の減少)が、細胞内グリセロール合成系は強化されたものの合成したグリセロールの多くは細胞外に排出されてしまうことが明らかとなった。さらなる高浸透圧ストレス耐性を賦与するにはグリセロール排出系の遮断が必要であると考えられる。

以上のように、分子育種に網羅的解析が有効に使える ことが示された.

3-2. 表層提示系の利用 菌体表層を利用して新たな酵素を提示・固定化することは、広い意味での生産株の創製といえる。筆者らはデンプンからのエタノール直接発酵を目的に、酵母表層にいろいろなアミラーゼを提示させ、菌体分離をも考慮した上での実生産に適した表層提示株の検討を行っている²⁸⁾. さらには乳酸菌表層を利用して、効率的な生産プロセスを構成する試み²⁹⁾においても成果をあげている。

4. システム構成に関する研究―微生物共培養系の利用

4-1. 酵母・乳酸菌共生系の利用 我々が古くから発酵食品として利用してきた系では、乳酸菌と酵母の組み合わせは普遍的に見られる。筆者らの研究室ではこのような組み合わせ、特に共生系に興味を持ち、積極的に利用できないかと考えてきた(図8)。本稿では、これまでに検討を行ってきた乳酸菌 Lactococcus lactis subsp. lactis と酵母 Kluyveromyces marxianus の共培養によるナイシン生産系 30,31 および、乳酸菌 Lactobacillus kefiranofaciens と酵母 S. cerevisiae の共培養によるケフィラン生産系 32,33 の結果をまとめ、それぞれ問題点を整理した。

1) 共培養によるナイシン生産系 ナイシンは Lc.

Symbiosis of LAB and yeast

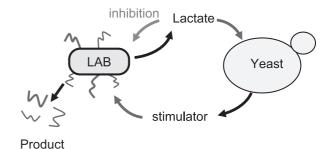


図8. 乳酸菌と酵母の共生による生産向上

lactis が生産する代表的なバクテリオシンで、培養におい ての問題点は、乳酸生成およびpH低下による増殖阻害、 生産阻害である. 筆者らは、生成乳酸を資化するような 微生物との共培養により、どの程度この問題点が解決可 能かの検討を進め、副生する乳酸を酵母によって資化さ せ、ナイシン生産性の向上を図った、乳酸菌と酵母が正 の双利共生関係にあるような系を人工的に構築しようと するとき、まず、それぞれの微生物の糖資化性が問題に なる. そこで. 乳酸菌の糖源として添加するマルトース を資化しない K. marxianus を用いた. 次に、好気か嫌気 かといった培養条件が問題となる、酵母が乳酸を資化す る際には酸素が必要だが、Lc. lactis の場合は好気条件下 でも十分増殖でき、ナイシンを生産した、また、このと き酢酸、アセトインを副生する、Lc. lactis の好気系での 代謝において、酸素は NADH と NAD+ の均衡を図るた め、NADHの酸化に必要と考えらる。事実、生成乳酸・ 酢酸量もしくはアセトイン・二酸化炭素量,消費マルトー ス・酸素量から計算したNADHとNAD+の量は釣り合っ ていることを筆者らは証明している.

この系において、pH を制御するには生成・蓄積した 乳酸量を、酵母による乳酸資化速度を変えて制御すれば よいはずである。酵母の培養における溶存酸素 (DO) 濃 度と乳酸資化速度の関係から DO 濃度を操作することに より乳酸資化速度をある範囲で制御できることがわかっ た、乳酸資化速度を制御できれば、乳酸濃度を制御でき ることも明らかである。

この考え方による pH のカスケード制御系が構成できる. pH制御はDO目標値設定変更を介して行うことができ、DO 制御はジャーファーメンターの撹拌回転数操作によって実現できる. すなわち, 動作だけに着目すれば,「撹拌速度によって pH 制御ができている」ことになる.「風が吹けば桶屋が儲かる…」というような話に聞こえれば, どうして? と興味もわいてくるだろう.

さて図9に示すように、共培養によって乳酸濃度は低

2010年 第1号 7

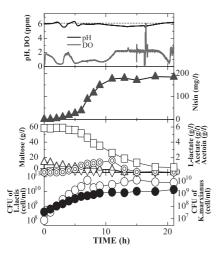


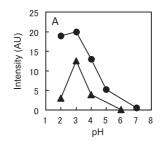
図9. 酵母との共生によるpH制御とナイシン生産. \blacktriangle , Nisin; \triangle , L-lactate; ∇ , actate; \bigcirc , acetoin; \square , maltose; \bigcirc , *L. lactis*; \blacksquare , *K. marxianus*.

く保たれ、培養後半のナイシン生産性の低下が改善された. しかし更なる生産性向上の道はないか、検討の余地は残っている.

2) 共培養によるケフィラン生産系 Lb. kefiranofaciens が生産する天然多糖ケフィランには薬理作用があ り、保湿剤、増粘剤として化粧品に用いられるため、工 業的に生産されている.ケフィランを生産する乳酸菌は、 自然界でケフィール粒内に他の乳酸菌、酢酸菌、酵母な どと共存している. そこで, 乳酸菌の増殖およびケフィ ラン生産を阻害する乳酸を、酵母との共培養によって除 去し、ケフィラン生産性の向上を試みた. また、共培養 におけるケフィラン生産菌と酵母間の相互作用解明のた めのさまざまな検討を行ったところ、この系では、乳酸 除去以外の効果のあることが判明した。すなわち酵母と 乳酸菌がそれぞれの表層にある多糖マンナンやタンパク 質と接着し影響し合っていることが示唆されている。た とえば、乳酸菌純粋培養途中にマンナンを添加すると、 添加しない場合に比べて約1割のケフィラン生産量が上 昇する実験結果を得ている.

また、酵母の表面はマンナンタンパク質によって覆われているので、乳酸菌の表面にはマンナンを認識するタンパク質があると仮定し、それを検証するために、マンナンタンパク質としてインベルターゼを選んだ、インベルターゼは酵母の細胞壁に局在する hyper-glycosylate されたタンパク質で、サブユニットあたり 270 分子のマンノースを含む。予想通り FITC 標識したインベルターゼは酸性 pH で Lb. kefiranofaciens に結合し、その結合は pH 3 で最も強かった(図 10A)。この結合は、酵母由来のマンナンの添加によって濃度依存的に拮抗されたので(図 10B)、FITC 標識インベルターゼは、そのタンパク質

8



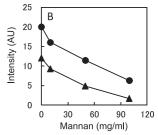


図 10. 乳酸菌表層への FITC 標識インベルターゼの吸着. ▲, Lb. kefiranofaciens JCM6985; ●, Lc. lactis IL1403.

部分でも FITC 部分でもなく、糖鎖部分で乳酸菌に結合していることが示された. *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 においても同様の結果が得られたので、以降の実験では、ゲノム配列が明らかにされているこの株を用いた.

マンナンを認識するタンパク質を同定するため Lc. lactis subsp. lactis IL1403 株を培養増殖させた後、溶菌酵素で処理し、インベルターゼ固定化カラムで分離・精製した。このタンパク質を二次元電気泳動で分離し、ペプチドマスフィンガー法で同定した。分離されたタンパク質のほとんどは DnaK、GroEL などの分子シャペロンや中央代謝系の酵素などの細胞質のタンパク質と同定された。事実、別途調製した DnaK を乳酸菌と酵母の混合物に加えたところ凝集が観察され、乳酸菌と酵母の凝集に重要な役割を果たしていることが示唆された33).

4-2. リグノセルロース系の利用 リグノセルロースはバイオマスの約60%を占め、資源として非常に価値がある。リグノセルロースは、植物細胞壁の主成分であり、セルロースが難分解性のリグニンとの複合体を形成したもので、自然界で安定に存在する。このように強固な構造のリグノセルロースに対して、自然界では、複数種類の微生物が相互作用し合い機能することにより、これを分解する。リグノセルロースを利用する上で、このような微生物集団による分解機構の解明は非常に重要である。

筆者らの研究室では、湖沼の浄化に用いた水生植物 (オオカナダモ)を回収し、コンポストに変換する研究を 行ってきた。その中で、水生植物を原料とした高温コンポスト化では、セルロースが約2週間という短期間で分解されることを見いだした。また、本コンポスト化では 返送を繰り返しても、反応が安定的に進行した。この結果から、本コンポスト化過程には水生植物に土着の微生物で構成される、安定的なセルロース分解細菌集団が存在することが示唆された。そこで、ろ紙粉末や水生植物を主要炭素源とした集積培養からグラム陽性の土壌放線菌 Thermobifida fusca を分離した。ところが、滅菌した水

生植物にT. fusca を単独で播種し、コンポスト化を行った ところ、炭素変換率がまったく上昇せず、セルロースが 分解されなかった. 一方, 滅菌していない水生植物に, T. fusca 単独で播種した場合, 炭素変換率が25%まで上昇 した. これは、土着の微生物の中に、T. fusca によるセル ロース分解を助ける微生物が存在することを示してお り、このような微生物として、前述の集積培養の際に、 優占して天然培地に出現したセルロース非分解菌が候補 として挙げられ、16SrDNAの部分塩基配列などからグ ラム陰性桿菌 Ureibacillus thermosphaericus と同定した. T. fusca および U. thermosphaericus を単独で滅菌した水生植 物に播種しコンポスト化を行ったところ、炭素変換率は 土着の微生物で行ったコンポスト化と同レベルの30% 近くまで上昇し、2種の細菌のみによって、水生植物に 土着のセルロース分解細菌集団の機能を再構成すること ができた34). このコンポスト化再構成系では、2種類の 細菌の間に何らかの相互作用が働いて、セルロース分解 を効率的に行っていると考えられる.

1) コンポスト化再構成系における2種の細菌の相互作用 2種類の細菌がどのように相互作用して、セルロースを分解するか実験調査した結果、T. fusca は U. thermosphaericus がいないと増殖できないが、U. thermosphaericusの増殖にT. fusca はまったく関係していないことがわかった。これらの結果は、2種類の細菌の関係は片利共生的関係であり、U. thermosphaericus が反応初期の短期間に行う何らかの働きにより、T. fusca のエンドグルカナーゼ Cel6A をはじめとするセルラーゼが活発に働くようになり、続いてT. fusca の増殖およびセルロース分解が起こることを示している。

2) U. thermosphaericus の働き U. thermosphaericus の働きによって,水生植物に何らかの変化が生じ,Cel6Aをはじめとするセルラーゼの働きを活発にすると考えられる。そもそも植物では, β -グルコースが重合した高分子の数十本がセルロースミクロフィブリルを形成し,その周囲を難分解性のリグニンが覆っている。この状態では,T. fusca のセルラーゼが結合することは困難である。そこで,U. thermosphaericus がリグニンを分解し,T. fusca のセルラーゼがセルロースへ結合するのを助けるのではないかと推察できる。

そこで第一に、走査型顕微鏡(SEM)を用いて水生植物を観察し、U. thermosphaericus による表面の変化を調べた。U. thermosphaericus を播種したサンプルでの水生植物表面は、低倍率において構造が緩んだ様子が確認され、さらに高倍率では直径数 $10~\rm nm$ のセルロースミクロフィブリルがはっきりと確認された(図11)。ここでは、U. thermosphaericus の働きによってセルロースミクロフィブ

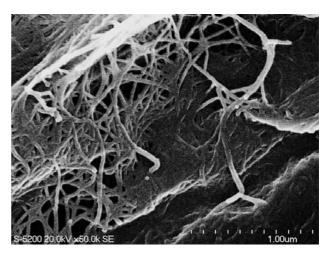


図11. U. thermosphaericus による水生植物表層処理の効果

リルが露出したと考えられる.

第二に、上記の6日目のサンプルに、T. fusca のセルラーゼを作用させた際の糖収率を調べた. 非播種および T. fusca を播種した場合の糖収率は約35%であったのに対し、U. thermosphaericus を播種した場合、約1.7倍の60%となった.

以上、SEM観察およびセルラーゼによる糖収率の結果は、U. thermosphaericus がリグニンを分解し、水生植物のセルロースミクロフィブリルを露出させ、Cel6A をはじめとするセルラーゼがセルロースに結合するのを助けることを示している 34 .

なお、*U. thermosphaericus* は、廃建築資材の酸加水分解 液からのバイオエタノール生産において問題となる発酵 阻害成分の無毒化に有効であることもわかっている³⁵⁾.

5. おわりに

以上述べてきたように、システム構成を含む生物プロセスシステムの最適化という学術分野において、いくつかの成果を残してきた。残された課題はあるが、この学術分野の基礎を築くことはできたものと考えている。また、残された課題は、これまでの研究を支えていただいた共同研究者の方々が継続、新展開を図っていただけるものと期待している。また筆者も引き続き取り組んでいきたいと思っている。

ここに述べた研究成果は私が在籍した、研究の端緒を開いた京都大学化学工学科、主な成果を得た大阪大学応用生物工学科、また現職の崇城大学応用生命科学科において行われたものである。この間、恩師 故高松武一郎先生、菅健一先生、長年の共同研究者で殆どのテーマでご協力いただいた清水浩先生(大阪大学)、最近数年間の研究パートナーであった片倉啓雄先生(大阪大学)、また研究室の助手(助教)として支えていただい

た内山圭司博士,中嶋幹男博士,永久圭介博士,仁宮一章博士,ポスドクだった平沢敬博士,誌面の都合でお名前は省略させていただいた研究室 卒・修了生,共同研究者の皆様には大変お世話になりました。これらの方々の支えなしには本研究は遂行できなかったと思っております。お世話になった方々に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Takamatsu, T., Shioya, S., and Okuda, K.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 131–136 (1981).
- 2) Takamatsu, T., Shioya, S., and Kurome, H.: *AIChE Journal*, **30**, 368–376 (1984).
- 3) Takamatsu, T., Shioya, S., and Furuya, T.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **31**, 697–704 (1979).
- 4) Shioya, S., Dang, N. D. P., and Dunn, I. J.: Chem. Eng. Sci., 33, 1025–1030 (1978).
- 5) Takamatsu, T., Shioya, S., and Tujimoto, Y.: Resources and Conservation, 8, 95–110 (1982).
- Dairaku, K., Izumoto, E., Morikawa, H., Shioya, S., and Takamatsu T.: J. Ferment. Bioeng., 61, 189–196 (1983).
- 7) Chim-anage, P., Shioya, S., and Suga, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 386–391 (1990).
- 8) 塩谷捨明:醱酵工学, 70, 395-404 (1992).
- Uchiyama, K. and Shioya, S.: J. Biotechnol., 71, 133–141 (1999).
- 10) Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K., and Takamatsu, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 276–282 (1989).
- 11) Takamatsu, T., Shioya, S., Okada, Y., and Kanda, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1675–1686 (1985).
- 12) Chim-anage, P., Shioya S., and Suga, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 186–190 (1991).
- 13) Shioya, S.: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, (Fiechter, A.), **46**, 111–142, Springer-Verlag (1992).
- 14) Alfafara, C., Miura, K., Shimizu, H., Shioya, S., and Suga, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 141–146 (1992).
- 15) Young, Y., Morikawa, M., Shimizu, H., and Shioya, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 437–444 (1996).
- 16) 山根恒夫,塩谷捨明編:バイオプロセスの知的制御,共 立出版(1997).
- 17) Chanprateep, S., Abe, N., Shimizu, H., Yamane, T., and

- Shioya, S.: Biotechnol. Bioeng., 74, 116-124 (2001).
- Shimizu, H., Yasuoka, K., Uchiyama, K., and Shioya, S.: J. Ferment. Bioeng., 83, 435–442 (1997).
- Huang, J., Shimizu, H., and Shioya, S.: J. Biosci. Bioeng., 94, 70–77 (2002).
- 20) 塩谷捨明:計測と制御,34,11-17(1995).
- 21) Shimizu, H., Araki, K., Shioya, S., and Suga, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 196–205 (1991).
- Takiguchi, N., Fukui, N., Shimizu, N., Shimizu, H., and Shioya, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 180–184 (1998).
- 23) Ishihara, Y., Shimizu, H., and Shioya, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 422–428 (1996).
- 24) Uchiyama, K., Morimoto, M., Yokoyama, Y., and Shioya, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 262–271 (1997).
- 25) 塩谷捨明:バイオサイエンスとインダストリー, **62**, 240-243 (2004).
- 26) Shioya, S., Shimizu, H., Hirasawa, T., Nagahisa, K., Furusawa, C., Pandey, G., and Katakura, Y.: *Biochem. Eng. J.*, **36**, 28–37 (2007).
- 27) Hirasawa, T., Nakakura, Y., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H., and Shioya, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 346–357 (2006).
- 28) Khaw, T. S., Katakura, Y., Ninomiya, K., Moukamnerd, C., Kondo, A., Ueda, M., and Shioya, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 95–97 (2007).
- 29) Tarahomjoo, S., Katakura, Y., and Shioya, S.: J. Biosci. Bioeng., 105, 503–507 (2008).
- 30) Shimizu, H., Mizuguchi, T., Tanaka, E., and Shioya, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3134–3141 (1999).
- 31) Wardani, A. K., Egawa, S., Nagahisa, K., Shimizu, H., and Shioya, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 274–276 (2006).
- 32) Cheirsilp, B., Shimizu, H., and Shioya, S.: *J. Biotechnol.*, **100**, 43–53 (2003).
- 33) Katakura, Y., Sano, R., Hashimoto, T., Ninomiya, K., and Shioya, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s00253-009-2295-y
- 34) 森岡こころ: 大阪大学工学研究科生命先端工学専攻修士 論文 (2008).
- Okuda, N., Soneura, M., Ninomiya, K., Katakura, Y., and Shioya, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 128–133 (2008).

10 生物工学 第88巻