

コリネ型細菌 MJ 233 株の分子育種法の確立と その菌学的特徴を利用した新規バイオプロセスの開発†

(1997 年度農芸化学技術賞受賞)

小林 幹, 内田 康一, 寺沢 真人, 湯川 英明

(三菱化学株式会社 開発本部 筑波研究所)

Key words : Coryneform Bacteria ; *Brevibacterium flavum* MJ-233 ; recombinant DNA technology ; membrane reactor system

はじめに

近年の遺伝子組換え手法とともに、工業的に有用なコリネ型細菌の分子育種法の開発が望まれていた。我々は長年コリネ型細菌、*Brevibacterium flavum* MJ-233 株の分子育種法の検討を実施し、工業的応用に必要な主要要素技術の確立に成功した。

MJ-233 株は、生育抑制条件下においても、溶菌現象を示さないという優れた特性を有しており、この特性と上述の分子育種技術とを組み合わせるにより、新規バイオプロセスを開発するに至った。このプロセスの最大の特徴は、化学反応法にも匹敵する高い生産性にある。

我々のプロセスによる生産物例として後述するアミノ酸 L-アスパラギン酸は、その化合物としての反応性に富んだ構造から、多くの誘導体に関する製法、利用面での研究が世界各国で行なわれ、大規模かつ多様な環境適合型の製品群の登場が期待されている(図 1)。しかしながら、幅広い用途への利用には“素材”となる L-アスパラギン酸の高価格が大きな障害となっていることから、これまでのバイオプロセスにとらわれない革新的な技術開発が望まれていた。

コリネ型細菌分子育種に係わる要素技術

コリネ型細菌は、1950 年代後半、L-グルタミン酸を高効率で生産する菌株として、日本で初めて分離された、孢子形成能を有さないグラム陽性細菌である⁽¹⁾。周知の通り、コリネ型細菌は種々のアミノ酸プロデューサーとしてバイオ産業上重要な微生物となった⁽²⁻⁴⁾。

我々が見いだしたエタノール資化性の非溶菌性コリネ型細菌 *Brevibacterium flavum* MJ-233 株は後述する優れた特性を有しており、本特性を利用した新規なバイオプロセスの開発を開始した。

高効率なバイオプロセスの構築に必要な技術要素となる組み換え DNA 技術の利用に関して、我々の研究開発当初においては、コリネ型細菌の形質転換能が低いことや、プラスミドの宿主内不安定性等、種々の技術的課題があった。このような背景から、まず、MJ-233 株の分子育種技術の開発に着手した。

(1) 形質転換技術 研究開始当時(1980 年代前半)、コリネ型細菌を宿主とするプラスミドの形質転換法はプロトプラスト法が用いられていたが⁽⁵⁻⁷⁾、形質転換率が低く(約 10^4 形質転換株数/ $1 \mu\text{g}$ プラスミド DNA)、また、操作の煩雑性や長時間を要すること等が課題となっていた。

誘導体用途

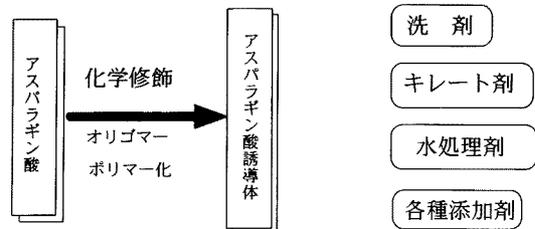


図 1 L-アスパラギン酸の用途

† Establishment of Recombinant DNA Technology for Coryneform Bacteria, *Brevibacterium flavum* MJ-233, and Development of New Bioprocess, Membrane Reactor System

Miki KOBAYASHI, Yasukazu UCHIDA, Masato TERASAWA, and Hideaki YUKAWA
(Tsukuba Research Center, Mitsubishi Chemical Corporation)

表 1 形質転換効率の改良

Donor Strain	Donor Strain genotype	<i>B. flavum</i> MJ 233 transformation efficiency (tfs/ μ g)	<i>C. glutamicum</i> ATCC 31831 transformation efficiency (tfs/ μ g)
<i>B. flavum</i> MJ 233	wild-type	4.0×10^7	1.2×10^4
<i>C. glutamicum</i> ATCC 31831	wild-type	N. D.	3.9×10^4
<i>E. coli</i> JM 110	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻	4.0×10^7	2.8×10^4
<i>E. coli</i> GM 33	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁺	1.8×10^6	1.0×10^4
<i>E. coli</i> GM 31	<i>dam</i> ⁺ , <i>dcm</i> ⁻	4.5×10^4	1.3×10^4
<i>E. coli</i> HB 101	<i>dam</i> ⁺ , <i>dcm</i> ⁺	6.0×10^4	2.0×10^4
<i>E. coli</i> JM 110/ <i>dam</i> methylase		1.7×10^4	N. D.

我々は、植物等の高等生物の形質転換に用いられていた電気パルス法に着目し、コリネ型細菌において、高い形質転換効率(約 10^{6-7} 形質転換株数/ 1μ g プラスミド DNA) が得られることを明らかにした⁽⁸⁾。さらに、コリネ型細菌における外来 DNA に対する制限修飾系を回避させることにより、形質転換効率を著しく上昇させることが可能であることを見いだした^(9,10)。すなわち、非修飾型 DNA を用いて同系を回避させることにより、プラスミド DNA 1μ g 当たり約 $1 \times 10^{8-9}$ という高い形質転換株数を得る方法を確立した^(9,10)(表 1)。

(2) プラスミド安定化技術 組換え DNA 技術に基づく応用において、組換えプラスミドの安定化は、工業的規模で培養する際に最も重要な課題の一つである。これはプラスミド脱落株と保持株との生育速度の優劣が積算され、プラスミド保持株の割合が急速に低下することによる。従来、組換え菌体の培養では抗生物質を培地に添加することでプラスミド保持菌体のみを選択的に生育保持させる対応が一般的であった。しかし抗

生物質使用によるコストアップ、抗生物質由来する分解物が回収・精製を困難にするということが問題であった。かかる背景から薬剤等の外的要因に左右されずにプラスミドを安定に保持させる技術の開発が望まれていた。

自然界から分離されたプラスミドの中には、低コピー数であるにもかかわらず、細胞分裂の際、ほとんど脱落することなしに安定に娘細胞に分配されていく現象が認められる。このようなプラスミドの安定化機構に関しては、1980 年代に大腸菌 miniF プラスミドについて報告が出されている⁽¹¹⁻¹⁴⁾(図 2 参照)。

我々はこのような安定化機構がコリネ型細菌由来のプラスミドにも存在すると想定し、種々のコリネ型細菌からプラスミドを検索した。その結果、比較的低コピー数であるにもかかわらず、継代培養後も安定に娘細胞に分配保持されるプラスミドを見出し、この安定化に寄与する遺伝子領域を特定化した⁽¹⁵⁾。本領域を導入したプラスミドを作製し、宿主内安定性を評価し

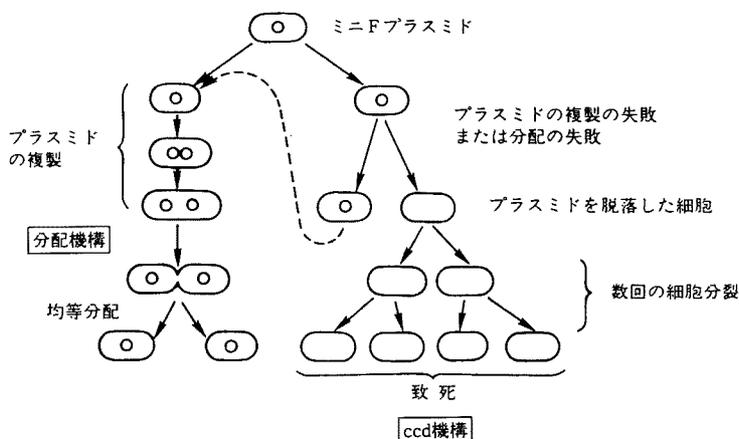


図 2 プラスミド安定化機構(大腸菌) (平賀杜太 細胞工学 Vol. 16, p 37 より引用)

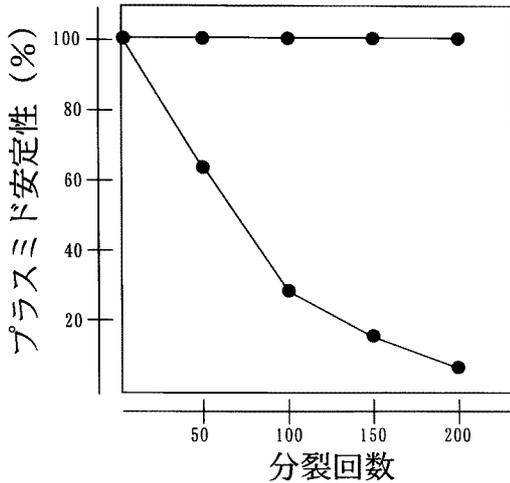


図 3 プラスミドの安定化

たところ、非選択圧条件下で約 100 世代以上安定にプラスミドを保持させ得ることを確認し、プラスミドの宿主内高度安定化技術を確立した (図 3)。

本領域によるプラスミドの安定化機構は、コピー数の増加変異によるものではないこと、また、2 種のプラスミドを共存させた場合、本領域を含有するもののみ安定に保持されたこと、および塩基配列決定の結果、本領域には蛋白質がコードされていないことから、F プラスミドや R プラスミドにみられる細胞致死機構^(13,14)とは異なる機構によるものであることを明らかにした⁽¹⁵⁾。組換え DNA 技術の実用化に際し、目的蛋白質の生産効率アップ及び安全性の観点から、'余分'な蛋白質の発現は望ましくなく、本領域が蛋白質をコードしないことは、重要なことである。

(3) 工業的ベクターの確立 ①ベクター 我々は各種のプラスミドを単離しており、その中の 1 つであるプラスミド pBY 503 については⁽⁸⁾、上述の安定化機構を有していることから、本プラスミドの安定化領域・

複製に必要な領域の最小化、コピー数の増大等の改良を加え、工業用ベクターを構築している。

その後、内外の研究機関により単離されているコリネ型細菌由来のプラスミドをグループごとに分類し、表 2 に掲げた。pBY 503 の複製に必要なプラスミドコードの蛋白質 (RepA) のアミノ酸配列は、pNG 2 プラスミドの RepA 蛋白質と高い相同性を有しており、pNG 2 と 1 つのグループを形成している。また、pSR 1 プラスミドに代表されるグループのプラスミドと共存可能であることが判明した⁽¹⁶⁾。

②遺伝子発現 大腸菌・枯草菌由来のプロモーター・SD 配列については、コンセンサス配列やシグマ因子の解析をはじめ、多数の知見が集積しているが、コリネ型細菌内における遺伝子の発現 (プロモーター・SD 配列) に関する情報は現在においても非常に少ない。我々は、プロモータープローブベクターを作製し、コリネ型細菌より多くの強力なプロモーター断片を多数取得している⁽²³⁾。

新規バイオプロセスへの応用

酵素反応による有用物質の生産においては、主に固定化酵素・菌体によるプロセスが工業化されている。一般的に固定化法は、一回ごとの菌体を使い捨てとなる旧来のバッチ法と比較し、触媒調製コストが低減化するという利点を有している。しかしながらその反面、無菌条件下での菌体の固定化といった煩雑な工程が必要なこと、固定化ゲルを用いる反応塔は、反応様式、基質や生成物の化学的諸性質の違いにより個別の使用が必要となり、汎用化が困難なこと、また固定化ゲル内の雑菌汚染対策が容易ではないなどの工業的課題を有している。

L-アスパラギン酸生産プロセス

我々は、マレイン酸を原料とし、2 種の酵素機能〔マレイン酸 cis/trans イソメラーゼ (EC 5.2.1.1)、アス

表 2 コリネ型細菌由来プラスミド

Group	Plasmid	Bacterial Source	Size (kb)	Ref.
pBY 503	pBY 503	<i>B. stationis</i> IFO 12144	16.2	(8)
	pNG 2	<i>C. diphtheriae</i> C7	14.4	(17)
pBL 1	pBL 1	<i>C. lactofermentum</i> ATCC 21798	4.4	(18)
	pAM 330	<i>C. lactofermentum</i> ATCC 13869	4.5	(19)
pSR 1	pSR 1	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13058	3.1	(20)
	pCG 1	<i>C. glutamicum</i> ATCC 31808	3.2	(21)
pGA 1	pGA 1	<i>C. glutamicum</i> LP-6	4.9	(22)

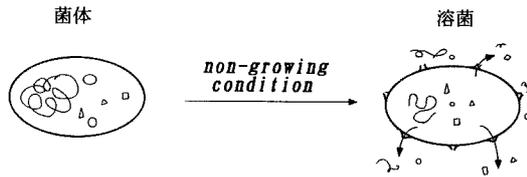


図4 溶菌現象

パルターゼ (EC 4.3.1.1) により, L-アスパラギン酸を生成するプロセスを開発した。各々の酵素活性の増強のため, MJ-233 株, *Alcaligenes fecalis* IFO 13111 より各々アスパルターゼ, イソメラーゼ遺伝子を単離し, 前述の工業用ベクターを用いて作製した MJ-233 株組み換え体をプロセスに使用している。

本プロセスは, 「生物的」および「工学的」な特性, 新規性を活かして構成されている。生物的特性として, 選択した微生物 (*Brevibacterium flavum* MJ-233) は, 過酷な条件下でも溶菌現象を示さず, 菌体内酵素活性を長時間維持しうる特性を有している (図4)。

この特性を生かし, 固定化などの人為的補強を必要とせず, intact cell を用いる菌体リサイクルによる長時間使用が実現した。工学的特性としては, 菌体のリサイクルにおいて, 1980 年代に急速に研究開発が進展した限外濾過膜 (UF 膜) を使用したことである。これにより, 微生物分離にこれまでよく用いられてきた遠心分離法では避けられない菌体への物理的損傷を最小限におさえることができた。

即ち, 一般的に固定化において課題となる, 固定化ゲル内の物質移動の問題や, ゲルによる触媒容積の増大に伴うリアクター当たりの生産性の低下, またプロセスの汎用化が困難などの問題点を抜本的に解決することに成功した。反応プロセスは, 汎用型攪拌槽と限外濾過膜から成る極めてシンプルな膜型リアクターである。原料マレイン酸を連続的にリアクターに供給することでほぼ理論平衡値において L-アスパラギン酸への変換反応が可能であり, 長期間の連続反応が可能と

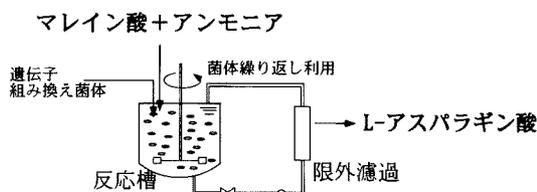


図5 L-アスパラギン酸生産プロセス

なった。このように本プロセスは, MJ-233 株の特性を十分に考慮した極めてシンプルな省エネ型プロセスとして構築されている (図5)。

終わりに

我々は, 非溶菌性コリネ型細菌の MJ-233 株の分子育種法を確立したことで, MJ-233 株菌体内の特定の酵素系を強化することを可能にした。2種の酵素 (イソメラーゼ & アスパルターゼ) 系を強化し, マレイン酸原料からの L-アスパラギン酸生産へ応用し, 飛躍的な生産性向上を達成した。本技術は, 膜リアクタープロセスとの組み合わせにより, 種々の物質生産が可能となることが期待される。我々は, 本技術開発を通して, バイオプロセスの1つの方向性を示したものと信じる。

最後に, 本研究遂行にあたり, 永年にわたり, 多くの先生方の御指導・御鞭撻を戴きましたことを深く感謝致します。

- (1) J. Udaka : *J. Bacteriol.*, **79**, 754-755 (1960).
- (2) K. Yamada, S. Kinoshita, and K. Aida : The microbial production of amino acids. Wiley, New York (1972).
- (3) S. Kinoshita, S. Udaka, and M. Shimono : *Appl. Microbiol.*, **3**, 193-205 (1957).
- (4) M. Terasawa, H. Yukawa, and Y. Takayama : *Process Biochem.*, **20**, 124-128 (1985).
- (5) R. Katsumata, A. Ozeki, T. Oka, and A. Furuya : *J. Bacteriol.*, **159**, 306-311 (1984).
- (6) A. Ozeki, R. Katsumata, T. Oka, and A. Furuya : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2597-2601 (1984).
- (7) P. Yeh, J. Oreglia, and A. M. Sicard : *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 3179-3183 (1985).
- (8) Y. Satoh, K. Hatakeyama, K. Kohama, M. Kobayashi, K. Kurusu, and H. Yukawa : *J. Ind. Microbiol.*, **5**, 159-166 (1990).
- (9) A. A. Vertes, M. Inui, M. Kobayashi, K. Kurusu, and H. Yukawa : *Res. Microbiol.*, **144**, 181-185 (1993).
- (10) A. A. Vertes, K. Hatakeyama, M. Inui, M. Kobayashi, Y. Kurusu, and H. Yukawa : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 2036-2038 (1993).
- (11) H. Mori, A. Kondo, A. Ohshima, T. Ogura, and S. Hiraga : *J. Mol. Biol.*, **192**, 1-15 (1986).
- (12) T. Ogura and S. Hiraga : *Cell*, **32**, 351-360 (1983).
- (13) S. Hiraga, A. Jaffe, T. Ogura, H. Mori, and H. Takahashi : *J. Bacteriol.*, **166**, 100-104 (1986).
- (14) A. Jaffe, T. Ogura, and S. Hiraga : *J. Bacteriol.*, **163**, 841-849 (1985).
- (15) Y. Kurusu, Y. Satoh, M. Inui, K. Kohama, M.

- Kobayashi, M. Terasawa, and H. Yukawa : *Appl. Env. Microbiol.*, **57**, 759-764 (1991).
- (16) unpublished data
- (17) T. M. Serwold-Davis, N. Groman, and M. Rabin : *Proc Natl Acad Sci. USA*, **84**, 4964-4968 (1987).
- (18) R. Santamaria, J. A. Jil, M. Mesas, and J. F. Martin : *J. Gen Microbiol.*, **130**, 2237-2246 (1984).
- (19) K. Miwa, H. Matsui, M. Terabe, S. Nakamori, K. Sano, and H. Momose : *Agric Biol. Chem.*, **48**, 2901-2903 (1984).
- (20) M. Yoshihama, K. Higashiro, E. A. Rao, M. Akedo, W. G. Shanabruch, M. T. Follettie, G. C. Walker, A. J. Sinskey : *J. Bacteriol.*, **162**, 591-597 (1985).
- (21) A. Ozaki, R. Katsumata, T. Oka, and A. Furuya : *Mol. Gen. Genet.*, **196**, 175-178 (1984).
- (22) H. Sonnen, G. Thierbach, S. Kautz, J. Kalinowski, J. Schneider, A. Puhler, and H. J. Kutzner : *Gene*, **107**, 69-74 (1991).
- (23) T. J. Zupancic, J. D. Kittle, B. D. Baker, C. J. Miller, D. T. Palmer, Y. Asai, M. Inui, A. Vertes, M. Kobayashi, Y. Kurusu, and H. Yukawa : *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 121-126 (1995).
-