

2012年度 生物工学功績賞 受賞



有用物質生産菌の中核代謝強化に関する基盤研究

横田 篤



Basic research on the enhancement of central metabolism in bacteria producing useful metabolites

Atsushi Yokota (*Laboratory of Microbial Physiology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita9 Nishi9, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8589*) *Seibutsu-kogaku* **91**: 294-300, 2013.

はじめに

このたび図らずも生物工学功績賞の受賞の栄に浴した。本稿において受賞内容を紹介する機会を与えられたが、この際、私としては自身と日本生物工学会との関わり合い、受賞研究題目に取り組むに至った経緯など、多少歴史的な面も含めてご紹介することで、読者の皆様のご理解をより一層深め、同時にお世話になった方々への御礼としたい。

日本生物工学会と私

このことについて述べるためには、まず私を応用微生物学の世界に導いてくださった恩師高尾彰一先生(写真)にこの度の受賞をご報告することから始めなければならぬ。先生は1948年に北海道大学農学部農芸化学科をご卒業になり、直ちに同学科応用菌学講座の助手になられ、1970年に教授に昇任され、同講座を担当された。その後、1989年に定年退官されるまで多くの学生を育て、微生物発酵による有用物質生産やバイオマスの有効利用に業績を残された。私は1978年に研究室配属となり、1984年に博士課程を修了するまでの6年にわたり、先生の学生として有機酸の発酵生産や微生物代謝の研究について教えを受けた。当時、先生は50代なかばの脂の乗り切った年齢で、いつも澁刺とされていたことが思い出される。先生が示された指針は「研究の独創性」を重んじること、すなわち「人と同じことをやってはいけ

ない」「新しい学問領域を拓きなさい」であった。先生はよくご自身の研究を例示してこのことを説明された。一例として酵母の代謝に関する研究では、酵母はアルコール発酵に多用されるため嫌気条件での代謝研究が一般的だが、先生は発酵の転換により好気条件ではどのような代謝が営まれるのか、とお考えになり、振とう培養



写真. 恩師 故・高尾彰一先生 (1926年～2008年)
お写真はご退官の頃

著者紹介 北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門微生物生理学研究室 (教授) E-mail: yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

表1. 日本生物工学会の運営などへの関わり

1995～1999年	活動強化委員
1997～1999年	和文誌編集委員, 北日本支部庶務幹事
1999～2001年	英文誌編集委員
2001～2003年	理事 (英文誌副編集委員長)
2005～2007年	北日本支部支部長
2008～2009年	活性化WG委員
2009～現在	理事 (国際交流担当: 現在2期目)
2006～2007年	乳酸菌工学研究部会部会長
2007～2012年	乳酸菌・腸内細菌工学研究部会部会長

によりある種の酵母が有機酸やビタミンなどの有用物質を多量に発酵生産することを発見された。私は「研究の独創性」を肝に銘じ、発酵代謝研究の伝統を継承発展できるように努力してきたつもりであるが、まだ道半ばにも達していない。先生は惜しくも2008年3月にご逝去されたが、今回の受賞は、先生からの叱咤激励が多分に含まれていると理解している。私自身が当時の先生とちょうど同年齢にあることを考えると、自分の未熟さに恥じるばかりであるが、先生のもとで自分が体験したように、学生をわくわくさせながら教育研究を続け、微生物発酵、生物工学の発展に少しでも貢献したいと決意を新たにしている。

もう一つ象徴的なことは、私の最初の論文¹⁾が本会の前身である日本醗酵工学会の英文誌 *Journal of Fermentation Technology* 誌、61巻 (1983) に掲載されていたことである。修士課程での研究成果をまとめたもので、論文のタイトルは “L-Malic acid fermentation by a mixed culture of *Rhizopus arrhizus* and *Paecilomyces varioti*” であった。掲載された時の嬉しさはつい昨日の日のようである。高尾先生により真っ赤になるまで添削された原稿は、私の宝として今も手元にある。

参考までに本会の運営面における私の関わりを表1にまとめた。北日本支部は本会の中では最後に設置された支部で、発足当時は人員不足もあり、若い頃から色々なお役目を頂戴してきた。また研究部会の部会長も長期にわたって担当させていただいた。今回振り返ってみて、改めて本会が自分を育ててくれたことを実感し、歴代の会長、役員、関連の先生方に深く感謝する次第である。

受賞対象研究に取り組むに至った経緯

私は博士課程を修了後、高尾先生のお世話により味の素株式会社中央研究所に職を得て、我が国のアミノ酸発酵の基盤を築いた椎尾勇博士の研究室でグルタミン酸生産菌 *Brevibacterium flavum* No. 2247株 (当時の呼称; 後に *Corynebacterium glutamicum* に統合) の代謝制御

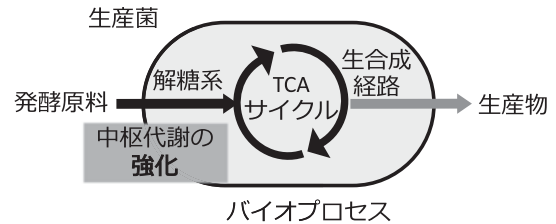


図1. 有用物質生産菌の生産活性強化の方策

の基盤解析を担当する幸運に恵まれた。しかし、わずか5年後の1989年には母校の出身研究室に戻ることとなり、爾後、大学教員として教育研究に携わり、現在に至っている。

大学に戻るに際して研究テーマの設定について考えたことは、「産と学の橋渡し」に資する、しかもサイエンスとしても優れた独創性の高い研究の必要性であった。私は企業での経験を通じて、生物反応を利用して「ものづくり」を行うバイオプロセスにおいては、化学反応に比べて反応速度が遅いこと、しばしば低収率であることなどが実用化の妨げになっていることを実感していた。このため微生物発酵による有用物質生産においては生産菌の物質生産活性を高めることが今後益々重要になると考え、「発酵生産菌の生産活性強化」を大学での研究テーマとして据えることにした。その基本となる考え方は、解糖系やTCAサイクルなどによる中枢代謝の強化により、発酵原料の速やかな消費と前駆体供給の増強を図ることにより生産性を改善しようとするものである (図1)。より具体的には、生産菌におけるグルコースなどの糖の代謝を促進し、短期間により大量の生産物を得るために必要な技術開発を行うことである。発酵生産菌の性能を改善するために、このような汎用性の高い基盤研究の重要性は明白であるが、企業ではこのようなところには十分に手が回らないのが実情である。逆に現場を持たない大学ではそのような着想に至りにくい。したがって、産学両方を経験した者として独自性のある研究が展開できると考えた。また当時、このような研究はほとんど行われていなかったと記憶している。

育種の新たなターゲットとしてのエネルギー代謝

私は本課題の達成に向けて、これまで産業上重要な大腸菌とグルタミン酸生産菌 *C. glutamicum* を対象として研究に取り組んできた。その結果、本課題解決の手段として「エネルギー代謝の制御」が有効であることを見出し、これにより従来のパスウェイエンジニアリングとは次元の異なる「エネルギー代謝」を育種のターゲットとする新しい代謝工学研究を提唱した。

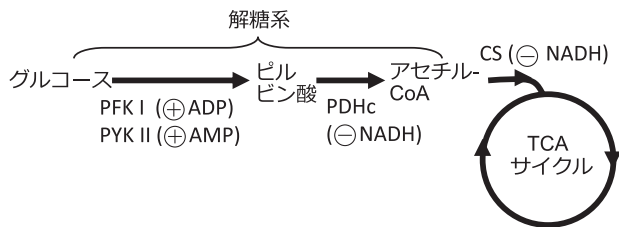


図2. アデニンヌクレオチドやNADHによる解糖系, TCAサイクルの鍵酵素に対するアロステリックな活性調節. PFK I, ホスホフルクトキナーゼI; PYK II, ピルビン酸キナーゼII; PDHc, ピルビン酸脱水素酵素複合体; CS, クエン酸合成酵素; ⊕, 活性化; ⊖, 阻害. 括弧内は活性調節に関わるリガンドを示す.

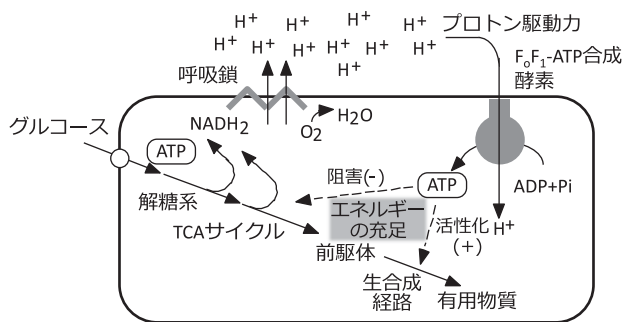


図3. 大腸菌のエネルギー充足度と異化/同化作用の関係. エネルギー充足度が上昇すると, 解糖系やTCAサイクルによる中枢代謝(異化作用)が阻害され, 生合成(同化作用)が活性化される.

研究はまず遺伝生化学的な知見が豊富であった大腸菌を用いてスタートした. 1970年代までの酵素化学的研究から, 大腸菌の中枢代謝(異化代謝)は解糖系酵素(ホスホフルクトキナーゼIおよびピルビン酸キナーゼII)のアデニンヌクレオチドによる活性化^{2,3)}や, ピルビン酸代謝に関わるピルビン酸脱水素酵素複合体およびTCAサイクルの入り口に位置するクエン酸合成酵素のNADHによる阻害^{4,5)}など, エネルギー代謝関連物質によりアロステリックに制御されることが示されていた(図2). これはすなわち, 細胞がエネルギー的に充足すると中枢代謝(異化作用)が阻害されることを意味している(図3)⁶⁾. 一方で, 生合成(同化作用)はエネルギーの充足により活性化されることが示されていた(図3)⁶⁾. これらのことから, 私は細胞のエネルギー充足度を低下させること(ADPやAMP濃度の増大, NADH濃度の減少)により, 大腸菌の糖代謝を活性化できると予想した(図3). そのために取った戦略は, エネルギー獲得の最重要システムである酸化的リン酸化の抑制である. 酸化的リン酸化は呼吸鎖によるプロトン駆動力の形成と, それを用いたF₀F₁-ATP合成酵素によるATP合成の二段階

からなっている(図3). そこで, それぞれのステップをターゲットとして検討した. また, 得られた知見を基に, グルタミン酸生産菌についても検討を開始した.

大腸菌における研究

F₀F₁-ATP合成酵素欠損株 本酵素の欠損株は主として解糖系における基質レベルのリン酸化でしかエネルギーを獲得することができない. このため, 著しい生育の低下が懸念された. しかし, 大腸菌W1485株由来のピルビン酸生産株に応用した場合⁷⁾には増殖速度や最大生育量の低下は懸念した程ではなく, 変異株はグルコース50 g/Lを含む生産培地において親株の6~7割の最大生育量を示した. これは変異株において解糖系が活性化されたためと考えられ, 変異株では菌体当たりのグルコース消費活性が1.9倍, 同ピルビン酸生産活性が2.8倍に増大し, バッチ培養によるピルビン酸生産は親株が培養32時間後に最大25.5 g/Lであったのに対し, 変異株は24時間後に30 g/Lの最大蓄積量となり, 生産効率の大幅な改善が達成された. この成果はエネルギー代謝を育種のターゲットとして有用物質の生産性向上を達成した初めての事例と考えられる. 本酵素の欠損変異は他の研究グループによってもピルビン酸などの発酵生産の効率化に適用されており^{8,9)}, その実用上の有効性が示されている.

その後, 私たちの研究の興味は応用面を離れ, 大腸菌が酸化的リン酸化の欠損によるエネルギー欠乏条件で示すストレス応答の解明に移行した. そこで, この解析のために野生株W1485を親株として単純な本酵素欠損変異株HBA-1を構築し, これらの株をグルコース2 g/Lを含むM9最少培地を用いてグルコース制限条件でケモスタット培養した. その結果, 変異株では親株に比べて菌体当たりのグルコース消費活性と呼吸活性がともに約70%上昇していること, 図4に示すように解糖系フラックスが親株の約2倍に増大していること, しかしTCAサイクルのフラックスは両株ではほぼ同じであること, その分の炭素はアセチルCoAから酢酸として排出されることなどが示された. マイクロアレイ解析などによる遺伝子発現解析により, 解糖系酵素の発現には変動が見られなかったことから, 予想通り解糖系フラックスの上昇はエネルギー充足度の低下によるアロステリックな制御によるものと考えられた. さらにピルビン酸脱水素酵素複合体の発現上昇と多くのTCAサイクル酵素発現の低下が遺伝子発現解析および酵素活性測定によって確認された. これらはアセチルCoAを経由する酢酸の排出を説明するものと考えられた. もっとも興味深い発現変動が観察されたのは呼吸鎖酵素である. 大腸菌の呼吸鎖はブ

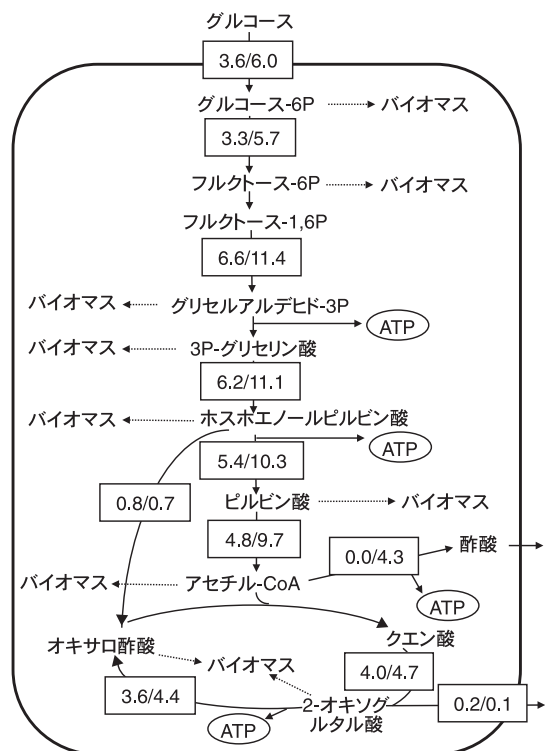


図4. 大腸菌野生株 W1485 株と F₀F₁-ATP 合成酵素欠損変異株 HBA-1 株の中核代謝のフラックス解析. 数値は左が W1485 株, 右が HBA-1 株で, 単位は mmol g⁻¹ (dry cell) h⁻¹ にて表示.

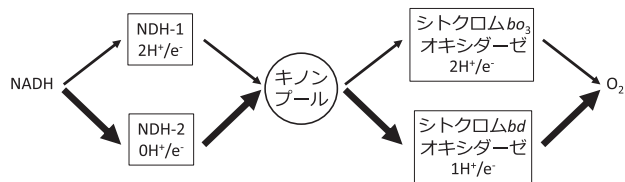


図5. 大腸菌の呼吸鎖成分および F₀F₁-ATP 合成酵素欠損変異株 HBA-1 株において想定される電子の流れ. NDH-1, NADH 脱水素酵素-1; NDH-2, NADH 脱水素酵素-2. 矢印は電子の流れを示し, その太さは電子の流量に対応する. HBA-1 株においては親株に比べて電子の流量が増大しており, その分の電子は NDH-2 とシトクロム *bd*-オキシダーゼを経由すると考えられる.

プロトン駆動力形成能の異なる2つのNADH脱水素酵素 (NDH-1とNDH-2), 同じく2つの末端オキシダーゼ (シトクロム *bo*₃ オキシダーゼとシトクロム *bd* オキシダーゼ) から構成されている (図5). 変異株ではNADH脱水素酵素の総活性が親株の2.3倍に増大し, 遺伝子発現解析および活性測定により, この変化はNDH-2の発現増大によることが分かった. また, 末端オキシダーゼの総活性は1.8倍に上昇していたが, これは遺伝子発現解析およびウエスタンブロット解析によりシトクロム *bd* オキシダーゼの発現上昇によることが示された. これら

表2. 大腸菌の呼吸鎖変異株の発酵特性

菌株	比増殖速度 ^a	糖消費活性 ^a	呼吸活性 ^a
W1485	1.00	1.00	1.00
ΔNDH-I	0.86	1.01	0.87
ΔCytbo	0.80	1.19	1.06
ΔΔ	0.70	1.37	1.20

^a親株の値を1とした相対値

の変化は変異株における呼吸活性の上昇を説明するのみならず, プロトン駆動力形成能の低い呼吸鎖成分の活性を上昇させることにより, 過剰なプロトン駆動力形成による電子伝達の阻害 (いわゆるバックプレッシャー) を回避しつつ, 解糖系の活性上昇に伴い生成が増大するNADHの再酸化を促進する戦略であると考えられ, 誠に興味深い (図5). 以上の解析¹⁰⁾により, これまでまったく知られていなかったエネルギー欠乏ストレスに対する大腸菌の恒常性維持機構の一端が明らかにされた.

呼吸鎖変異株 次に細胞のエネルギー充足度を低下させる手段として, F₀F₁-ATP合成酵素の駆動源であるプロトン駆動力の形成効率を低下させる呼吸鎖変異の導入を試みた (図3). このために構築したのはNADH脱水素酵素と末端オキシダーゼのそれぞれ二つのアイソザイムの内, プロトン駆動力形成能の高い方のNDH-1とシトクロム *bo*₃ オキシダーゼの各々単独の欠損変異株 (それぞれΔNDH-I, ΔCytbo) と, これらの二重欠損変異株 (ΔΔ) の3株である. これらの変異株をグルコース 50 g/L含む最少培地を用い, ジャーファーマンターで溶存酸素濃度を2 ppm以上に保ったDOスタットバッチ培養により培養し, グルコース代謝能を評価した (表2)¹¹⁾. 比増殖速度から推定した見かけのエネルギー充足度は呼吸鎖変異導入により低下し, 特にΔΔ株においてその傾向は著しく, 変異導入に応じたエネルギー充足度の低下が認められた. このとき, 菌体当たりの糖消費活性は比増殖速度の低下とともに上昇し, 予想通りプロトン駆動力形成効率と糖代謝活性の間に逆相関が観察された. しかし糖代謝活性の上昇はΔΔ株でも1.4倍程度で, F₀F₁-ATP合成酵素欠損変異で見られたほど顕著ではなく, 生育の低下も著しいことから, バッチ当たりの発酵時間の短縮には至らなかった. この理由としては, F₀F₁-ATP合成酵素が温存されているためにエネルギー充足度の低下が顕著でなく, さらに呼吸鎖成分の欠損によって糖代謝活性の上昇にバランスするだけの呼吸活性が十分に確保できないことなどが考えられた (表2). しかし, これらの結果は大腸菌のエネルギー代謝と糖代謝の関係を理解するための新たな知見を提供した.

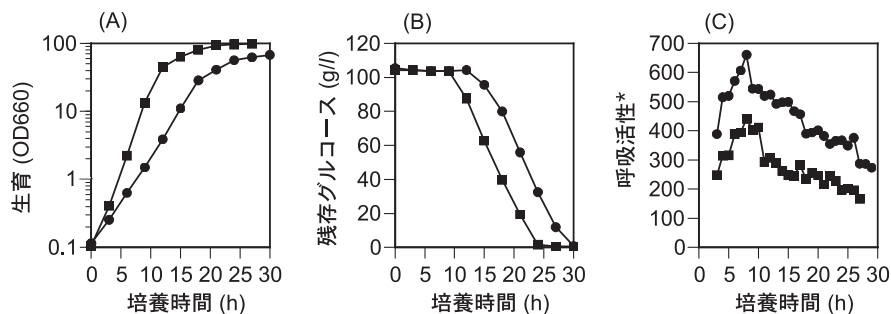


図6. *C. glutamicum* ATCC14067およびそのF₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株F172-8の培養経時変化。(A) 生育, (B) 残存グルコース濃度, (C) 呼吸活性. ■, 野生株; ●, 変異株.
* $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{g dry cell})^{-1}$.

グルタミン酸生産菌における研究

本菌のエネルギー代謝に関する知見は乏しかったが、大腸菌の知見から類推し、F₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株を取得したところ、本菌の場合にも糖代謝活性や呼吸活性が増大することが見いだされた。図6には*C. glutamicum* ATCC14067株(前出の*B. flavum* No. 2247株)から自然変異により分離されたF₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株F172-8¹²⁾を、グルコース100 g/Lを含むグルタミン酸生産培地(ビオチンを制限していないのでグルタミン酸は生産されない)でジャーファーメンター培養した際の培養経過を示した¹³⁾。F172-8株は変異によるエネルギー欠乏により親株に比べて比増殖速度は低下していたが、菌体当たりのグルコース消費活性は親株の2.4倍、呼吸活性は約1.5倍に増大していた。当時、ATCC14067株のゲノムは解読されていなかったため、プロテオーム解析により糖代謝活性の増大機構について検討した。このためにまずATCC14067株のプロテオームレファレンスマップを構築し¹⁴⁾、これを用いて発現量に差異のあるタンパク質を同定した結果、本菌に特徴的なリンゴ酸とオキサロ酢酸間のシャトル反応に共役したNADHの再酸化系[リンゴ酸脱水素酵素(MDH)とリンゴ酸:キノン酸化還元酵素(MQO)]の発現が顕著に上昇していることが見出された(図7)¹³⁾。図8に示したように、*C. glutamicum*においてはTCAサイクルのリンゴ酸とオキサロ酢酸の変換反応にはMDHの他に、通常あまり見られないMQOが関与している。MDHはNADHを酸化してオキサロ酢酸をリンゴ酸へ還元するTCAサイクルの逆方向の反応を触媒しているが、MQOはメナキノン電子受容体としてリンゴ酸からオキサロ酢酸への酸化方向(TCAサイクルの正方向)への変換反応を触媒している。このためMQO/MDHのカップル反応は呼吸鎖と連動したNADHの再酸化系を形成しており¹⁵⁾、この両酵素の発現上昇はF172-8株の呼吸活性の上昇に寄与

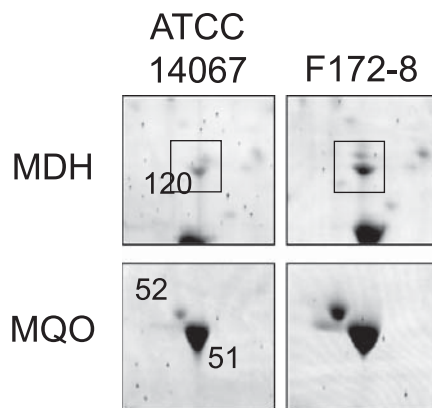


図7. *C. glutamicum*の野生株ATCC14067およびそのF₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株F172-8の対数増殖期の細胞の可溶性画分タンパク質の2次元ゲル電気泳動像。リンゴ酸脱水素酵素(MDH, スポット番号120)とリンゴ酸:キノン酸化還元酵素(MQO, スポット番号51および52)はF172-8株において発現量が増大しているのが分かる。

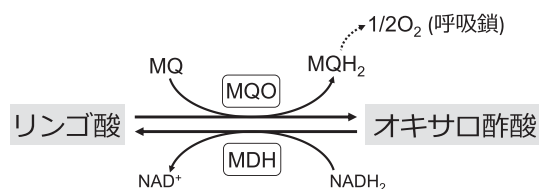


図8. リンゴ酸脱水素酵素とリンゴ酸:キノン酸化還元酵素のカップル反応によるNADHの再酸化系. MQ, メナキノン; MQO, リンゴ酸:キノン酸化還元酵素; MDH, リンゴ酸脱水素酵素.

する変化と考えられた。

その後、解析の精度を上げるために、ゲノム情報が利用できる*C. glutamicum*の基準株であるATCC13032株を親株として、二重相同組換え法によりF172-8株と同じ変異を導入したF₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株A-1を取得した。この株を溶存酸素濃度が2 ppm以上に保たれるDOスタット条件で半合成培地を用いてジャーファー

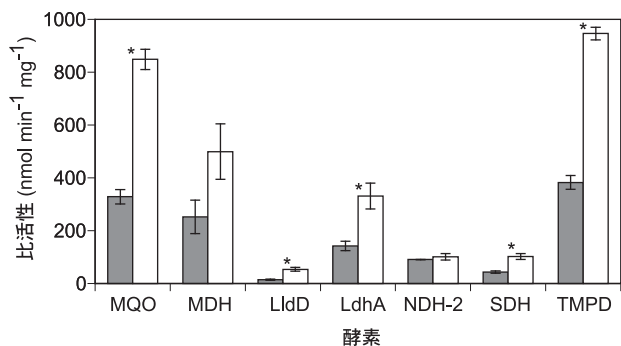


図9. *C. glutamicum* ATCC13032およびそのF₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株A-1における呼吸関連酵素の活性。MQO, MDH, LldD, LdhA, NDH-2, TMPDについては本文を参照。値は平均値および標準誤差 (n=3) で表示。灰色のバーは親株ATCC13032, 白抜きは変異株A-1を示す。**t*-検定により有意差有り (p<0.05)。

メンター培養したところ、F172-8株とほぼ同様の培養特性を示した¹⁶⁾。そこで、マイクロアレイ法などによる遺伝子発現解析と酵素活性測定などの生化学的解析を組みあわせ、特に呼吸活性上昇のメカニズムの解析に注力した。図9には呼吸関連酵素の活性測定結果を示したが、先のMQO/MDHに加えて、L-乳酸脱水素酵素 (LldD)/NAD⁺依存性乳酸脱水素酵素 (LdhA) (ピルビン酸と乳酸間のシャトル反応に共役し、メナキノン電子受容体として呼吸鎖に電子を流すNADHの再酸化系)、メナキノン電子受容体としてコハク酸をフマル酸に酸化するコハク酸脱水素酵素 (SDH)、さらに末端オキシダーゼ [*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) オキシダーゼとして総活性を測定] などの活

性上昇が見いだされた。しかし、本来NADHの再酸化を担うはずの呼吸鎖酵素NDH-2 (大腸菌とは異なり本菌にはNDH-1は存在しない) の活性は変動していなかった。また、これらの結果は遺伝子発現レベルでも確認された。以上の結果から、*C. glutamicum*において糖代謝の活性化により生成が増大するNADHの再酸化は、MQO/MDHやLldD/LdhAのカップル反応など、TCAサイクルやピルビン酸回りの代謝経路の活性を増大させることによって行われていることが明らかになった。また、活性レベルで比較した場合、これらの中ではMQO/MDHの貢献度がもっとも高く、ATCC13032株およびA-1株双方においてNADH酸化活性の7~8割を受け持つものと推定された。さらに、遺伝子発現解析により、末端オキシダーゼにおいては*C. glutamicum*において知られている2つのオキシダーゼの内、プロトン駆動力形成能の低いアイソザイムであるシトクロム*bd*オキシダーゼの発現が上昇しており、大腸菌と同様、バックプレッシャーの形成を抑制する応答が観察された。このように、*C. glutamicum*のF₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株では、NADHの再酸化の促進が主としてTCAサイクル関連酵素の発現増大により達成されていることが明らかになった¹⁶⁾。

大腸菌とグルタミン酸生産菌の代謝変動のまとめ

これまでの研究で明らかになった大腸菌とグルタミン酸生産菌のF₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株の代謝変動に関して、特にNADHの再酸化機構を中心として比較し、図10にまとめた¹⁷⁾。両菌の当該変異株では酸化的リン酸化の抑制によりグルコース消費活性と呼吸活性が増大

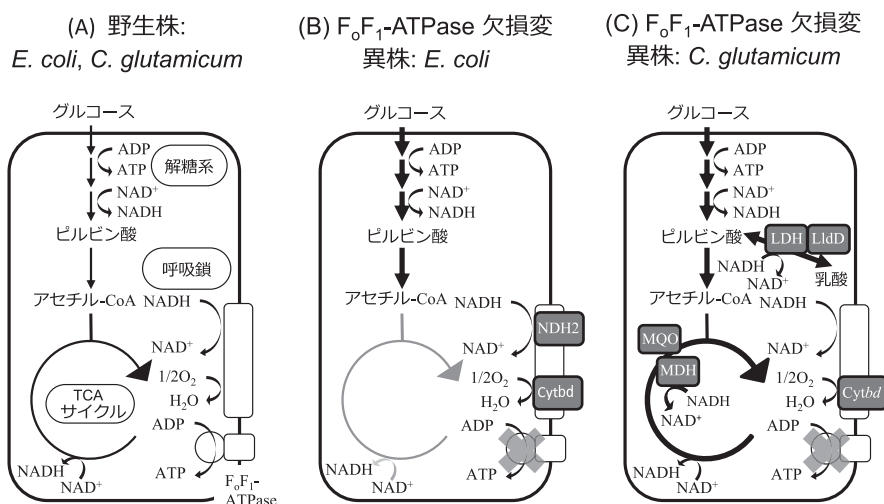


図10. 大腸菌とグルタミン酸生産菌のF₀F₁-ATP合成酵素欠損変異株の中核代謝の変化。変異株におけるグルコース代謝活性の上昇に伴うNAD⁺/NADHのリサイクルの促進機構を中心に示した。代謝経路の矢印線の太さは代謝流量を反映している。大腸菌のTCAサイクルは遺伝子発現が抑制されているので灰色で示した。

するが、この共通の表現型を成立させる代謝変動は両菌間で特徴ある相違を示した。

大腸菌の変異株 (図10B) では、解糖系の流量増大はTCAサイクルの流量へ直接反映せず、遺伝子発現解析からもTCAサイクルを抑制しようとする変化が観察された。また、生成が増大するNADHの再酸化の促進は、呼吸鎖成分NDH-2とCytbdの発現上昇により達成されると考えられた。一方、グルタミン酸生産菌の変異株の場合 (図10C) は、遺伝子発現解析やプロテオーム解析などから解糖系やTCAサイクルの作動はともに活発であると考えられた。またNADHの再酸化はMQO/MDHやLldD/LdhAといった特徴的なカップリング反応と、末端オキシダーゼCytbdの発現増大により促進されていた。

以上の代謝変動を発酵生産菌としての特性から見れば、大腸菌はTCAサイクルの活性を柔軟に調節するため、ピルビン酸に代表される解糖系関連の代謝産物の生産に適しているものと考えられる。一方、*C. glutamicum*ではNADHの再酸化の主役が呼吸鎖のNADH脱水素酵素ではなく、むしろTCAサイクル関連酵素であることが推定された。これは本菌が本質的に頑強なTCAサイクルを持ち、グルタミン酸を含むTCAサイクル関連中間体の発酵生産に適していることを示しているものと思われる。

今後の展望

以上述べてきたように、私はこれまで「産と学の橋渡し」に資する研究課題として「中枢代謝の活性化による発酵生産菌の生産活性強化」をテーマとして、大腸菌とグルタミン酸生産菌を対象として研究を進めてきた。その結果、エネルギー充足度を抑制する変異の導入が本課題達成に有効であることを見出し、エネルギー代謝をターゲットとする代謝工学研究の新しい領域を拓いてきた。たとえば今日の有用物質生産菌の育種研究において、中枢代謝カーボンフローの強化やNADHなどの補酵素リサイクルの円滑化は常套手段となっているが、筆者らの研究がこのような視点を一般化させるために少なからず貢献してきたのではないかと考えている。本項に記した筆者らの一連の研究で得られた知見は、発酵生産菌を育種する上での基盤情報として産業上重要であるだけでなく、学術的な面においても重要である。今後、基礎・応用両面でこれらの知見が有効活用されることを願っている。

謝 辞

本研究を進める中で、大腸菌とグルタミン酸生産菌の呼吸鎖の解析については、山口大学農学部の中野一信教授と共同で進めてきた。中野先生には長期にわたって貴重なご助言をいただいただけでなく、呼吸鎖の成分解析や呼吸鎖酵素の活性測定を分担していただいた。この場をお借りして深甚なる謝意を表します。また、かつての職場であった味の素株式会社中央研究所の関係の皆様には、研究面で多くの示唆をいただき、心より感謝申し上げます。北海道大学名誉教授富田房男先生には、私が大学へ戻った当時の応用菌学講座担当教授としての的確なご助言をいただきました。改めて深く感謝申し上げます。最後に、私の担当する微生物生理学研究室の和田大准教授、吹谷智助教、ならびにこの仕事に粘り強く取り組んでくれたすべての卒・修了生諸君に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Takao, S., Yokota, A., and Tanida, M.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 643–645 (1983).
- 2) Babul, J.: *J. Biol. Chem.* **253**, 4350–4355 (1978).
- 3) Kotlarz, D., Garreau, H., Buc, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **381**, 257–268 (1975).
- 4) Kim, Y., Ingram, L. O., and Shanmugam, K. T.: *J. Bacteriol.*, **190**, 3851–3858 (2008).
- 5) Weitzman, P. D. J.: *Adv. Microb. Physiol.*, **22**, 185–244 (1981).
- 6) Atkinson, D. E., 1968.: *Biochemistry*, **7**, 4030–4034 (1968).
- 7) Yokota, A., Terasawa, Y., Takaoka, N., Shimizu, H., Tomita, F.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2164–2167 (1994).
- 8) Causey, T. B., Zhou, S., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 825–832 (2003).
- 9) Causey, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., and Ingram, L. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2235–2240 (2004).
- 10) Noda, S., Takezawa, Y., Mizutani, T., Asakura, T., Nishiumi, E., Onoe, K., Wada, M., Tomita, F., Matsushita, K., and Yokota, A.: *J. Bacteriol.*, **188**, 6869–6876 (2006).
- 11) Kihira, C., Hayashi, Y., Azuma, N., Noda, S., Maeda, S., Fukuya, S., Wada, M., Matsushita, K., and Yokota, A.: *J. Biotechnol.*, **158**, 215–223 (2012).
- 12) Sekine, H., Shimada, T., Hayashi, C., Ishiguro, A., Tomita, F., and Yokota, A.: *Appl Microbiol Biotechnol.*, **57**, 534–540 (2001).
- 13) Li, L., Wada, M., and Yokota, A.: *Proteomics*, **7**, 3348–3357 (2007).
- 14) Li, L., Wada, M., and Yokota, A.: *Proteomics*, **7**, 4317–4322 (2007).
- 15) Molenaar, D., van der Rest, M. E., Drysch, A. and Yücel, R.: *J. Bacteriol.*, **182**, 6884–6891 (2000).
- 16) Sawada, K., Kato, Y., Imai, K., Li, L., Wada, M., Matsushita, K., and Yokota, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 467–473 (2012).
- 17) 横田 篤, 和田 大: 生物工学, **90**, 621–622 (2012).