

2017年度 生物工学功績賞 受賞

微生物におけるアミノ酸の 代謝制御機構・生理機能の 解析とその応用

高木 博史



Analysis of metabolic regulatory mechanisms and physiological functions of amino acids and their applications in microorganisms

Hiroshi Takagi (*Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192*) *Seibutsu-kogaku* **96**: 12-19, 2018.

はじめに

筆者は1982年に博士前期課程（名古屋大学大学院農学研究科）を修了後、味の素株式会社に入社し、中央研究所に配属された。学生時代には無縁だった微生物の研究に携わることになり、「アミノ酸生産菌の分子育種に関する基盤研究」の一環として、宿主・ベクター系の開発を担当した。当時の上司・中森茂主任研究員（1993年より福井県立大学教授）には「アミノ酸発酵」や「遺伝子工学」のみならず、社会人としての基礎（麻雀、ゴルフ）も厳しく教えていただき、大変お世話になった。入社後2年目には本学会で口頭発表を行う幸運にも恵まれた（昭和58年度日本醗酵工学会大会講演要旨集, p. 284）。

その後、1995年に味の素株式会社を退社し、福井県立大学生物資源学部に助教授として着任した。その際、中森茂教授のご理解をいただき、当時自らの主力テーマ「枯草菌プロテアーゼのタンパク質工学」に加えて、10年ほど離れていたアミノ酸の研究を酵母や細菌で新たに立ち上げることにした。

アミノ酸はタンパク質の構成成分、栄養素・エネルギー源、呈味成分としての働きを有しているだけでなく、細胞内や血漿などに遊離した形で存在し、生体内でさまざまな機能を発揮している。近年、その生理機能が注目され、さまざまなアミノ酸を添加することで、機能性を付与した食品、飲料、サプリメント、医薬品、化粧品などが数多く商品化されている。

筆者は企業から大学に異動後の約20年間、微生物に

おけるアミノ酸の新しい代謝制御機構と生理機能について解析を行ってきた。また、得られた基礎的知見を微生物の高機能開発に資することで、実用株の育種や発酵生産への応用に取り組んできた。

酵母のプロリン・アルギニン代謝による ストレス耐性機構の解析と製パンへの応用

パン酵母（ほとんどは *Saccharomyces cerevisiae* の二倍体）は約1兆4,000億円もの巨大な製パン産業を支える微生物であり、年間で200万トンほど製造されている。多様な製パン法に対応可能なパン酵母の開発は製パン業界における重要な技術である。たとえば、オープンフレッシュベーカリーやコンビニエンスストアでは、製パン過程の途中で生地を冷凍する方法で製造されるパンが多く販売されている（製パン市場の約10%）。また、製パン市場の約4割を占める菓子パンの生地には小麦粉重量あたり30-40%ものショ糖が含まれている。さらに、細胞内の水分含量を下げた製造するドライイーストは長期間の貯蔵や輸送経費の削減を可能にする。このように、パン生地の発酵やパン酵母の生産過程で、酵母の細胞は冷凍（凍結-融解）、高ショ糖、高温乾燥などの多様な環境ストレス（製パン関連ストレス）に曝されている（図1）¹⁾。

一般に、微生物はストレスに適応する能力を備えている。酵母も各ストレスに応答するシグナル伝達経路に関連する遺伝子群の発現を制御することで、シャペロンなどのストレスタンパク質の誘導、ストレス保護物質や適

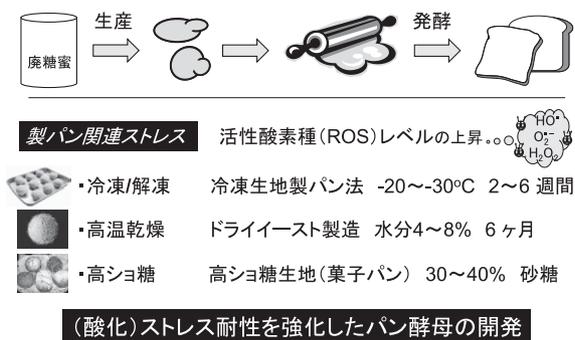


図1. パン酵母の発酵生産プロセスと製パン関連ストレス

合溶質の蓄積, 細胞膜組成の変化, 翻訳の抑制などさまざまな適応機構を獲得している. しかしながら, 過酷なストレス下では, 生体高分子(タンパク質, 核酸, 脂質)の構造や機能が失われるだけでなく, ミトコンドリア膜の損傷, 抗酸化酵素の失活などにより活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)レベルが増加する酸化ストレス状態になり, パン酵母の有用機能(炭酸ガスの発生, 味・風味成分の生成など)の発現が制限される. したがって, パン酵母に高度なストレス耐性を付与することにより, 長期保存可能な冷凍生地や菓子パン生地に適した「冷凍耐性イースト」「高シヨ糖耐性イースト」, 耐久性の強い「ドライイースト」の開発が可能になる¹⁾.

本稿では, 筆者が見いだした酵母におけるプロリン(Pro)・アルギニン(Arg)代謝を介したストレス耐性機構とパン酵母の育種への応用について紹介する.

プロリンの代謝制御機構と生理機能 味の素株式会社での最後の仕事として, 冷凍パン生地会社の設立に関わり, 製パン業界では冷凍に強いパン酵母が求められていることを知った. そこで, 福井県立大学に異動後, 酵母の冷凍ストレス耐性機構の解析に着手した. いま振り返るとやはり「アミノ酸」への愛着があったのであろう. 20種類のアミノ酸の中には酵母を冷凍から保護するものがあると考え, 卒論テーマとして最初の学生を指導した. その結果, Proが冷凍後の酵母の生存率低下を抑えることを見いだした(図2A)²⁾.

Proには, 浸透圧の調節, タンパク質や細胞膜の安定化, ヒドロキシラジカルの消去, 核酸の融解温度(T_m 値)低下などの機能が報告されているが³⁾, ストレス下における細胞内での生理的役割については不明な点が多い. Proは水に対する溶解度がきわめて高く, 細胞内の自由水との親和性が強いいため, おそらく冷凍ストレス下での氷結晶生成や脱水を防ぎ, 細胞を保護していると考えられる(図2B)³⁾.

多くの細菌や植物では, 乾燥や塩などのストレスに応答し, 細胞内にProを蓄積することで細胞内外の浸透圧

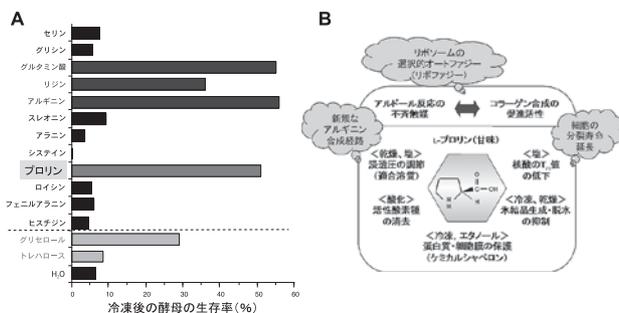


図2. 酵母におけるプロリンの生理機能. A: 各0.5 M溶液に懸濁した酵母の冷凍後(-20°C, 7日間)の生存率, B: プロリンの既知または新規の生理機能.

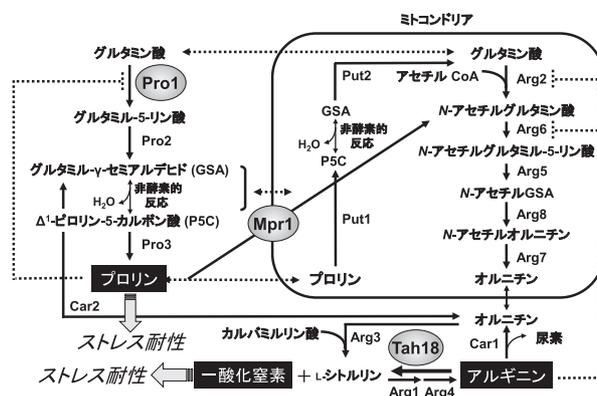


図3. 酵母におけるプロリン・アルギニン代謝経路

を調節しているが, 酵母はストレス時にPro合成を誘導せず, トレハロースやグリセロールを優先的に蓄積する⁴⁾. 酵母において, Proは細胞質で主にグルタミン酸から3種類の酵素[γ -グルタミルキナーゼPro1, γ -グルタミルリン酸レダクターゼPro2, Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸(P5C)レダクターゼPro3]によって還元的に合成される. また一部, Argからオルニチン, グルタミン酸- γ -セミアルデヒド(GSA)を経て合成される. 一方, ミトコンドリアで2種類の酵素(ProオキシダーゼPut1, P5CデヒドロゲナーゼPut2)により酸化的に分解され, グルタミン酸に変換されるため(図3), 野生型株や通常の培養では細胞内のPro含量はきわめて低い.

そこで, アミノ酸生産菌育種の常法に基づき, Proアナログ(アゼチジン-2-カルボン酸:AZC)に耐性を示す酵母の変異株から, 細胞内にProを蓄積する株を分離し, 詳細な解析を行った²⁾. その結果, Pro蓄積株は野生型株に比べて冷凍, 乾燥などに耐性を示すこと^{2,5,6)}, 他の生物と同様にPro1がPro合成の鍵酵素であり, Proによりフィードバック阻害を受けること, Pro1にAsp154Asn, Ile150Thrなどのアミノ酸置換が導入されると, フィードバック阻害感受性が低下し, Proが過剰合成されることを明らかにした(図4A)⁷⁻¹⁰⁾. また,

Put1の遺伝子を破壊した菌株で上記のPro1変異体を発現させると、Pro含量の増加と冷凍耐性の向上が見られた⁷⁻⁹。Pro蓄積株では、冷凍以外の乾燥、酸化、浸透圧、エタノールなどのストレス下でも野生型株に比べて高い生存率を示し、Proの有用性が実証された^{11,12}。

一方、Proの生理機能についても解析し、液胞への局在の重要性¹³、ストレスに伴い上昇するROSレベルの制御¹⁴、リボソームの選択的オートファジー（リボファジー）への関与¹⁵、細胞寿命の延長効果などを示唆する結果が得られた（図2B）。

プロリンとアルギニンの代謝を連結するMpr1 筆者がProの研究過程において、*S. cerevisiae*のΣ1278b系統株をはじめ種々の酵母に発見したMpr1（sigma 1278b gene for proline-analogue resistance）は、AZCをアセチル化により解毒するN-アセチルトランスフェラーゼである¹⁶⁻²⁰。興味深いことに、Mpr1は熱ショック、冷凍、エタノール、過酸化水素、乾燥などの処理で細胞内に生じるROSレベルを制御し、酵母を酸化ストレスから防御している²¹⁻²³。また、Mpr1はROSに直接作用する既知の抗酸化酵素と異なり、P5Cが関与しているROSの発生を抑えるとともに、Proからの新規なArg合成経路に関与することが示された^{24,25}。最近では、Mpr1が酸化ストレス下でArg合成を亢進することで一酸化窒素（NO）の生成を誘導し、酵母のストレス耐性に寄与することを見いだした（図3）^{24,26}。さらに、X線結晶構造解析によりMpr1の新規な立体構造と反応機構を解明するとともに²⁷、ランダム変異導入や分子設計に基づき、活性・熱安定性が向上したMpr1変異体（Lys63Arg, Phe65Leu, Asn203Arg, Asn203Lys）を取得、創製することができた（図4B）^{28,29}。

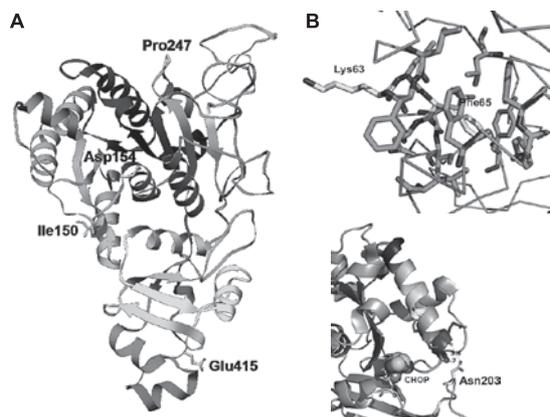


図4. 酵母のプロリン・アルギニン代謝に重要な酵素の構造. A: γ -グルタミルキナーゼPro1（表示した残基はプロリンによるフィードバック阻害に関与）、B: N-アセチルトランスフェラーゼMpr1（表示した残基は触媒活性・安定性に関与、CHOPはヒドロキシプロリン）。

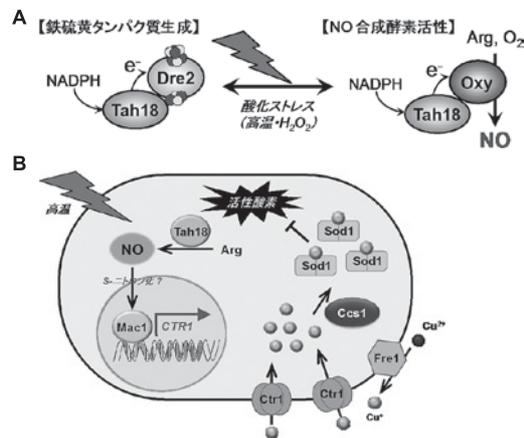


図5. 酵母における一酸化窒素（NO）の合成制御機構と生理的役割. A: Tah18-Dre2複合体による鉄硫黄タンパク質生成（左）とTah18-Oxy（NOSのオキシゲナーゼ様活性を有するタンパク質）複合体によるNO合成酵素活性（右）、B: 酵母におけるNO依存的な高温ストレス耐性機構。

プロリンからアルギニン・一酸化窒素へ NOはシグナル分子としてさまざまな生命現象に関与し、哺乳類ではArgからNO合成酵素（NOS）により生成する。一方、酵母ではゲノム上に哺乳類NOSのオルソログが存在せず、NOの研究は進んでいない。筆者らは最近、高温ストレスに応答し、Mpr1を介して合成されたArgからTah18タンパク質依存的にNOが生成し、細胞の高温ストレス耐性に寄与することを見いだした（図5）²⁶。Tah18はNADPHの電子をDre2タンパク質に渡すことで細胞質の鉄硫黄タンパク質合成に関わるジフラビン還元酵素であるが、NO合成への関与は初めての知見である。また、Dre2がTah18依存的なNOS様活性を阻害すること、酸化ストレス（過酸化水素、高温など）に応答し、Tah18-Dre2複合体が解離することから、Dre2による新規なNO合成制御機構を提唱した（図5A）³⁰。さらに、高温ストレス下で合成されるNOが銅代謝に関する転写因子Mac1を活性化し、銅の取込み系の亢進を介して銅依存型スーパーオキシドジスムターゼSod1活性を上昇させることで、高温に伴って生成するROSを除去し、ストレス耐性に寄与することを明らかにした（図5B）³¹。

パン酵母の育種への応用 上記で得られた基礎的知見を活用し、細胞内でPro1変異体（Asp154Asn, Ile150Thr）（図6A-D）、Mpr1変異体（Lys63Arg, Phe65Leu）（図6C, D）を発現させ、ProやArgの合成系を強化したパン酵母をセルフクロニング法で作製した。その結果、これらのパン酵母は製パン関連ストレス条件下で（冷凍、高シヨ糖、高温乾燥）、野生型株に比べて良好な発酵特性や製パン性を示し、ProやArgがパン酵母の育種に有効であることが実証できた（図6）³²⁻³⁶。

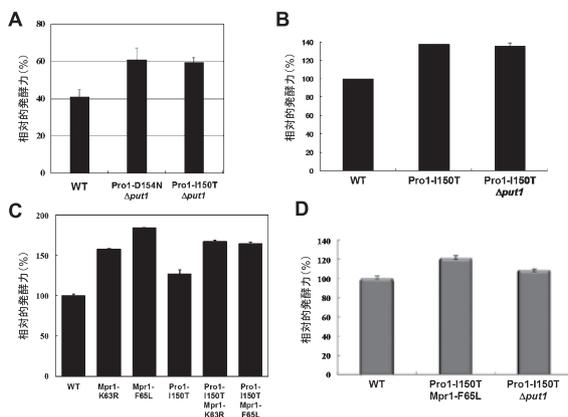


図6. パン酵母の野生型株 (WT) と Pro1 変異体・Mpr1 変異体発現株の特性. A: 冷凍処理後 (-20°C, 9日間) の酵母の相対発酵力 (冷凍前の発酵力を100%), B: 高シヨ糖生地 (小麦粉重量あたり30%のシヨ糖を含む) の酵母の相対発酵力 (野生型株の発酵力を100%), C: 高温乾燥処理後 (37°C, 4時間) の酵母の相対発酵力 (野生型株の発酵力を100%), D: 高温乾燥処理後 (37°C, 90分間) の酵母の相対発酵力 (野生型株の発酵力を100%).

しかし、遺伝子組換え技術に対する社会的受容性が低いため、実用化は困難な状況にある。そこで、古典的な育種技術 (突然変異導入) によって Pro 蓄積パン酵母を分離し、それらのストレス耐性や製パン性を評価した³⁷⁾。その結果、AZC耐性変異株の中から、Pro1の遺伝子に変異が入り (Pro247Ser, Glu415Lys) (図4A)、野生型株に比べて Pro 含量と冷凍・高シヨ糖生地での発酵力が向上したパン酵母を取得した。

酵母のロイシン代謝を介した香気成分の生成能強化と泡盛製造への応用

科学者にとって、地道な研究の成果が実用化されることは大きな喜びである。最近、筆者の個人的な思いでもある沖縄への貢献が「泡盛酵母の開発と商品化」という形で実現した。

沖縄の伝統的蒸留酒である「泡盛」の製造には黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) と酵母 (*S. cerevisiae*) が用いられ、泡盛の風味や酒質に大きな影響を与えている。特に、主要な芳香成分 (高級アルコール、エステル類など) は発酵過程で主にアミノ酸から酵母により生成される。泡盛の製造には、主としてエタノール生産性および芳香性の高い「泡なし酵母 (泡盛101号)」が使用されており、育種に関する研究はほとんど行われていない。したがって、泡盛の品質向上や酒質の差別化には、たとえばアミノ酸の組成や生成量に特徴を有し、泡盛に高香味性を付与できる新しい酵母の育種が重要である (図7)³⁸⁾。

清酒やパンの主要な香気成分 (吟醸香, バナナ様) として知られる酢酸イソアミル (i-AmOAc) とその前駆

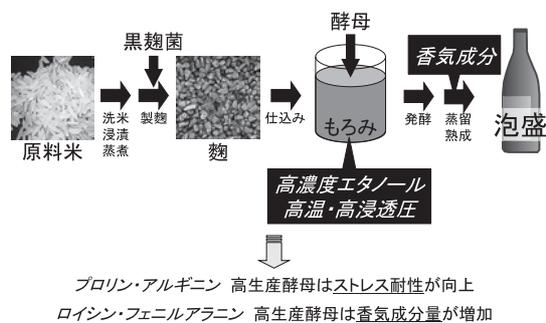


図7. 泡盛の醸造工程とアミノ酸高生産酵母の有用性

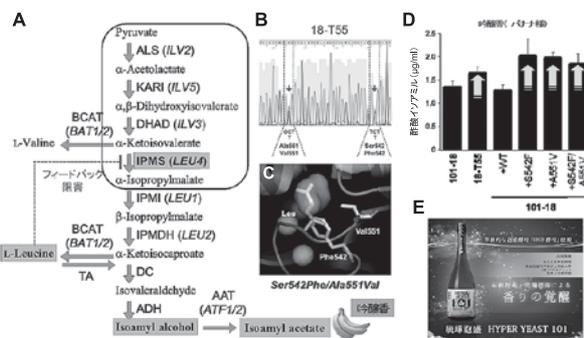


図8. ロイシン・酢酸イソアミルを高生産する泡盛酵母の育種. A: 酵母におけるロイシン・酢酸イソアミルの生合成経路, B: 18-T55株におけるIPMSの遺伝子配列, C: IPMS変異体 (S542Phe/A551Val) のロイシン結合部位周辺の予測構造, D: 各菌株で醸造した泡盛の酢酸イソアミル含量, E: 18-T55株で醸造した泡盛「HYPER YEAST 101」.

体のイソアミルアルコール (i-AmOH) は、ロイシン (Leu) の生合成に依存して生成される。i-AmOHはLeu生合成経路の中間体である α -ケトイソカプロン酸から2段階の酵素反応 (α -ケト酸脱炭酸酵素, アルコール脱水素酵素) によって合成される。一方、 α -イソプロピルリンゴ酸合成酵素Leu4 (IPMS) はLeuとi-AmOHの細胞内レベルを調節する鍵酵素であり、その活性がLeuによるフィードバック阻害を受けることでLeuの生合成が厳密に調節されている (図8A)。そこで、親株 (101-18株) に突然変異処理を施し、Leuの毒性アナログである5,5,5-トリフルオロロイシン (TFL) に耐性を示す変異株の中から、親株に比べて細胞内のLeu濃度が高く、泡盛中のi-AmOH, i-AmOAc含量が増加した菌株 (18-T55株) を取得した³⁹⁾。18-T55株はIPMSの遺伝子に二つの変異 (Ser542Phe, Ala551Val) があり (図8B)、いずれの変異もTFL耐性、IPMSのフィードバック阻害解除、Leu蓄積を引き起こすことが判明した。また、両残基はLeu4内のLeu結合部位の近傍にあり、アミノ酸置換に伴う立体障害がフィードバック阻害解除の原因であると考えられた (図8C)。本研究は泡盛酵母の育種として初めての報告であり、アミノ酸アナログ耐性

変異株の取得が育種に有効であることを実証した(第24回生物工学論文賞)³⁹⁾。

実機醸造を行った結果、18-T55株はエタノール生成などに問題はなく、親株の良好な特性を引き継いでいた。香氣成分としては、i-AmOH、i-AmOAcが増加していたが(図8D)、他の成分も顕著に増加しており、IPMSの遺伝子以外の変異によるものと考えられた。また官能評価では、フルーティーかつやや濃厚な風味との評価が得られた。以上の結果から、18-T55株は親株よりも香り高い泡盛の醸造が可能であり、「101H(ハイパー)酵母」と名付けた。101H酵母で製造した泡盛はブランデー様の甘さと果実様の華やかさが好評を博し、2016年5月に合名会社新里酒造より新商品「HYPER YEAST 101」として販売を始めた(図8E)⁴⁰⁾。

今回のような研究シーズと産業ニーズのマッチング(実用化)には、(1)研究者自身の意欲・熱意、(2)共感者・理解者との信頼関係、(3)努力・幸運・感謝、(4)学会・論文発表などが必須であると感じている。学会活動はそのための効果的なツールであり、特に本学会は産学官連携の芽を育む場として存在価値を発揮している。

大腸菌のシステイン代謝調節機構の解析と発酵生産への応用

システイン(Cys)は、ジスルフィド結合を介したタンパク質構造の維持、チオール基の酸化還元反応による生体成分の代謝など生理的に重要なアミノ酸である。また、食品添加物(発酵助剤、香味促進剤、補助食品)、美容・化粧品素材(パーマ剤、育毛剤、ヘアカラー、シャンプー)、医薬品(去痰剤、気管支炎薬、アンモニア解毒剤、動脈硬化薬、美肌薬)などの原料に広く用いられている。現在、Cysは年間約5,000トンの世界市場を有し、①ヒトの毛髪や動物の羽毛の酸加水分解による抽出、②細菌由来の酵素を用いたDL-2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸からの不斉加水分解、③微生物によるグルコースからの直接発酵の組合せで製造されている。しかし、毛髪や羽毛からの抽出には、加水分解に用いる濃塩酸を含む廃液の処理に伴う環境問題がある。また、Cysは米国FDAによりその安全性が認められているが、動物由来の成分は敬遠されており、酵素合成や発酵生産が好ましい。そこで、筆者らは大腸菌におけるCysの代謝制御機構を解析し、発酵生産への応用に取り組んだ(図9)。

Cys生合成の強化 細胞内のCys含量は、セリン(Ser)にアセチル基を転移し、O-アセチルSerを合成するSerアセチルトランスフェラーゼ(SAT)に対するCysのフィードバック阻害によって制御されている。以

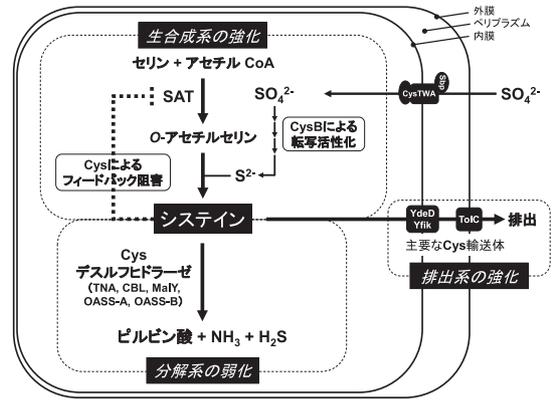


図9. 大腸菌におけるシステインの代謝制御機構と発酵生産のための戦略

前に、Cysが少量分泌される大腸菌が分離されたが、その株のSATはMet256がIleに置換していた。筆者らはMet256を他のアミノ酸に置換したSAT変異体を作製し、Cys分解能が低下した株で発現させた⁴¹⁾。各変異体の発現株を培養すると、培地に高濃度のCysが分泌され、Cysの過剰生産(約800 mg/L)に初めて成功した。また、各変異体は野生型酵素に比べてフィードバック阻害感受性が低下していた。さらに、PCRを用いたランダム変異をSATの遺伝子に導入し、Cysの過剰生産を引き起こす変異体の取得を試みた⁴²⁾。その結果、カルボキシル末端側のアミノ酸置換がフィードバック阻害非感受性やCysの過剰生産(約1,000 mg/L)に重要であることが示された。

次に、高等植物シロイヌナズナのSATに着目した⁴³⁾。シロイヌナズナのSATは、細胞質(SAT-c)、ミトコンドリア(SAT-m)、葉緑体(SAT-p)にそれぞれ局在しているが、SAT-mとSAT-pはCysによるフィードバック阻害に非感受性である。そこで、両SATを構成的に発現するプラスミドを作製し、大腸菌のCys分解能低下株に導入したところ、SAT-pまたはSAT-mの過剰発現株ではCys生産性が大幅に増加した(1,600–1,700 mg/L)。これらの結果から、SATのフィードバック阻害解除による生合成系の強化がCysの過剰生産に有効であることが示された^{41–43)}。

さらに、構造情報に基づきSATの高機能化を試みた⁴⁴⁾。これまでに大腸菌のSATとCysの複合体の結晶構造が決定され、SATは三量体を形成し、アミノ末端で別のSATと相互作用すること、基質のSerと阻害物質のCysはSATの同じ領域に結合することが分かっている。また、Asp92の α 炭素がSer結合時とCys結合時で構造変化を起こすことが示唆された。そこで、Arg89-Asp96間のアミノ酸残基をランダムに置換したところ、フィード

バック阻害に非感受性を示し、かつ高い活性を維持する変異体を取得することができた。このような構造情報はCys生産菌を育種するうえで、強力なツールである。

Cys分解系の弱化 Cysデスルフヒドラーゼ (CD) は、Cysをピルビン酸とアンモニア、硫化水素に分解する酵素である。筆者らはこれまで不明だったCys分解系の解析を行った^{45,46}。大腸菌の細胞抽出液を未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、活性染色を行ったところ、CD活性を示すタンパク質として、①トリプトファンを分解するトリプトファナーゼ (TNA)、②シスタチオンをホモシステインに分解するシスタチオンβ-リアーゼ (CBL)、③④O-アセチルSerと硫化物からCysを合成するO-アセチルSerスルフヒドラーゼ (OASS-A, OASS-B)、⑤マルトース資化経路遺伝子群の調節因子MalYを同定した。

次に、各CD遺伝子を単独または複数で破壊した株を構築し、フィードバック阻害感受性の低下したSAT変異体を発現させた。その結果、いずれの菌株もCys生産量が野生型株に比べて2倍程度増加しており、分解系の弱体化がCysの発酵生産に有効であることが示された(図10A)^{45,46}。

Cys排出系の強化 大腸菌ではこれまでに、内膜のCys輸送体タンパク質として、YdeD, YfiK, CydDCが同定されている。筆者らはこれらに加え、薬剤排出タンパク質に着目した。高濃度のCysは大腸菌の生育阻害を引き起こすことから、CDの遺伝子破壊株で薬剤排出タンパク質候補遺伝子を発現させ、Cys存在下での生育やCys含量を調べた⁴⁷。その結果、ビシクロマイシンの排出に関与するBcrをCys輸送体として同定した。CDの遺伝子破壊株でBcrとフィードバック阻害非感受性のSAT変異体を共過剰発現させると、SAT変異体の単独過剰発現に比べて、Cys生産量が約5倍に増加した⁴⁷。

また、大腸菌の一遺伝子欠損ライブラリーを用いて、外膜透過に関与する新規な輸送体を探索した⁴⁸。その結果、Cys感受性を示す多数の候補株を取得し、中でも外膜ポリリン TolCの遺伝子欠損株は、強い感受性を示した。単独で高いCys排出能を示すYdeDを過剰発現させた場合に比べ、TolCとYdeDの両方を過剰発現させると、より短時間で多くのCysを培地に生産した(図10B)。Cysは内膜の輸送体により一旦ペリプラズムに排出され、その後TolCにより外膜を透過し、培地に排出されることが考えられた。TolCは大腸菌のCys耐性に重要な役割を果たしており、TolCの過剰発現がCys生産に効果的であることが示された⁴⁸。

最近になって、二つの企業(Wacker, 味の素)が相次いで自社の菌株の代謝系を最適化することでCysとその誘導体の発酵生産に成功し、それらの製造・販売を開始した^{49,50}。特に、Wacker社は培地中に分泌されたCysの純度を90%にまで高めることができ、食品や医薬品の品質基準を満たしていると発表した。現在、発酵生産されるCysは全体の10%強であるが、市場占有率は毎年増加していくであろう。

また当研究室では、上記の研究に取り組む中で、Cysの新たな生理機能(Cys/シスチンのシャトルシステムによる抗酸化)⁵¹や合成経路(S-スルホCysからの合成: チオ硫酸経路)⁵²なども見いだしている。

おわりに

微生物におけるアミノ酸代謝とその制御機構は微生物の種類、生育環境や代謝様式などで異なっている。また、アミノ酸代謝は複雑で、かつ頑強な(ロバスト性)ネットワークを形成しており、細胞内のさまざまな代謝経路(代謝産物)やシグナル分子の制御系とのクロストークも存在している。基礎科学の分野では、微生物の利点を

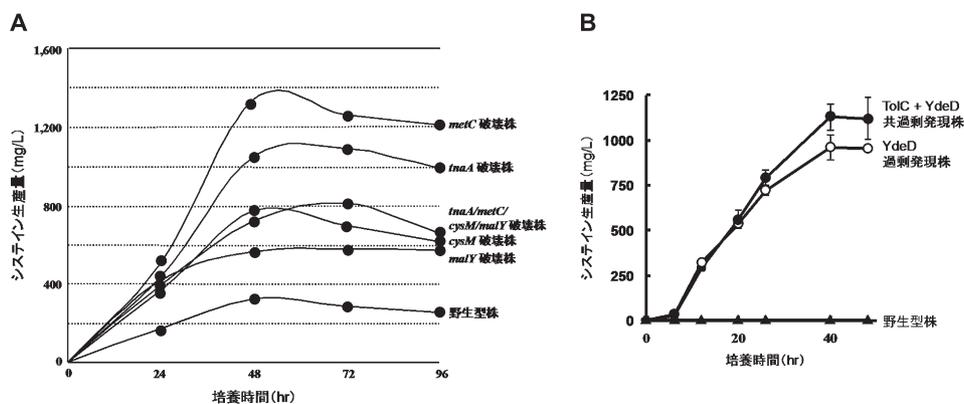


図10. 大腸菌によるシスチンの発酵生産。A: シスチン分解系の弱体化株 (シスチンデスルフヒドラーゼの遺伝子破壊株)。B: シスチン排出系の強化株 (トランスポーターの過剰発現株)。

活かした研究を通じて、それらの仕組みを明らかにし、生命現象の理解を深めることが可能である。一方、応用研究においては、細胞内外のアミノ酸含量を人為的に制御することで、高度なストレス耐性の付与による発酵食品・バイオエタノール・有用物質の生産性改善、あるいは味・風味の差別化や機能性・健康イメージの向上を目指した食品の製造などへの貢献が期待できる。

ヒトと異なり、多くの微生物はすべてのアミノ酸を細胞内で合成している。今後もアミノ酸の新しい代謝制御機構と生理機能を微生物に学びながら、独自性の高い研究を目指すとともに、得られた成果を産学官連携によって社会に還元していきたい。

謝 辞

本研究は福井県立大学生物資源学部、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科で行われたものであり、微生物におけるアミノ酸研究の重要性と面白さをご教示いただいた味の素株式会社、研究にご協力いただいた研究室の教員（福井県立大学の中森茂先生（現・同大学名誉教授）、和田大先生（現・北海道大学）、濱野吉十先生、奈良先端科学技術大学院大学の吉田信行先生（現・静岡大学）、大津巖生先生（現・筑波大学）、渡辺大輔先生、那須野亮先生）、研究員（戒能智宏博士、小谷哲也博士、笹野佑博士、灰谷豊博士、橋田恵介氏）、学生各位および共同著者の皆様に心より感謝申し上げます。特に、中森茂先生には公私にわたりさまざまなご指導をいただきました。

また、パン酵母の発酵試験については、京都大学微生物科学寄附研究部門の島純特定教授（現・龍谷大学）、システインの研究については、伊藤久生氏をはじめとする味の素株式会社、泡盛酵母の育種については、株式会社バイオジェット、新里酒造株式会社にそれぞれ多大なるご協力、ご支援をいただきました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。特に、筆者の良き理解者で、沖縄での共同研究や泡盛の実用化にご尽力いただいた株式会社バイオジェットの塚原正俊社長には大変お世話になりました。最後に、泡盛酵母の優れた親株を開発された新里酒造株式会社の故新里修一前社長に対し、心からの感謝と哀悼の意を表します。

文 献

- 1) Shima, J. and Takagi, H.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 155–164 (2009).
- 2) Takagi, H., Iwamoto, F., and Nakamori, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 405–411 (1997).
- 3) Takagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 211–223 (2008).
- 4) Kaino, T. and Takagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 273–283 (2008).
- 5) Takagi, H., Sakai, K., Morida, K., and Nakamori, S.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103–108 (2000).
- 6) Morita, Y., Nakamori, S., and Takagi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 390–394 (2002).
- 7) Morita, Y., Nakamori, S., Takagi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 212–219 (2003).
- 8) Terao, Y., Nakamori, S., and Takagi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6527–6532 (2003).
- 9) Sekine, T., Kawaguchi, A., Hamano, Y., and Takagi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4011–4019 (2007).
- 10) Tatehashi, Y. and Takagi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 576–579 (2013).
- 11) Takagi, H., Takaoka, M., Kawaguchi, A., and Kubo, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8656–8662 (2005).
- 12) Takagi, H., Matsui, F., Kawaguchi, A., Wu, H., Shimoi, H., and Kubo, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 377–380 (2007).
- 13) Matsuura, K. and Takagi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 538–544 (2005).
- 14) Takagi, H., Taguchi, J., and Kaino, T.: *Yeast*, **33**, 355–363 (2016).
- 15) Tatehashi, Y., Watanabe, D., and Takagi, H.: *FEBS Lett.*, **590**, 2906–2914 (2016).
- 16) Takagi, H., Shichiri, M., Takemura, M., Mohri, M., and Nakamori, S.: *J. Bacteriol.*, **182**, 4249–4256 (2000).
- 17) Shichiri, M., Hoshikawa, C., Nakamori, S., and Takagi, H.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998–42002 (2001).
- 18) Kimura, Y., Nakamori, S., and Takagi, H.: *Yeast*, **19**, 1437–1445 (2002).
- 19) Nomura, M., Nakamori, S., and Takagi, H.: *J. Biochem.*, **133**, 67–74 (2003).
- 20) Wada, M., Okabe, K., Kataoka, M., Shimizu, S., Yokota, A., and Takagi, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 582–586 (2008).
- 21) Nomura, M. and Takagi, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616–12621 (2004).
- 22) Du, X. and Takagi, H.: *J. Biochem.*, **138**, 391–397 (2005).
- 23) Du, X. and Takagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1343–1351 (2007).
- 24) Nishimura, A., Kotani, T., Sasano, Y., and Takagi, H.: *FEMS Yeast Res.*, **10**, 687–698 (2010).
- 25) Nishimura, A., Nasuno, R., and Takagi, H.: *FEBS Lett.*, **586**, 2411–2416 (2012).
- 26) Nishimura, A., Kawahara, N., and Takagi, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137–143 (2013).
- 27) Nasuno, R., Hirano, Y., Itoh, T., Hakoshima, T., Hibi, T., and Takagi, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11821–11826 (2013).
- 28) Inoya, K., Kotani, T., Sasano, Y., and Takagi, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 341–352 (2009).
- 29) Nasuno, R., Hirase, S., Norifune, S., Watanabe, D., and Takagi, H.: *J. Biochem.*, **159**, 271–277 (2016).
- 30) Yoshikawa, Y., Nasuno, R., Kawahara, N., Nishimura, A., Watanabe, D., and Takagi, H.: *Nitric Oxide*, **57**, 85–91 (2016).
- 31) Nasuno, R., Aitoku, M., Manago, Y., Nishimura, A., Sasano, Y., and Takagi, H.: *PLoS One*, **9**, e113788 (2014).
- 32) Kaino, T., Tateiwa, T., Mizukami-Murata, S., Shima, J., and Takagi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 5845–5849 (2008).
- 33) Sasano, Y., Takahashi, S., Shima, J., and Takagi, H.: *Int. J. Food Microbiol.*, **138**, 181–185 (2010).

- 34) Sasano, Y., Haitani, Y., Ohtsu, I., Shima, J., and Takagi, H.: *Int. J. Food Microbiol.*, **152**, 40–43 (2012).
- 35) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J., and Takagi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 592–595 (2012).
- 36) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J., and Takagi, H.: *Microb. Cell Fact.*, **11**, 40, doi:10.1186/1475-2859-11-40 (2012).
- 37) Tsolmonbaatar, A., Hashida, K., Sugimoto, Y., Watanabe, D., Furukawa, S., and Takagi, H.: *Int. J. Food Microbiol.*, **238**, 233–240 (2016).
- 38) 北本勝ひこ監修: 発酵・醸造食品の最前線, シーエムシー出版, p. 257–269 (2015).
- 39) Takagi, H., Hashida, K., Watanabe, D., Nasuno, R., Ohashi, M., Iha, T., Nezu, M., and Tsukahara, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 140–147 (2015).
- 40) 新里酒造: <http://www.shinzato-shuzo.co.jp/101/index.html> (2017/10/27)
- 41) Nakamori, S., Kobayashi, S., Kobayashi, C., and Takagi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1607–1611 (1998).
- 42) Takagi, H., Kobayashi, C., Kobayashi, S., and Nakamori, S.: *FEBS Lett.*, **452**, 323–327 (1999).
- 43) Takagi, H., Awano, N., Kobayashi, S., Noji, M., Saito, K., and Nakamori, S.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 453–459 (1999).
- 44) Kai, Y., Kashiwagi, T., Ishikawa, K., Ziyatdinov, M. K., Redkina, E. I., Kiriukhin, M. Y., Gusyatiner, M. M., Kobayashi, S., Takagi, H., and Suzuki, E.: *Protein Eng. Des. Sel.*, **19**, 163–167 (2006).
- 45) Awano, N., Wada, M., Kohdoh, A., Oikawa, T., Takagi, H., and Nakamori, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 239–243 (2003).
- 46) Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., and Takagi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4149–4152 (2005).
- 47) Yamada, S., Awano, N., Inubushi, K., Maeda, E., Nakamori, S., Nishino, K., Yamaguchi, A., and Takagi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 4735–4742 (2006).
- 48) Wiriyathanawudhiwong, N., Ohtsu, I., Li, Z.-D., Mori, H., and Takagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 903–913 (2009).
- 49) Wacker: https://www.wacker.com/cms/en/products/product_groups/cystein.jsp (2017/10/27)
- 50) 味の素株式会社: https://www.ajinomoto.com/jp/presscenter/press/detail/2016_02_08.html (2017/10/27)
- 51) Ohtsu, I., Wiriyathanawudhiwong, N., Morigasaki, S., Nakatani, T., Kadokura, H., and Takagi, H.: *J. Biol. Chem.*, **285**, 17479–17487 (2010).
- 52) Nakatani, T., Ohtsu, I., Nonaka, G., Wiriyathanawudhiwong, N., Morigasaki, S., and Takagi, H.: *Microb. Cell Fact.*, **11**, doi:10.1186/1475-2859-11-62 (2012).