

日本の発酵工業と代謝工学

臼田 佳弘

20世紀初頭から始まった酢酸や乳酸などの有機酸の工業的発酵生産は現在でも日本の重要な産業であり、ペニシリンやストレプトマイシンを代表例とするさまざまな抗生物質の発酵生産では日本が有数の生産国となっている。発酵工業は、さらにビタミン類に代表される多様な生理活性物質や酵素などの生産に大きく広がりを見せており、さらなる発展が期待される。うま味調味料であるL-グルタミン酸ナトリウムは、1950年代に *Corynebacterium glutamicum* による直接発酵法が発見¹⁾されて以来、全世界での年間生産量が200万トンを超える代表的な発酵工業に成長してきた。その他の多くのアミノ酸もグルコースなどの糖を主たる原料として、*C. glutamicum*あるいは *Escherichia coli* を発酵生産株として用いる発酵法により生産されている。アミノ酸の発酵生産は、従来の変異処理による改良から、遺伝子の増強や欠損を遺伝子工学で行なう時代に入り大きく発酵収率や生産性を向上させてきた。本稿では、日本を代表する発酵工業となったアミノ酸の発酵生産におけるこの10年間の代謝工学の進捗について述べる。

アミノ酸発酵における全ゲノム解析とオミクス解析

1997年にモデル生物であり、かつ多くのアミノ酸の生産にも用いられている *E. coli* の全ゲノム配列が決定され²⁾、2000年以降 *C. glutamicum* の全ゲノム配列が協和発酵とドイツのグループによって相次いで発表されたことで^{3,4)}、情報科学のテクノロジーをアミノ酸発酵に生かすための方法論の開発が進むこととなった。特にゲノム解析とその関連解析技術であるトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析といった網羅的な解析情報を利用して効率的な生産菌の開発が可能になってきた。中でも、トランスクリプトーム解析は、発酵過程における全遺伝子のmRNAの挙動を網羅的に把握するツールの一つとして利用価値は非常に高く、さまざまな利用が可能であり、*E. coli* を用いたアミノ酸などの発酵生産菌の開発研究への応用例⁵⁾、*C. glutamicum* におけるオミクス解析の適用例が多数報告されている⁶⁾。今日ゲノム解析に加えてオミクス解析は、アミノ生産株や発酵プロセス開発に大いに活用される日常的な手法となったと言える。

アミノ酸発酵における代謝フラックス解析

代謝フラックス解析は、代謝工学における重要な解析手法の一つであり、近年その理論と実験手法において、顕著な進歩を遂げてきた。アミノ酸発酵においても代謝の流れをより正確に把握する技術はきわめて重要である。代謝フラックス解析には、化学量論式に基づく代謝モデルのみから種々の予測をする理論的な手法と安定同位体などを用いて実験的に細胞内の代謝フラックスを予測するという二つの手法が用いられており⁷⁾、多数の実例が報告されている⁸⁾。筆者らは *E. coli* を対象としてすべてのアミノ酸生合成経路を含む代謝モデルの構築を行い、この代謝モデルに多変量解析を適用することにより、特定の代謝フラックスがアミノ酸生産に及ぼす影響を理論的に予測した。本手法を用いて、L-リジン発酵に及ぼすマリックエンザイムフラックスの効果を予測し⁹⁾、実験的にもその効果を確認している。

安定同位体化合物を用いた実験的な代謝フラックスの解析においては、合成培地を用いて代謝挙動が定常状態にある連続培養系に対して適用されてきた。一般的にアミノ酸の工業生産には、天然物を含む培地を用いて、細胞増殖を伴うフェッドバッチ培養系が用いられることが多く(図1)、これに対応する代謝フラックスの解析手法の開発が必要であった。

筆者らは、安定同位体ラベルグルコースを基質として、*E. coli* のリジン生産菌のフェッドバッチ培養において増

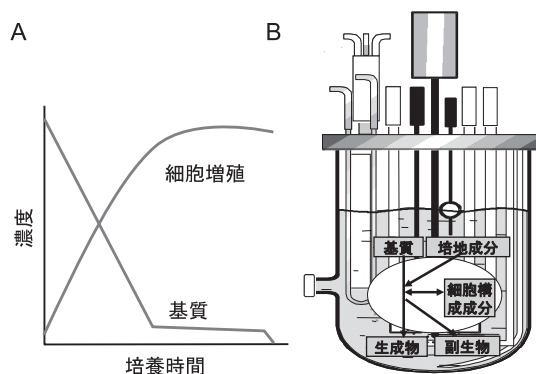


図1. アミノ酸発酵の培養モード。A：基質濃度の時間変化の概念図，B：物質収支の概念図。

著者紹介 味の素株式会社バイオ・ファイン事業本部バイオ・ファイン研究所（主席研究員）

E-mail: yoshihiro_usuda@ajinomoto.com

2012年 第10号

631

殖期と定常期でサンプリングを実施し、これまで行われてきた菌体タンパク質の加水分解アミノ酸に加えて、シリコンオイル/過塩素酸法により抽出した細胞内アミノ酸の同位体分布比率をマススペクトルにより測定した。このデータを基にタンパク質の分解や培地中の非ラベル炭素の影響を補正し、細胞内の代謝フラックスを遺伝的アルゴリズムにより推定した。これにより予測された増殖期と定常期における代謝フラックス分布は、従来の菌体タンパク質の加水分解アミノ酸の同位体分布比率により計算される代謝フラックスよりも精度よく代謝フラックスの変化を検出することが可能となった¹⁰⁾。

アミノ酸における代謝シミュレーション

代謝シミュレーションは、代謝フラックス解析がある時点での静止画であるのに対し、動的に物質代謝を記述できる点でバイオプロセス開発のための有用なツールになることが期待されている。遺伝子の発現制御から酵素の制御までを包括するような代謝シミュレーションシステムを構築し、基質から生成物に至る発酵プロセス全体を精密にシミュレーションする実用的な解析システムを構築できれば(図2)、アミノ酸発酵生産における生産菌株改良や生産プロセス改良に大いに役立つことが期待される。筆者らは、*E. coli*のグルコース取り込み系PTS(phosphotransferase system) 反応モデルを構築し、シミュレーションにより制御機構の解明に取り組んできた¹¹⁾。さらに、アミノ酸発酵のシミュレーションを目指し、ミカエリス・メンテン型をベースとした酵素反応モデルをグルコースPTS、解糖系、ペントースリン酸経路、TCAサイクル、補充経路およびグリオキシル酸経路を

含む*E. coli*の中央代謝系の酵素を対象に構築するとともに、主要な5つの転写因子による遺伝子発現モデルを構築した。増殖を伴う発酵過程のシミュレーションのため、RNAポリメラーゼとリボソーム濃度を比増殖速度の関数として菌体の増殖に応じた遺伝子発現を実現し、*E. coli*野生株のグルコース培養あるいはフルクトース培養でのバッチ培養のシミュレーションを実施した。この際に、生育データの近似関数にて生育を定義して、前項で述べた安定同位体(¹³C)ラベル基質を用いて測定された菌体内アミノ酸の同位体分布比率に基づく代謝フラックス解析結果を*in vivo*の酵素活性としてパラメータのマニュアルでのフィッティングを実施した。もっともシンプルな形質のアミノ酸生産菌であるグルタミン酸生産菌(*E. coli* MG1655 Δ sucA)を用いてグルタミン酸の生産シミュレーションを実施し、感度解析によりグルタミン酸生産に重要な因子を解析するとともに*in silico*での遺伝子欠損実験に成功している¹²⁾。モデル、シミュレーション手法いずれも改良の余地は大きいものの、ラショナルな菌株改良やプロセス改良に向けた基礎となるシミュレーションシステムを構築できたと考えている。

おわりに

アミノ酸発酵にとってこの10年はゲノム情報をベースとした解析技術が大いに進展した時期と言える。これらの新しい技術によって、さらにアミノ酸発酵の菌株改良やプロセス開発が効率化することに加えて、今後発展するであろうホワイトバイオテクノロジーなどの分野において新たな有用物質の発酵生産にも大いに活用されていくことを期待したい。

文 献

- 1) Kinoshita, S. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 193 (1957).
- 2) Blattner, F. R. *et al.*: *Science*, **277**, 1453 (1997).
- 3) Ikeda, M. and Nakagawa, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, (2003).
- 4) Kalinowski, J. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **104**, 5 (2003).
- 5) 今泉, 白田: *生物工学*, **84**, 275 (2006).
- 6) Takors, R. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **129**, 181 (2007).
- 7) Wiechert, W.: *J. Biotechnol.*, **94**, 37 (2002).
- 8) Iwatani, S. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **30**, 791 (2008).
- 9) Van Dien, S. J. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 34 (2006).
- 10) Iwatani, S. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **128**, 93 (2007).
- 11) Nishio, Y. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **4**, 160 (2008).
- 12) Usuda, Y. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **147**, 17 (2010).

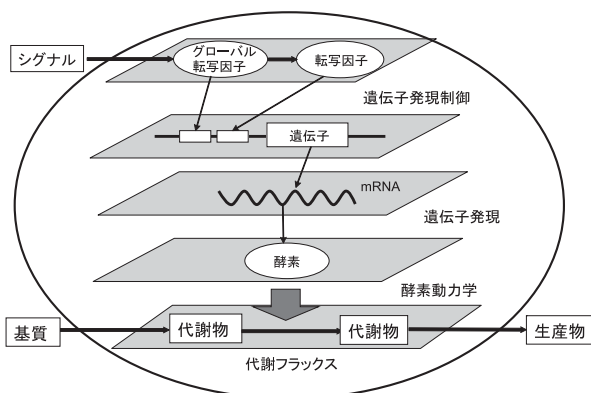


図2. 包括的な代謝シミュレーションのための細胞内動態