

平成18-20年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「機能性化成品を生産する微生物の高速育種法の開発」

研究成果等報告書

平成21年 4月

委託者 関東経済産業局
委託先 株式会社トランスサイエンス

目次

第1章 はじめに

第2章 フタル酸を原料とする有用芳香族化合物の新規製造方法の開発

- (1) 代謝産物一斉解析技術の改良
- (2) 大腸菌と *Pseudomonas putida* の生産系の開発
- (3) TPAを原料とするPCAと没食子酸の生産系の開発
- (4) TPAをPCAに効率よく変換する酵素の遺伝子の単離
- (5) TPAの細胞内取り込みの効率化
- (6) NADPH再生系の構築
- (7) プロトカテク酸(PCA)と没食子酸の大量生産技術の開発
- (8) カテコール、ピロガロールやサリチル酸などの有用芳香族化合物を生産する微生物の高速育種
- (9) まとめ

第3章 ファフィア酵母の高速育種による効率的なカロチノイド生産

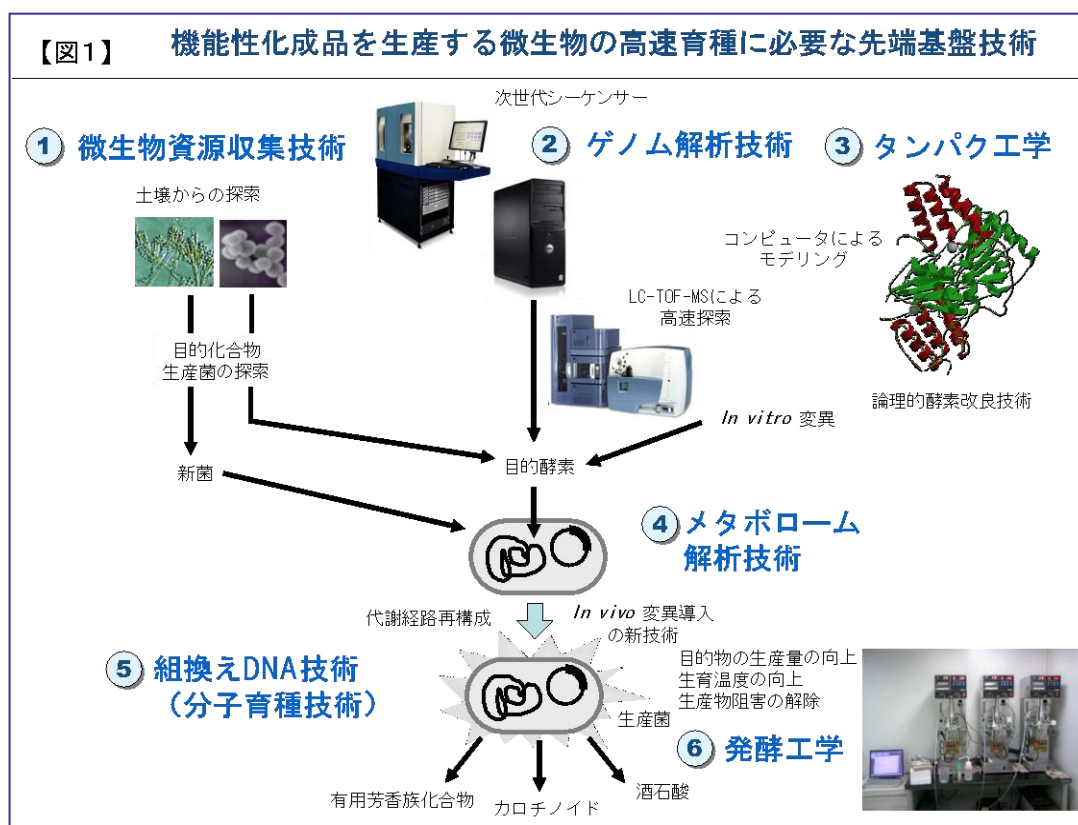
- (1) ミューテーター株の構築
- (2) 高温度下で増殖可能な菌株の取得
- (3) アスタキサンチン高生産株の育種
- (4) 高温度耐性アスタキサンチン高生産株の育種
- (5) まとめ

第4章 酒石酸生産微生物の育種

- (1) *Gluconobacter oxydans* によるグルコースから5-ケトグルコン酸生産の効率化
- (2) 5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換
- (3) 微生物資源よりの酒石酸高生産株の探索
- (4) まとめ

第1章 はじめに

エネルギーや環境問題、天然資源の有効利用など様々な方面への配慮から、バイオプロセス法(微生物による発酵法や酵素転換法を用いて機能性化成品を低コストで生産する方法)による物質生産に注目が集ってきている。一方でバイオプロセス法には実用化に向けて未熟な点も多く、新たな基盤技術の開発が求められている。本研究開発ではバイオプロセス法の技術高度化を目指しつつ、3種類の機能性化成品、具体的には、【1】フタル酸を原料とする有用芳香族化合物の新規製造法の開発、【2】カロチノイド、【3】酒石酸についてバイオプロセス法による製造法の開発を行った。(図1参照)



第2章 フタル酸を原料とする有用芳香族化合物の新規製造方法の開発

(主担当 株式会社ジナリス、副担当 長岡技術科学大学、東京大学)

現在、ほとんどの有用芳香族化合物に関しては、石油などの化石資源を原料として化学合成法により生産されている。本研究開発では、化学合成法では化石資源を消費する上、酸化反応において多大なエネルギーを消費することから、省エネルギーの観点から有用芳香族化合物を製造するバイオプロセス技術の開発を目指した。本研究開発では、安価なテレフタル酸などのフタル酸類を原料とすることにしたが、フタル酸類はペットボトルやポリエステル樹脂などのプラスチックから再資源化できることに着目した。

(1)代謝産物一斉解析技術の改良

(ア) 大腸菌代謝産物の一斉解析技術の開発

フタル酸を原料として目的化合物に至る代謝経路を解析するため、また目的化合物の大量生産のために細胞内代謝産物を解析するために、代謝産物一斉解析技術の改良を行った。大腸菌 K-12 株をモデル宿主として、代謝産物の抽出条件や精製方法を検討することにより、約 400 個の化合物ピークを同定できる手法を確立した。

(イ) メタボローム解析技術の改良と代謝パスウェイデータベースとの連携による代謝産物解析

代謝産物同定精度を向上させるために、約 150 種類の標準品の HPLC 保持時間を測定した。また代謝産物データベースの改良や代謝パスウェイデータベースとの連携による代謝産物解析システムを構築して、代謝産物の同定精度とアノテーション技術を向上させた。

(ウ) 保持時間予測技術の開発による化合物予測精度の向上

高い精度の分子量をもとに化合物の組成式を推定することが可能であるが、同じ分子量を持つ化合物(異性体)の分離は原理的にできない。この問題を解決するために、測定した標準品の保持時間データを用い、一般的な化合物の保持時間を予測する技術の開発を試みた。予測に用いるための基礎データとして、測定した 150 種類の標準品の保持時間データを用いた。化合物の特徴抽出を行い、学習アルゴリズムによって保持時間と抽出された化合物の特徴との関係を導き出した。抽出された特徴としては、疎水性指標である XLogP, TPSA(極性表面積の近似値), Complexity(分子構造の複雑さの指標)を用いた。学習アルゴリズムとして SVR (Support Vector Regression)を用いて予測を

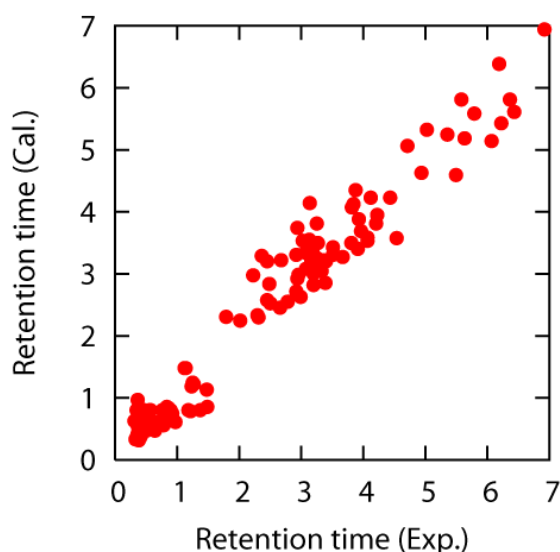


図 2-1. 保持時間予測結果の例。
横軸が実測値、縦軸が予測値

行い、保持時間の早い区間で良好な結果が得られた。保持時間の遅い区間では、化合物の立体構造に基づいた疎水表面積のより詳細な特徴抽出により保持時間予測が可能となった(図 2-1 参照)。

(2)大腸菌と *Pseudomonas putida* の生産系の開発

(ア) 大腸菌-*Pseudomonas* 属シャトルベクターの構築

大腸菌と *Pseudomonas putida* KT2440 株で水酸化酵素や脱炭酸酵素を効率よく発現させるために、グラム陰性菌で複製可能なプラスミド pRSF1010 の複製領域と水平伝播に關与する領域の最小領域である *Psd* -*Pvu* II 5.8 kb 断片を大腸菌用発現ベクター-pHSG298 の *Stu* I サイトに挿入することにより、大腸菌-*Pseudomonas* 属シャトルベクター pHSF298 を構築した。

(イ) 没食子酸とプロトカテク酸(PCA)などを生産させるための *Pseudomonas putida* 宿主の遺伝子破壊株の創製

Pseudomonas putida KT2440 株は多数の芳香族化合物の代謝経路も解明されている上、全ゲノム配列も解読されていることから、KT2440 株を大腸菌とともに目的化合物の生産宿主として用いることにした。KT2440 株の利用にあたり、目的化合物(カテコール、PCA、没食子酸など)が変換や分解が起こらないようにした遺伝子破壊変異株を構築する必要がある。そこで、2種類の catechol 1,2-dioxygenase 遺伝子、gallate dioxygenase 遺伝子および PCA 3,4-dioxygenase beta subunit 遺伝子と相同性を示す2種類の遺伝子について、遺伝子破壊の標的とした。*Bacillus* 属由来の *sacB* を利用したポジティブ選択が可能で相同組換えによる方法を用いて、これら4種類の遺伝子を順次破壊することにより、*Pseudomonas putida* KT2440 株の変異株 DC2PG を創製した。

(ウ) サリチル酸による誘導系の構築

pCNB4 プラスミド由来のサリチル酸プロモーターと *nahR* を含む領域をクローニングし、カセット化した。レポーター遺伝子 *etbC* を下流に連結し、カテコール開裂による呈色反応(*EtbC* 活性)を 2mM サリチル酸の誘導で確認した。その結果、誘導後 2 時間、4 時間で有意に強いレポーター活性が認められ、サリチル酸による誘導系の確立を確認した。また、レポーター遺伝子を没食子酸生産遺伝子群と交換し、基質であるテレフタル酸(TPA)を加えて培養することでPCAおよび没食子酸の生産を大腸菌で検討した。その結果、サリチル酸誘導後 6 時間でPCA 0.9 mM、没食子酸 0.3 mM の生産が確認できた。

(3)TPAを原料とするPCAと没食子酸の生産系の開発

(ア) 水酸化酵素遺伝子ライブラリーからの没食子酸生成酵素の探索

これまでに、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 の p-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素(HFM300)の 385 位の Tyr が Phe に置換した変異体 Y385F が、弱い没食子酸生成酵素活性(PCA の酸化により没食子酸を生成する活性)を保有することが報告されている。そこで、当社保有

の約 700 種類の水酸化酵素遺伝子ライブラリーの中で、本酵素と相同性を有する 11 種類の酵素 (HFM5、HFM86、HFM122、HFM145、HFM305、HFM339、HFM388、HFM 544、HFM545、HFM689、HFM737) について没食子酸生成酵素活性を測定した。その結果、HFM122 以外の 10 種類の HFM 酵素は没食子酸生成酵素活性を有しており、特に HFM5、HFM145、HFM305、HFM737 は他の酵素より没食子酸の生成量が多いことが明らかになった。

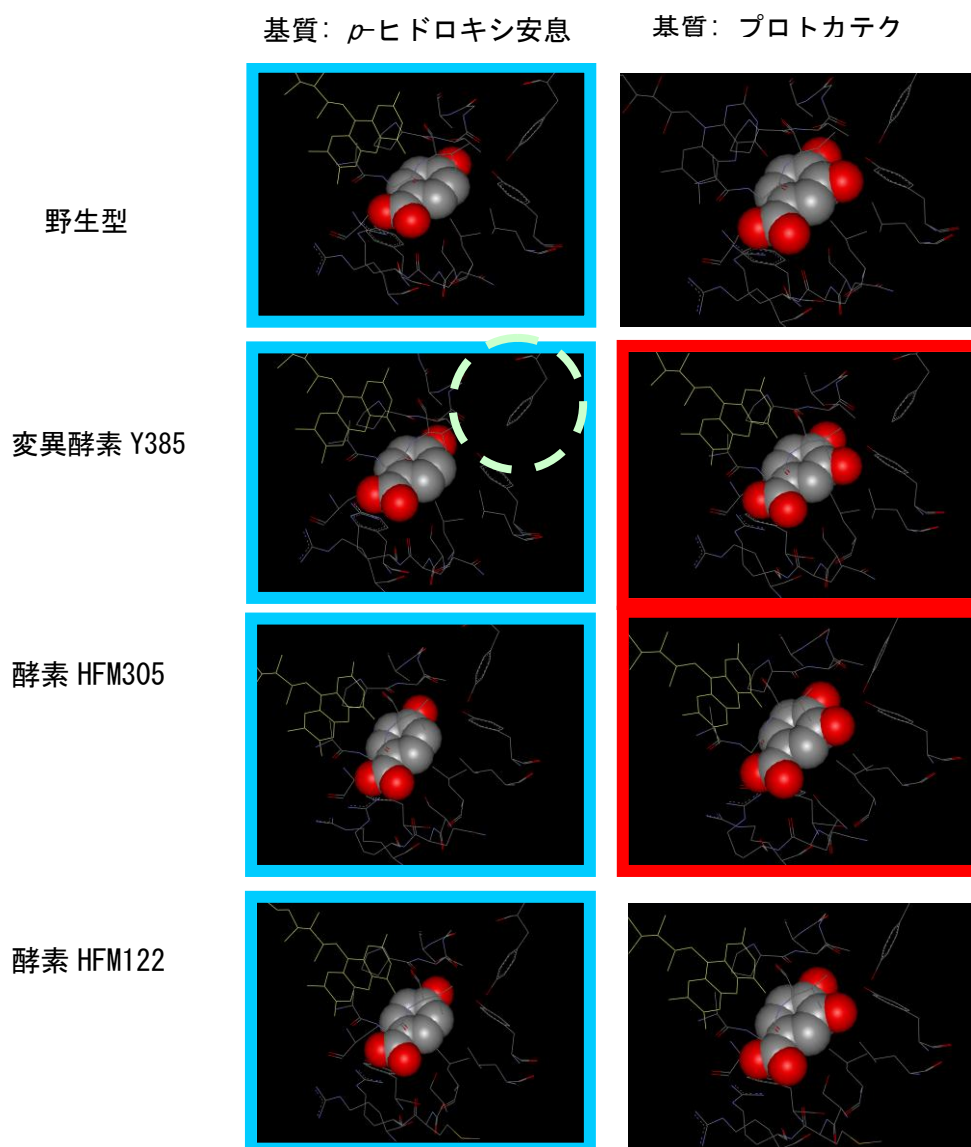


図 2-2. 基質結合の構造モデル: 野生株、Y385F、HFM305 酵素、HFM122 酵素と基質(左: *p*-ヒドロキシ安息香酸、右: プロトカテク酸)付近の構造

基質をスペースフィル構造で示す。補酵素 FAD を黄色で示す。基質変換活性がある構造を枠で示す(*p*-ヒドロキシ安息香酸→プロトカテク酸変換活性を持つ構造は水色の枠、プロトカテク酸→没食子酸変換活性を持つ構造は赤色の枠で示す)。2段目 Y385F 変異体の 385 番目の F を○で示した。

(イ) p-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素の酵素高次構造解析と変異導入による酵素改良

コンピュータモデリング手法を用いた p-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素の高次構造をもとに変異を導入することにより、没食子酸生成酵素の活性を向上させることを試みた。*Pseudomonas aeruginosa* の p-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素 (PDB 番号: 1IUW) とその変異体 Y385F (1PXC) を用いて、基質との結合状態の構造モデリングと最適化計算を行った。また、水酸化酵素 HFM305 と HFM122 についても同様の構造モデリングを行い、基質との結合状態を模した構造データを作成した。それぞれの酵素について、基質付近の構造図を図 2-2 (前ページ) に示した。これらの構造をもとに、基質 PCA に近く、水酸化活性を防げない部位として 3 箇所の変異部位候補を抽出した。これら 3 箇所のアミノ酸に着目して、水酸化酵素 HFM300、HFM305、HFM145、HFM689 をもとに、約 40 種類のアミノ酸置換体を創製した。これらの酵素変異体の没食子酸生成酵素活性を測定した結果、HFM145 に 2 箇所のアミノ酸置換変異を有する酵素変異体の活性が最も高く、野生型 HFM145 の約 10.6 倍 (野生型 HFM300 の約 30.8 倍) の活性を有することがわかり、以降の没食子酸生産研究に用いることとした。

(4) TPA を PCA に効率よく変換する酵素の遺伝子の単離

縮重 PCR を利用して、土壌試料より単離した細菌から *Comamonas* 属タイプの TPA ジオキシングナーゼ遺伝子 *tphA1A2A3* と TPA ジハイドロジオール脱水素酵素遺伝子 *tphB* を合計 12 種類クローニングした。これらを大腸菌用発現ベクターに導入して酵素活性の評価を行った。TPA からの PCA 変換能が高かった 5 クローン (*tphAB#72W1*, *tphAB#72W2*, *tphAB#72C*, *tphAB#56C*, *tphAB#61B*) について、TPA 代謝オペロンに含まれる TPA 輸送に関係すると推定される遺伝子 (*tphC*) を含む領域 (*tphCAB*) をクローニングし、大腸菌用発現ベクターに導入した。これらの酵素を大腸菌内で評価した結果、大腸菌による TPA からの PCA への変換活性およびクローンの安定性から判断して、最終的に活性の強い *tphCAB#72W2* を選択し、以降の実験に用いることを決定した。

(5) TPA の細胞内取り込みの効率化

フタル酸類からの物質変換においては基質の取込みが律速段階の一つになると考えられ、適切な TPA 輸送系の構築が必要である。*Comamonas* 型 TPA 資化オペロンには TPA 輸送系に関係すると思われる *tphC* を含む領域から構成されている (*tphCA1A2A3*) ことから、この領域全体をクローニングし、大腸菌で *tphC* を発現させて評価を行った。その結果、大腸菌においては安定した効率の良い TPA の細胞内取り込みは観察されなかった。そこで、*Rhodococcus jostii* RHA1 株が有する TPA トランスポーターである *tpaK* 遺伝子の評価することにした。*tpaK* をクローニングし、*Comamonas* 属由来の TPA ジオキシングナーゼ遺伝子と連結し、*tphAB#72W2_tpaK* を構築して大腸菌における活性を検討した。その結果、*tpaK* を保持する大腸菌ではおよそ 46 倍の生産量の増加が観察された。この生産量の増大は *Pseudomonas putida* で *tpaK* を発現させたときにも観察され、没食子酸・PCA 大量生産における TPA 取込み系遺

伝子として *tpaK* を利用することに決定した。

(6) NADPH再生系の構築

没食子酸生産系におけるNAD(P)Hの再生系を強化するために、*Bacillus megaterium* IAM 1030に4種類存在するGlucose dehydrogenaseのうち活性が高く安定性の高いGlcDH-1およびGlcDH-2を選び、それぞれPCRによって増幅しクローニングした。これら *gdhI* 遺伝子および *gdhII* 遺伝子をそれぞれ改良型PCA水酸化酵素 HFM145 の遺伝子とポリシストロン発現型となるように連結し、評価したところ、没食子酸生産能が低下することが明らかになった。この没食子酸生産能低下現象を解決するために、現在、連結位置や連結方法などを検討している。

(7) プロトカテク酸 (PCA) と没食子酸の大量生産技術の開発

(ア) ポリシストロン型発現系の構築

高効率な没食子酸生産を目指して、TPAジオキシゲナーゼ遺伝子 (*tphA*)、TPAジハイドロジオール脱水素酵素遺伝子 (*tphB*) および改良型PCA水酸化酵素 HFM145、TPAトランスポーター遺伝子 (*tpaK/tpaC*)、グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*gdhI/gdhII*) をポリシストロン発現型となるように連結した。*tphAB* および HFM145 を核として、トランスポーターおよびグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子については、それぞれ1種類を用いた。各要素の連結法および組み合わせが異なる3種類の基本構造 (図 2-3) を構築し、PCA・没食子酸の生産について検討した結果、Version 3 の構造は最初の構造と比べて生産性が約 3500 倍向上した。

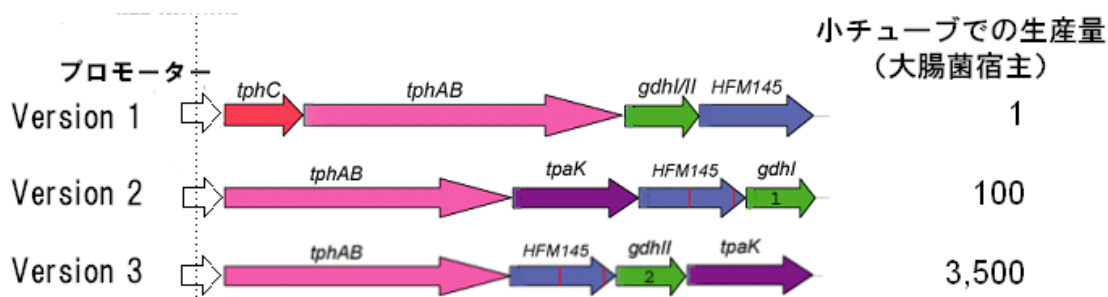


図 2-3. *tpaK* によるポリシストロン発現系を用いた没食子酸生産プラスミドの構造

(イ) PCAと没食子酸の大量生産の検討

上記で構築した没食子酸発現構築体の大腸菌における変換活性を検討した後、優れた発現構築体を *P. putida* に移転するという方針で研究を進めた。同様に培養条件に関しても大腸菌を先行して検討し、その成果を *Pseudomonas* に反映する方針で研究を進めた。培養条件の検討は、1.5 ml チューブ (反応容量 200 ul)、通気試験管 (反応容量 1ml)、羽根付き三角フラスコ (反応容量 50 ml、100 ml)、3 L ジャーファーメンター (反応容量 1 L~1.5 L) とスケールアップして行った。培養条件は、培養温度 25~37°C、pH6.0~8.0、溶存酸素 (攪拌速度)、pH 調整試薬、誘導時期、誘導因子の種類および誘導濃度についてそれぞれ検討した。また、

培地条件は、基本培地組成の選択、有機体窒素の種類と量、微量元素の種類と量、基質の量と状態についてそれぞれ検討した。また、宿主となる細菌は大腸菌 5 菌株、*P. putida* 1 菌株について検討を行った。

大腸菌による生産量(試験管培養)については、平成 20 年度の初めは mg/L 以下のオーダーであったが、諸条件の改良の結果、大腸菌による TPA からの没食子酸と中間体 PCA の総量は最大で 17.8g/L (没食子酸 10.3g, プロトカテク酸 7.5g/L) となった。また、PCA 単独生産(ジャー培養)では、17.6g/L であった(表 2-1)。

表 2-1 大腸菌および *P. putida* による PCA および没食子酸生産能

コンストラクト	<i>tphAB</i> のみを含む		<i>tphAB</i> + <i>HFM145</i> の両者を含む	
	PCA		PCA	没食子酸
大腸菌	17.6g/L (114mM)		10.3g/L (67mM)	7.5g/L (44mM)
<i>P. putida</i>	4.4g/L (29mM)		0.6g/L (4.2mM)	0.02g/L (0.11mM)

(8) カテコール、ピロガロールやサリチル酸などの有用芳香族化合物を生産する微生物の高速育種

(ア) フタル酸類を好氣的に分解する菌の収集と新規代謝経路の探索

コンポストと土壌をもとにした菌床からのフタル酸類の分解菌の探索を行った結果、フタル酸分解菌として 5 種 12 菌株を、イソフタル酸分解菌として 3 種 6 菌株を、テレフタル酸分解菌として 3 種 5 菌株を得ることができた。さらに、日本各地の土壌から収集した 150 サンプルについてテレフタル酸分解菌とフタル酸分解菌の集積培養を行った結果、10 日以内に生育が確認された試料数は、TPA 資化菌で 121 個、フタル酸資化菌で 91 個であった。そのうち、24 時間以内に生育が確認された試料の数は、TPA 資化菌で 6 個、フタル酸資化菌で 7 個であった。これらの菌について LC-TOF-MS 解析によりサリチル酸の生成を調べたが、サリチル酸生成菌は得られなかった。

(イ) フタル酸類を嫌氣的に分解する菌の収集の試み

カテコールやサリチル酸の新規生産経路を探索する目的で、フタル酸類を嫌氣的に代謝する微生物の収集を試みた。嫌氣的な条件下で安息香酸を分解・資化できる *Rhodopseudomonas parstlis* CGA009 をモデル微生物として、嫌気バックなどを利用した嫌氣的な培養方法に加えて、ミニジャーファメンターを用いた嫌氣的な集積培養法を確立した。コンポストと土壌をもとにした菌床をもとに、ミニジャーファメンターを用いる方法による集積培養を行った結果、1 回目・2 回目ともに培養 2, 3 日で薄く培地に濁りが見られたが、テレフタル酸の減少は見られなかった。さらに培養を続けたが、テレフタル酸を嫌氣的に分解する菌は取得できなかった。

(9)まとめ

本研究開発では、「TPAからPCAを効率よく変換する酵素の取得」、「PCAから没食子酸を生成する酵素(没食子酸生成酵素)の取得」、「酵素モデリング技術を駆使した没食子酸生成酵素の改良」および「効率のよいテレフタル酸の取込み」の課題を解決した没食子酸/PCA生産用遺伝子を取得した。続いて、これら遺伝子群をポリシストロン発現系を利用して発現するシステムを構築することにより、TPAを原料として、モル変換率で90%以上の効率で没食子酸およびPCAを大量生産できる大腸菌 K-12 株由来の菌株を育種することができた。培養条件を種々検討することにより、試験管培養で、0.1 M TPAを原料として、最大で17.8g/Lの目的物(没食子酸 10.3g、PCA 7.5g/L)生産する条件、および3 Lジャーファーメンター培養で、17.6 g/LのPCAを生産する条件を確立した。

また、PCA、カテコールおよび没食子酸の分解に関わる4種類の酵素遺伝子の破壊株の取得および発現ベクター/誘導発現系の開発により、*Pseudomonas putida*を宿主とする発現システムを確立した。

第3章 ファフィア酵母の高速育種による効率的なカロチノイド生産

(主担当 株式会社ネオ・モルガン研究所)

不均衡変異導入法に基づくミューテーターを利用した育種法によって、アスタキサンチン生産性に優れたファフィア酵母 *Phaffia rhodozyma* JCM9684 株を育種した。具体的には、より高温下で増殖可能な菌株を育種すること、アスタキサンチン高生産株を育種すること、さらには高温耐性・高生産性を同時に有する菌株を育種することを目的とした。

(1)ミューテーター株の構築

アスタキサンチン生産酵母 *Phaffia rhodozyma* JCM9684 株(以下、元株 JCM9684)に Pol⁺exo-発現ベクターを導入し、ミューテーター株を得た。導入方法はエレクトロポレーション法により、以下のとおり実施した。Gene Pulser(BIO-RAD)を用い、0.2mm キュベットにて 0.8 - 1.8kV/min, 600 - 1000 ; 25uF の条件下で通電し形質転換体を得た。(参考文献 1. Metabolic Engineering of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in the yeast *Xanthorophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) Applied and Environmental Microbiology (2003) Jan C et al. /2. Efficient Transformation of the Astaxanthin-Producing Yeast *Phaffia rhodozyma* (1998) Wery J et al.) Pol⁺exo-発現ベクターとしては、適切なアレル組合せを有する pPR2TN/Pr Pol⁺exo-発現ベクターを用いた。ベクター選抜マーカーである G418 耐性株を単離し、ミューテーター候補株とした。

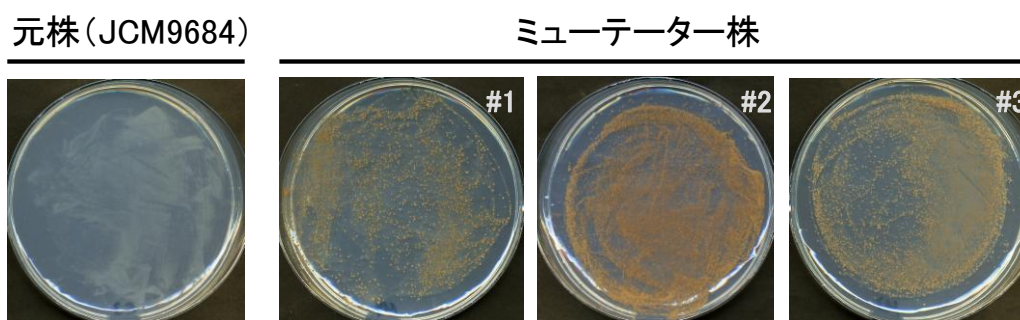


図 3-1 カナバニン耐性獲得試験による突然変異率の測定

pPR2TN/Pr Pol⁺exo-発現ベクターを導入して得られたミューテーター株#1~#3 株および元株 JCM9684 をカナバニン含有寒天平板培地に塗布した。カナバニンは毒性を示すため、元株はコロニーを形成できなかった。ミューテーターは高い変異率を有するため、CanR 遺伝子が突然変異し、多数のカナバニン耐性コロニーが形成した。ミューテーターの突然変異率は元株の xxx 倍以上に上昇していた。

ミューテーター候補株のうち、少なくとも元株 JCM9684 と比較して増殖性およびアスタキサ

ンチン生産性を維持しており、かつ高い変異率を有する株を育種対象株として選抜した(図 3-1)。増殖性・生産性・変異率・変異特性のいずれも最も高い性能を示した 3 株のムーテーター株#1, #2, #3 についてカナバニン耐性試験を実施した。通常、カナバニンはアルギニンアナログであり毒性を示すが、アルギニン代謝に関わる CanR 遺伝子が失活変異した菌株はカナバニン耐性を示すようになる。したがって、カナバニン耐性獲得率を試験することで、CanR 遺伝子の突然変異率を測定することができる。この CanR 遺伝子座における突然変異率を代替的に全体の突然変異率として把握することで、既存のムーテーター株との比較が見かけ上可能となる。カナバニン含有培地に塗布した菌数あたりのカナバニン耐性コロニー数を計測し、カナバニン遺伝子座での突然変異率を便宜的に算出したところ、当該ムーテーター株#1~3 の突然変異率は、元株 JCM96984 株の突然変異率と比較して xxx 倍以上に上昇していた。増殖性・生産性が元株と同レベルでかつ高い変異率を獲得していることから当該 3 株を本研究開発における育種対象株とした。また、ムーテーター株#2 においては、#1, #3 株よりも強い赤みを呈していた。このことは、#2 株が少なくとも寒天平板培地上での培養においては高いアスタキサンチン生産性を有していることを示している。

(2) 高温度下で増殖可能な菌株の取得

ファフィア酵母ムーテーター株混合培養液(前述#1~#3 を適宜混合して得た)より、 $xx^{\circ}\text{C}$ 下で増殖可能な菌株を育種した(図 3-2)。元株 JCM9684 は 23°C 下で良好に増殖した。また、育種前ムーテーターについても、元株と比較してわずかな生育速度の遅れが見られたものの、 23°C 下での良好な増殖が確認された。一方、 $xx^{\circ}\text{C}$ 下において元株(独立 2 系統を試験)は温度感受性を示し、増殖することが出来なかった。同様に、育種前ムーテーター株(独立 2 系統を試験)においても、 $xx^{\circ}\text{C}$ 下では増殖不能であった。高温耐性株取得を目的としたスクリーニングによって、 $xx^{\circ}\text{C}$ 下で良好に増殖するムーテーター株 03 および 04 を得た。

$xx^{\circ}\text{C}$ 耐性ムーテーターをベースにさらに高い温度への耐性を付与した。その結果、各温度耐性の菌株を取得することに成功した。育種株 1 および 2 はそれぞれ、 $yy^{\circ}\text{C}$ および $zz^{\circ}\text{C}$ 下培養で増殖し、最大濁度 $\text{OD}_{660} = 3.0$ に達した。 23°C 培養時の最大濁度 ($\text{OD}_{660} = 4.0$) の 75% に相当した(図 3-3)。

また、 $XX^{\circ}\text{C}$ 下では最大濁度 $\text{OD}_{660} = 2.0$ であり、 23°C 培養時の 50% に達した。さらに育種株 4 については $YY^{\circ}\text{C}$ で増殖可能であり、最大濁度で 23°C 培養時の 25% 以上にまで達した(図 3-4)。以上、元株については $xx^{\circ}\text{C}$ 以上の高温条件で一切増殖することができなかったことから、育種株 1~4 の高温度への有意な適応性が示された。育種株 1~4 の課題としては、アスタキサンチン生産量が元株と比較して少々低下してしまうということがあげられた(data not shown)。そこで、次の育種方向性としては生産性に留意しつつ高温耐性を付与することが考えられた。

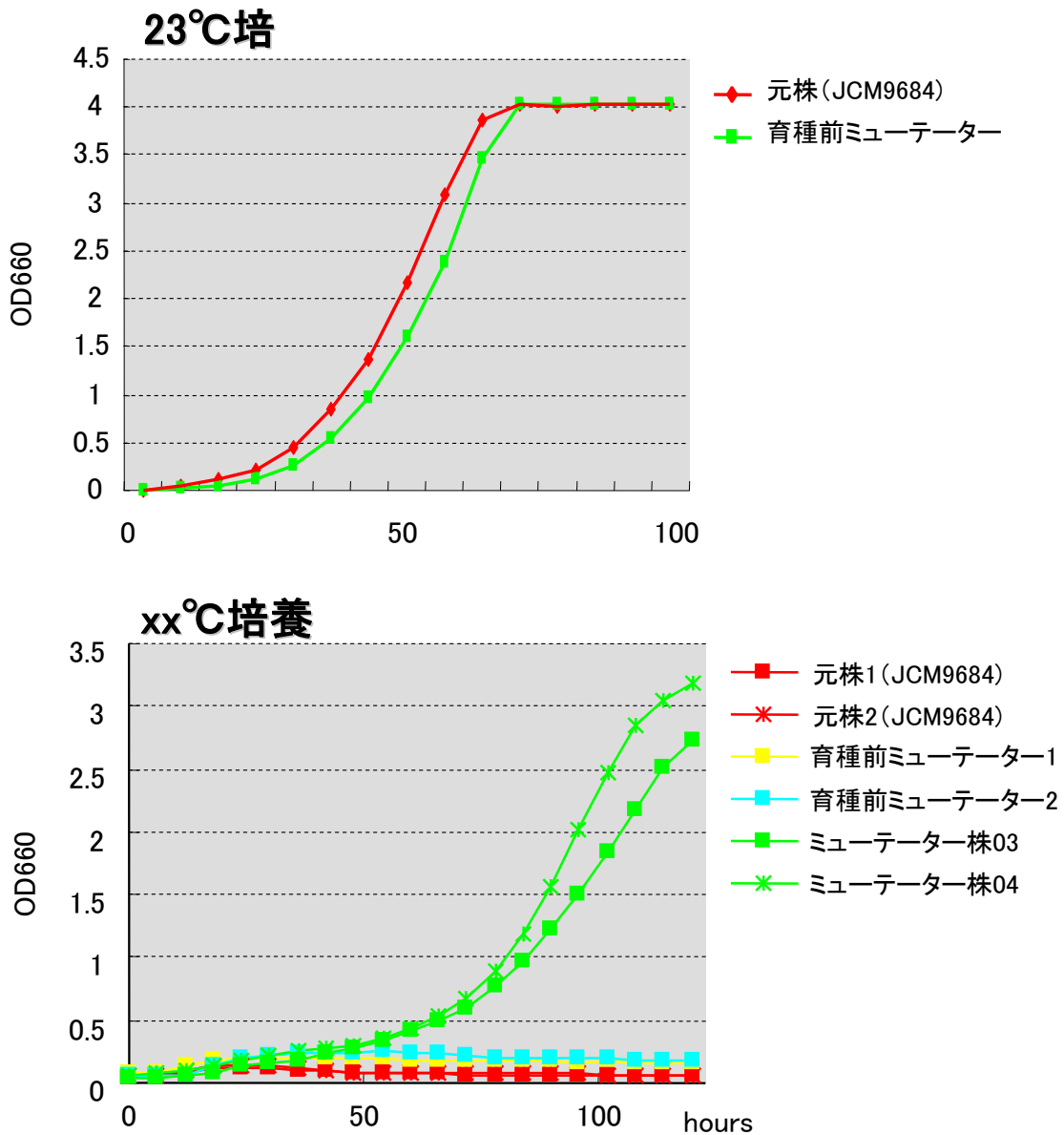


図 3-2 xx°C耐性株の取得

23°C(上), xx°C(下)での増殖曲線を示した (上)元株 JCM9684 および育種前ミューテーター共に 23°C下培養では良好に増殖した。(下)元株 JCM9684 および育種前ミューテーター共に xx°C下培養ではまったく増殖できなかった。高温度耐性を付与したミューテーター株 03 および 04 は, xx°C下においても良好に増殖した。

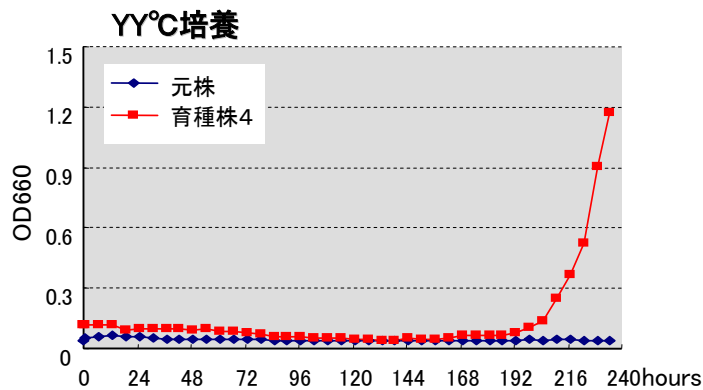
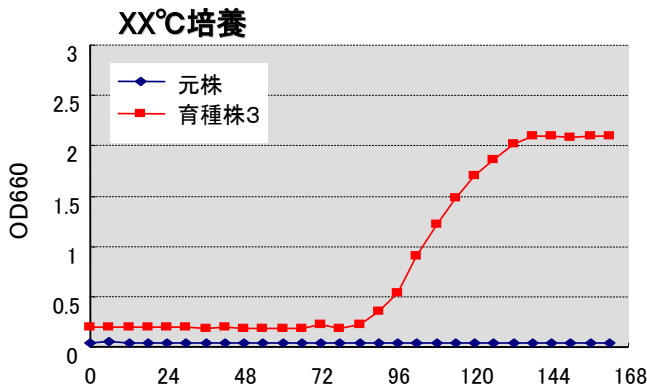
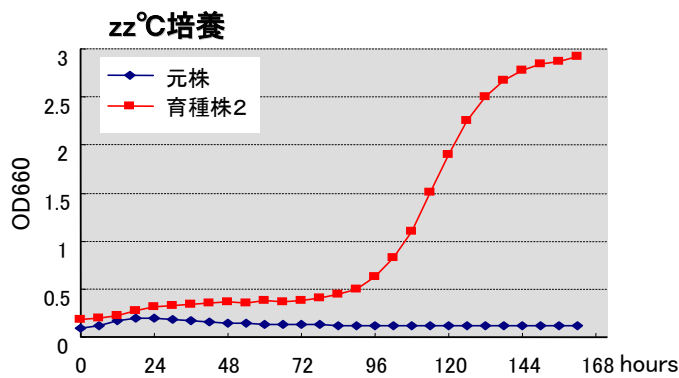
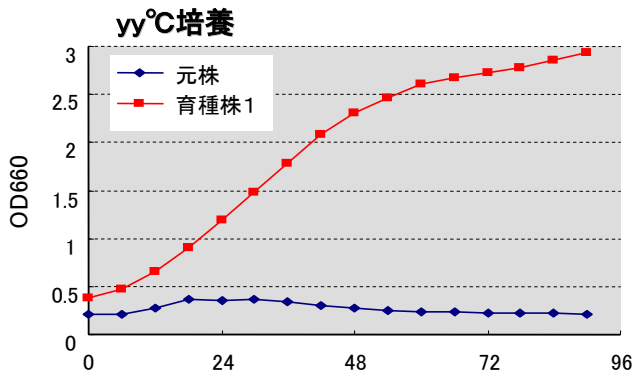


図 3-3 yy°Cおよび zz°C耐性株の取得

yy°C(上), zz°C(下)での増殖曲線を示した。(上)育種株1は培養90時間で最大濁度 OD660 = 3.0 に達した。元株 JCM9684 は増殖出来なかった。(下)育種株2は培養150時間で最大濁度 OD660 = 3.0 に達した。元株 JCM9684 は増殖出来なかった。

図 3-4 XX°Cおよび YY°C耐性株の取得

XX°C(上), YY°C(下)での増殖曲線を示した。(上)育種株3は培養130時間で最大濁度 OD660 = 2.0 に達した。元株 JCM9684 は増殖出来なかった。(下)育種株4は培養240時間で最大濁度 OD660 = 1.2 に達した。元株 JCM9684 は増殖出来なかった。

(3) アスタキサンチン高生産株の育種

ファフィア酵母ミューテーター株混合培養液(前述#1~#3を適宜混合して得た)より、アスタキサンチン高生産株を育種した。様々な生育阻害剤、および生理的ストレス条件下にミューテーターを暴露し、寒天平板培地上で形成したコロニーの色を指標としてアスタキサンチン高生産株をスクリーニングした。

育種選抜されたアスタキサンチン生産株のうち、より安定してアスタキサンチンを高生産する菌株(育種株11および12)を樹立し、アスタキサンチン以外のカロチノイドを生産すると考えられた菌株(育種株9および10)を樹立した(図3-5)。

アスタキサンチンは赤色のカロチノイドであるため、アスタキサンチン生産菌は赤色を呈するが、育種株9および育種株10はそれぞれ黄色および橙色を示した。このことは、育種株9および10が、アスタキサンチン以外のカロチノイドを生産していることを示唆していた。分析結果については後述した。

元株 JCM9684 は、アスタキサンチン生産量が低いため赤色というよりはむしろ肌色を呈した。比較して、アスタキサンチン高生産性株であるファフィア酵母 Y727 株は強い赤色を呈した。本研究開発において元株 JCM9684 株を育種して得られた育種株 11 および 12 については Y727 株と同等かそれ以上に強い赤色を呈したことから、Y727 を凌ぐ高生産株であることが期待された。(後述するように、定量分析の結果、確かに Y727 以上の生産性が確認された。)

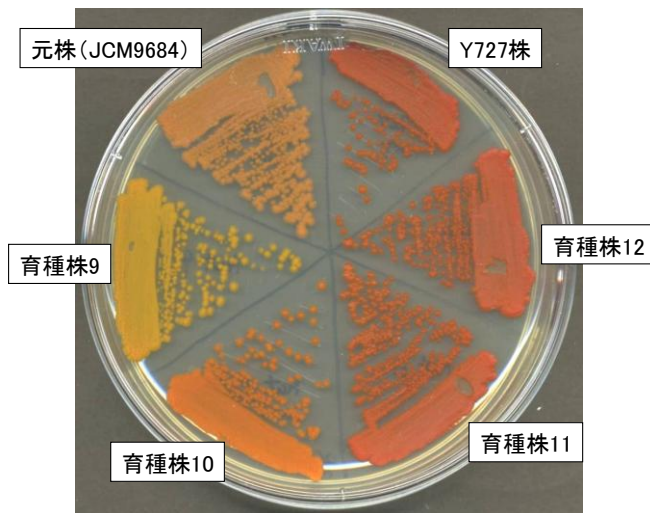


図3-5 アスタキサンチン高生産株の樹立 ファフィア酵母元株 JCM9684, アスタキサンチン高生産ファフィア酵母株 Y727, JCM9684 ミューテーターを育種して得られた育種株9~12をYM寒天平板培地にストリークし、23°C培養した。

アスタキサンチン生産性が低い元株 JCM9684 は、肌色に近い赤みを呈した。アスタキサンチン高生産株 Y727 は赤色(アスタキサンチンの色)を呈した。JCM9684 ミューテーターを育種して得られた育種株 11 および 12 は、Y727 と同等かそれ以上の強い赤色を呈したことから、高いアスタキサンチン生産性が示唆された。育種株9および10は、黄色、橙色を呈したことからアスタキサンチン以外のカロチノイドを生産していることが示唆された。

アスタキサンチン高生産株について 23°C培養時の増殖性とアスタキサンチン生産性について試験評価した(図 3-6, 表 3-7). 試験対象とした菌株は, 元株 JCM9682, 高生産株 Y727, 高生産育種株 11 および 12, 未同定カロチノイド生産育種株 10 について評価した. OD600 による増殖曲線を作成したところ, Y727 株は増殖性に難があり, とくに増殖速度が極端に悪く最大濁度も下振れた. 元株 JCM9684 は培養 50 時間で最大濁度 10 にまで達した. 以下, 育種株 10 につづいて育種株 11, 12 は良好に増殖したものの, 元株よりはやや増殖性が良くなかった. ただし, 十分良好な増殖性であることが確認された. アスタキサンチン生産量はいずれの株についても培養時間に正比例し, 培養終了時の 96 時間でピークに達した. 最大生産量について, 育種株 11 および 12 の生産量はそれぞれ元株 JCM9684 株の 6 倍以上に向上した. さらに特筆すべきことに, 両育種株の生産量は, 高生産株として知られる Y727 株のそれを上回り, それぞれ 1.2 倍以上に向上した.

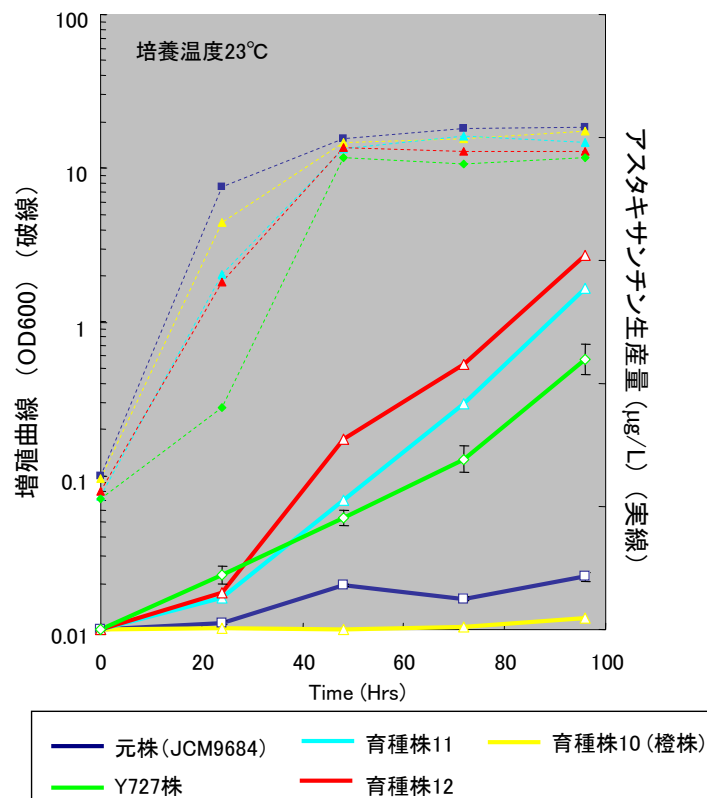


図 3-6 増殖曲線とアスタキサンチン生産量

元株 JCM9684, 高生産性 Y727 株, 高生産性育種株 11 および 12, 育種株 10 について, 増殖曲線(濁度 OD600)を作成した. また, 各菌株培養菌体からカロチノイドを抽出, HPLC 分析してアスタキサンチン定量を行った. 育種株 11 および 12 は, 高生産株 Y727 株よりも高い生産性を示した.

アスタキサンチン生産量 (μg/L)

	72時間	96時間
元株 (JCM9684)	75.7	128.9
Y727株	415.2	659.5
育種株10 (橙株)	7.1	28.4
育種株11	XXXX	XXXX
育種株12	XXXX	XXXX

表 3-7 各株, 各培養時間におけるアスタキサンチン生産量

図 2-2-6 に示したアスタキサンチン生産量グラフの実際の数値を表にまとめた

(4) 高温度耐性アスタキサンチン高生産株の育種

高温度耐性を付与した株はアスタキサンチン生産性が低下する傾向にあった。そこで、アスタキサンチン高生産育種株 12 をベースにして育種改良を進め、ZZ°C下で増殖可能な高温度耐性能を付与した(図 3-8)。当該育種株を育種株 12-2082 と命名した。元株 JCM9684 株は ZZ°C下で増殖することができないが、育種株 12-2082 は OD600 = 3.0 以上にまで増殖した。

高温度耐性育種株 12-2082 についてアスタキサンチン生産量を解析した(図 3-9)。その結果、育種株 12-2082 のアスタキサンチン生産量が元株の 3 倍以上に上昇していることが示された。以上の結果は、高温度耐性でかつアスタキサンチンを高生産するファフィア酵母株が育種、樹立されたことを示している。

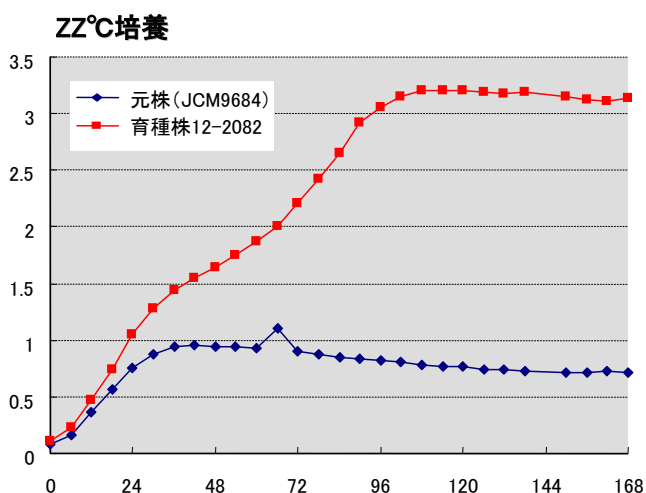


図 3-8 育種株 12-2082 の高温度耐性

元株 JCM9684 および育種株 12-2082 を YM 液体培地にて ZZ°C下で培養し、OD660 による増殖曲線を作成した。ZZ°C条件では元株は増殖することができないが、育種株 12-2082 は増殖することができた。

生産培養72時間後の
アスタキサンチン生産量
($\mu\text{g/L}$)

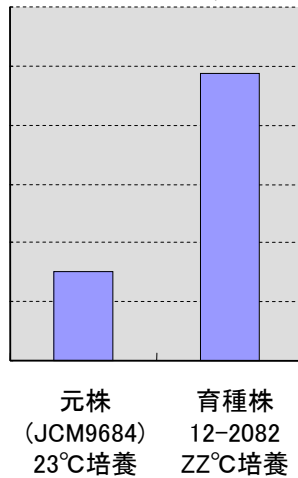


図3-9 育種株12-2082のアスタキサンチン生産量

元株 JCM9684 株の 23°C培養時 72 時間でのアスタキサンチン生産量を示した。また、高温耐性育種株 12-2082 の 22°C培養 72 時間後のアスタキサンチン生産量を示した。

(5) まとめ

以上のように、不均衡変異導入法に基づく育種法によってファフィア酵母ミューテーターを育種し、アスタキサンチン生産性改良株(高温で生育可能なアスタキサンチン高生産株)の取得を目指して本研究開発を進めた。

ファフィア酵母の不均衡変異型ミューテーター株を作成するにあたり、まず DNA 複製酵素 DNA polymerase delta (Poldelta) をコードするファフィア酵母 pol3 遺伝子をクローニングした。出芽酵母、麹菌などの近縁種との配列比較解析により酵素の活性中心を特定して改変し、高度でかつ多様な変異を与える Poldexo-型を作成した。染色体組み込み型ベクターを用いて Poldexo-発現ベクターを作成し、ファフィア酵母 JCM9684 株に導入してミューテーターファフィア酵母株を作成した。野生株と同等のアスタキサンチン生産性を維持し、かつ高い変異導入効率と幅広い変異タイプ導入を可能としたミューテーター株を樹立して、以下の育種フェーズに移行した。

ファフィア酵母のアスタキサンチン生産性を改良する目的で、高温下での増殖性の獲得およびアスタキサンチン産生量の増産を目指し、様々な生理ストレス・薬剤への暴露による外的刺激を積み重ねてファフィア酵母ミューテーター株の育種改良を進めた。その結果、高温下(野生株が増殖できないレベルの温度)で良好に増殖可能な株を取得した。また、通常培養温度で親株の 6 倍以上のアスタキサンチンを生産する高生産株を取得した。同時に、アスタキサンチン以外のカロチノイドを産生するファフィア酵母も合わせて取得した。ここまでの問題点として、高温下で増殖可能な株はアスタキサンチン生産性が低下してしまうということが挙げられた。そこで、アスタキサンチン高生産株を最初に付与し、その後高温下での増殖性を付与する育種方法に切り替えたところ、最終的に高温下で増殖可能でかつアスタキサンチンを大量生産する株(育種株 12-2082)を取得することに成功した。当該株の取得に至り、当初目的を 100%達成することが出来た。

第4章 酒石酸生産微生物の育種

(主担当;株式会社ハイファジェネシス、副担当;玉川大学)

酒石酸は、酸味付けや味の調整剤、pH 調製剤、日持ち向上のための添加物として清涼飲料をはじめ、漬物、菓子類などの食品分野や保湿剤、媒染剤、キレート剤として化粧品、染色、洗剤、金属洗浄、電気メッキ、医薬品の原料などの工業分野でも幅広く利用され、今後も用途の拡大が期待される。2002 年の報告であるが世界的な L-酒石酸の生産高は年間約 3 万 5 千トン、2005 年の国内の生産は約 1 千トンと報告されている。

本プロジェクトを開始した平成18年度の時点では、*Gluconobacter oxydans* の 5-ケトグルコン酸から酒石酸に到る生合成経路を解明し、対応する遺伝子を取得し、生合成経路における律速段階をメタボロームなどの技術で解析し、酒石酸生産菌株の高速育種を進める予定であった。しかし、研究の過程で、*G. oxydans* は、グルコースから 5-ケトグルコン酸は生産するが、酒石酸への変換には培地にバナジン酸を添加しなければならず、それは酵素反応ではないという結論が得られた。そのため、平成19年度以降は研究方針を転換し、グルコースから 5-ケトグルコン酸を経

由する酒石酸生産プロセスを2つの工程に分けて改良を試みた。すなわち、グルコースから 5-ケトグルコン酸への *G. oxydans* による変換工程と 5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換工程にわけ、それぞれの工程を改良することにした。

また一方、玉川大学の保存菌ライブラリーや自然界から酒石酸を生産する菌株を分離する事を目的に、まずグ

ルコースを消費して酸を生成することを指標として菌株のスクリーニングを行った。しかしながら、酸生成菌の代謝物を調べた結果、グルコースから酒石酸を生産する菌株を見いだすことは出来なかった。(図4-1参照)

酢酸菌のグルコースから酒石酸の生成経路

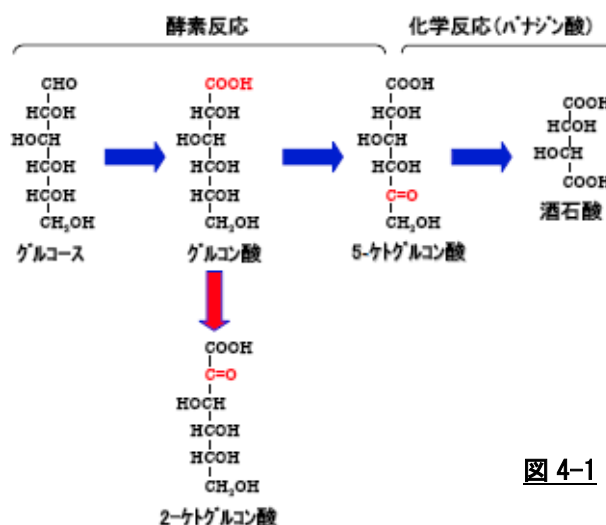


図 4-1

(1) *Gluconobacter oxydans* によるグルコースから 5-ケトグルコン酸生産の効率化

酢酸菌の一種である *G. oxydans* に属する菌株の中から、比較的多量の 5-ケトグルコン酸を生産する菌株を親株として選抜しその後の研究を進めた。本菌株は同時に不要な産物で

ある 2-ケトグルコン酸を副生成し、そのため 5-ケトグルコン酸の収率が相対的に低下する原因となっているので、2-ケトグルコン酸を生産しない突然変異株を取得した。そうすることによって、5-ケトグルコン酸のグルコースからの収率を大幅に改善することが出来た。結果として、グルコースから 5-ケトグルコン酸への収率は約 90%を達成することが出来た。

(2) 5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換

(ア) 微生物による 5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換

本章冒頭に記載したように、*G. oxydans* による 5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換反応を解析した結果、変換は、菌株による酵素反応ではなく、培養液に微量含まれるバナジン酸による効果であることがほぼ明らかとなった。そこで、あらたに 5-ケトグルコン酸から酒石酸へ変換する能力のある微生物の探索を行った。

5-ケトグルコン酸を単一炭素源として生育する微生物を分離し、5-ケトグルコン酸から酒石酸を生産する微生物の検索を試みた。国内の36土壌検体を生理食塩水で懸濁後、5-ケトグルコン酸を炭素源とした半合成寒天培地(1%5-ケトグルコン酸, 0.2%硫酸アンモニウム, 0.2%塩化ナトリウム, 0.02%塩化カリウム, 0.03%硫酸マグネシウム, 0.01%リン酸2水素カリウム, 0.03%酵母エキス, 1%炭酸ナトリウム, 1.5%寒天)に塗布し、171株を分離した。それらの分離株は生産培地(2%5-ケトグルコン酸, 0.5%ペプトン, 0.3%酵母エキス, 0.2%硫酸アンモニウム, 0.01%リン酸2水素カリウム, 0.03%硫酸マグネシウム, 0.001%硫酸マンガン, 0.001%硫酸第1鉄, 1%炭酸ナトリウム)を含む試験管で6日間培養し、培養液中の酒石酸の量を HPLC により定量した。その結果候補株3株を選び、2%および3%の5-ケトグルコン酸を炭素源とした生産培地で培養を行い、酒石酸の生産性を調べたところ、3株とも酒石酸の生産が確認された。

しかし、酒石酸生産試験では、微生物の非存在下でも、5-ケトグルコン酸を含有する培地を浸とう攪拌することによって、化学反応によると思われるが、ある程度の酒石酸が生成したことから、酒石酸の生成に対する細胞酵素の関与を明確にするために、5-ケトグルコン酸を基質とした休止菌体反応で酒石酸の生成を調べた。その結果、3株とも生細胞を含む反応では約 20 g/l の酒石酸を生成し、オートクレーブで滅菌した死細胞あるいは細胞なしの条件では生細胞の条件の約半分量の約 12 g/l の酒石酸が生成したことから、生成した酒石酸の約半分量は細胞によって生成されたと考えられた。

(イ) 化学触媒による 5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換

発酵生産された 5-ケトグルコン酸をもちいて、化学触媒処理によって酒石酸を生産させる方法を検討した。5-ケトグルコン酸ナトリウム塩の溶液の pH をアルカリにし、そこにある種の化学触媒を用いて酒石酸への変換を試みたところ、終濃度で約 23g/l の酒石酸が生成した。

また、5-ケトグルコン酸のカルシウム塩をアルカリ条件にすることで可溶化し、化学触媒処理することで約 32 g/l の酒石酸生成が確認された。

更に収量を上げるために高濃度の 5-ケトグルコン酸塩をもちいてアルカリ条件下で同様の化学触媒処理を行ったところ、約 60 g/l の酒石酸を生成させることが出来た。

(ウ) 酒石酸の精製方法の検討

微生物発酵プロセスにおいては、培地成分等に由来する成分が多種類で多量に含まれていることが多いため、一般的に水溶性物質の精製にはかなりのコストがかかることが多い。しかし、酒石酸は 1-カリウム塩として沈澱しやすいという性質があることから、その性質を利用して、反応液から酒石酸の回収を試みたところ、簡便な精製方法を見いだすことが出来た。反応液を遠心した後、上清の一部を塩酸酸性にして一晩冷蔵したところ沈澱が析出したのでこれを回収、再結晶することにより高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で単一のピークを示す酒石酸の結晶を得られた。さらに本 HPLC 条件では酒石酸異性体は分離できないことから、D-リング酸脱水素酵素を用いる酵素学的手法 (Tsukatani, T.ら, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63, 1730-1735, 1999) で、得られた酒石酸の絶対構造を推定した。その結果、精製した酒石酸はほぼ 100%が L-酒石酸であることが判明した。

(3) 微生物資源よりの酒石酸高生産株の探索

玉川大学ライブラリーから選出した酒石酸生産が報告されている属 (*Penicillium*, *Aspergillus* 属など) 7属 1,113 株と新規分離株 56 属 322 株の合計 1,435 株を用いて、酸生産菌の探索を目的とする 1 次スクリーニングを実施した。その結果、452 株のライブラリー菌株および 68 株の新規分離株を酸生産菌として選出した。これら 520 株を用いて、酒石酸生産菌探索を目的とした 2 次スクリーニングを行ったが、酒石酸生産菌は検出されなかった。

また、バクテリアでは *Gluconobacter* 属細菌以外に、*Pseudomonas* 属細菌が酒石酸を生産することが過去に報告されていたので、ライブラリーに保存されている 31 株の *Pseudomonas* 属細菌を用いて検討を行った結果、*Ps. taetrolens* に酒石酸の生産を認めた。本菌は 5-ケトグルコン酸から酒石酸を生成する条件で、中間体と思われる化合物の蓄積が認められたので、単離精製し構造を調べたが、これらの化合物は中間体になりうる構造ではないことが判明した。本菌を用いて、培養条件の検討などを行ったが、酒石酸生産性の改良は認められなかったため、本菌を用いたさらなるプロセス開発に向けた検討は中止した。

(4) まとめ

平成18年度の本プロジェクト研究の過程で、*G. oxydans* は、グルコースから 5-ケトグルコン酸は生産するが、酒石酸への変換には培地にバナジン酸を添加しなければならず、酵素反ではないと結論された。そのため、平成19年度以降は研究方針を転換し、グルコースから 5-ケトグルコン酸を経由する酒石酸生産プロセスを2つの工程に分けて改良を試みた。すなわち、グルコースから 5-ケトグルコン酸への *G. oxydans* による変換工程と 5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換工程にわけ、それぞれの工程を改良することにした。平成19年度は *G.*

oxydans を親株として、不要産物である2-ケトグルコン酸を生産しなくなった変異株を導き、グルコースから5-ケトグルコン酸の変換効率を改善した。

一方、5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換では2つの方法で研究を進めた。1つは化学触媒を用いる方法、もう1つは化学触媒の代わりに *G. oxydans* 以外の微生物を用いる方法である。化学触媒を用いる方法ではグルコースから効率良く5-ケトグルコン酸へ変換する *G. oxydans* 変異株と組み合わせて酒石酸生産を評価し、平成19年度の実績の約4倍高い酒石酸生産(約60g/L)を達成した。さらに生産された酒石酸を含む培養液から容易に酒石酸を採取する方法を確立し、生産された酒石酸が L-体であることを明らかにした。

一方、微生物を用いる5-ケトグルコン酸から酒石酸を生産させる方法では、新たに自然界から5-ケトグルコン酸から酒石酸を生産する微生物のスクリーニングを行い、高収率で酒石酸を生産する微生物を得た。さらにそれらの株の休止菌体反応で5-ケトグルコン酸から酒石酸の生成を調べた結果、生産された酒石酸の約50%は細胞により生成されていることが明らかとなった。この微生物を用いて、5-ケトグルコン酸から酒石酸への変換反応の機構についての研究を進めて行くことにより、本プロジェクトの当初の目的であった、グルコースから酒石酸の効率的な発酵プロセスの開発を進めて行くことが可能になると考えられる。

以上