グルタミン酸生産菌の宿主ベクター系の開発と応用

勝亦瞭一, 岡 徹夫, 古屋 晃*

アミノ酸の発酵生産技術は、日本で確立されたものであり、世界に誇り得る業績の一つである。この成果は、主に大腸菌を対象とした生化学、分子遺伝学で蓄積された知識や研究手法を活かし、応用の世界に結実させたものであった。そして現在、アミノ酸生産菌で組換え DNA 技術が可能となり、実用化されている物質生産の分野でも遺伝子工学の効力が示されようとしている。

1956 年に木下、鵜高らにより、特定の培養条件でグルタミン酸を生成蓄積する微生物 *Corynebacterium glutamicum* が発見されてから 30 年になる。この発見は、糖質と無機窒素源を主成分とする培地に微生物を培養しアミノ酸を直接培地中に著量蓄積させるアミノ酸発酵の最初の成功例であった。同時に当時需要の増大していた調味料グルタミン酸ナトリウムを安価に供給できる産業上のインパクトが大きかったため、大変な反響を呼んだことは周知のとおりである。その後、多くの研究者により糖質からグルタミン酸を生産する類似の細菌が分離され、*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Arthrobacter* 各属の新種と命名された。しかし、これらの細菌は、グラム陽性・ビオチン要求性であることをはじめ、生理学的性質が近似しているだけでなく、最近の化学分類 (Chemotaxonomy)・DNA の相同性の研究からも類縁性が確認されており、*Coryneform* 細菌の中できわめて近縁な一群に属するとみなされている。これらの細菌は通称グルタミン酸生産菌と呼ばれている。

グルタミン酸発酵の成功を契機として、他のアミノ酸の発酵研究も、アミノ酸の用途が食品、飼料、医薬、化成品へと拡大するとともに、わが国で活発に行なわれてきた。これらの研究は、野生株に存在する代謝調節機構が遺伝的に解除された変異株を誘導する育種研究としてすすめられ、種々のアミノ酸発酵が開発されてきた。この代謝制

御発酵と称される変異株を用いるアミノ酸発酵においても、グルタミン酸生産菌での研究は多くの成果を収め、各種アミノ酸の高生産性変異株が育成され、実生産に供されている。しかしながら、ますます増大しているアミノ酸の需要に応えるためには、たゆまずより優秀な生産菌を育種してゆく必要がある。

アミノ酸生産菌の生産性をさらに向上させるには、生合成経路上で律速となっているステップを補強するのが一法である。組換え DNA 技術は、遺伝子のクローニング、つまり目的の酵素の遺伝子をプラスミドなどのベクターに挿入して細胞に戻すことと同時に遺伝子の発現を増強することを可能にするので、恰好の手段となる。最近、この組換え DNA 技術の適用に不可欠なグルタミン酸生産菌の宿主ベクター系が開発され、すでに育種への応用が試みられている。本稿では、筆者らの研究を中心に、グルタミン酸生産菌の宿主ベクター系を紹介し、組換え DNA 技術によるアミノ酸生産菌の育種例についてもふれてみたい。なお、これまでのアミノ酸発酵に関しては、権威ある成書⁽¹⁾およびグルタミン酸生産菌の分類⁽²⁾、代謝調節機構と生産菌の育種をまとめた優れた総説^(3,4)を参考にしていただきたい。

グルタミン酸生産菌の宿主ベクター系の開発

宿主ベクター系を開発するためには、少なくともベクターを取得し形質転換 (DNA とり込み) 法を確立する必要がある。いち早く大腸菌 *Escherichia coli* で宿主ベクター系が開発されたのは、

* Ryoichi KATSUMATA, Tetsuo OKA, Akira FURUYA, 協和発酵(株)東京研究所

遺伝学的研究が古くからなされ、遺伝学的知見・素材が集積していたからに他ならない。しかし、グルタミン酸生産菌では、アミノ酸の生産と密接に関係する生合成経路や代謝調節の研究は精力的に行なわれてきたものの、遺伝学的研究はきわめて少ない。したがって、多くの困難が予想されたが、最近、数グループで相次いで宿主ベクター系が開発されている。いずれも類似の系であるので筆者らの *C. glutamicum* の系を中心に紹介する。

1) 溶原ファージとプラスミドの分離

E. coli 宿主ベクター系の開発経緯において、ラムダファージが DNA とり込み法やベクターとして寄与したように、ファージは系開発の有力な武器となる。そこでまず、2百数十株のグルタミン酸生産菌野生株を用いて、全株を試験菌と指示菌とする軟寒天重層法で溶原菌を探索した。すなわち、試験菌の周囲でその自然誘発ファージによる指示菌の溶菌を観察することにより、溶原菌と感受性菌を検出し4株の溶原ファージを分離した⁽⁵⁾。

宿主ベクター系の開発された微生物ではプラスミドベクターが一般的に使用されており、またそれらが比較的容易に作製されたことを考慮すると、ベクター素材としてプラスミドを取得しておくのが得策と思われる。当初、*E. coli* や枯草菌 *Bacillus subtilis* で多用されているプラスミドをそのまま適用しようとしたが、グルタミン酸生産菌内では複製できないことが示唆された。したがって、グルタミン酸生産菌中からプラスミドを分離する必要があると判断した。そこで、野生株に起源を求め、ベクター作製の好材料となる薬剤耐性遺伝子を担っているプラスミドおよび多コピー数で存在するプラスミドを探索した⁽⁵⁾。典型的な抗生物質に対する耐性菌を探索した結果、幸運にもストレプトマイシン (Sm)/スペクチノマイシン (Sp) 耐性菌 *C. glutamicum* T 250 を見だし、本菌から両剤耐性遺伝子を担う少コピー数で分子長 29 キロベース (kb) のプラスミド pCG 4 が分離された。また、別の *C. glutamicum* から多コピー数で小分子長の選択マーカーをもたない潜

在性プラスミド pCG 1 (3.0 kb) と pCG 2 (6.6 kb) が得られた。今までに知られるグルタミン酸生産菌の薬剤耐性プラスミドは pCG 4 が唯一のものであるが、潜在性多コピープラスミドは *Brevibacterium lactofermentum* などからも分離されている^(6~8)。

2) DNA とり込み法の確立

ファージ DNA 感染系は、プラークの形成で感度よく検出できるので、DNA とり込みを検討するのに便利である。前節で分離した溶原ファージ ϕ CG 1 とそれに感受性の *C. glutamicum* を用い、*E. coli* で使われている塩化カルシウム法などでの正常細胞に対するファージ DNA 感染を試みたが、有効な方法を見いだせなかった。そこで、酵母、*B. subtilis* など広範な菌種で使用されているプロトプラストへ DNA をとり込ませる方法について検討した。グルタミン酸生産菌はリゾチーム非感受性のため、単にリゾチーム処理してもプロトプラスト化されないが、生育を阻害しない濃度のペニシリン存在下で増殖させることにより細胞をリゾチーム感受性化でき、その細胞をリゾチーム処理してプロトプラストを調製する方法が金子らにより報告されている⁽⁹⁾。このプロトプラスト (Pc-プロトプラスト) を用いて感染条件を調べたところ、ポリエチレングリコールあるいは2価金属カチオンでファージ DNA 感染が誘起されることを確認した。そして、両者の至適濃度を選び、ファージ DNA 10 ng を用いて、細胞あたり 10^{-2} (10^7 PFU/ml, 10 ng まで DNA 濃度に比例して PFU 上昇) の頻度で感染が起こる効率的な DNA とり込み法を確立した⁽¹⁰⁾。

このとり込み法を pCG 4 に適用し、高張剤としてコハク酸-2-ナトリウム 0.5 M を含む選択再生培地上で形質転換株を選択する形質転換法を開発した⁽¹¹⁾。しかし、Pc-プロトプラストの再生能が弱いため(再生率 3~7%, 所要時間約 10 日)、形質転換頻度 (5×10^4 形質転換細胞数/ml) はファージ DNA 感染効率より 100 倍以上低く、形質転換株を取得するのに長時間を要した。他の代表的なグルタミン酸生産菌 *C. herculis*, *B. fla-*

vum, *M. ammoniaphilum* などの Pc-プロトプラストも pCG 4 で形質転換されたが、形質転換頻度は他の菌株から調製した pCG 4 DNA を用いると著しく低下することから、制限修飾系の存在することが示唆された。形質転換法としては、この Pc-プロトプラストを用いる方法が使用されている^(6,12)が、細胞壁合成阻害作用のある高濃度のグリシンで処理した細胞をリゾチーム処理して得られるプロトプラストでも、プラスミド形質転換が可能である⁽⁸⁾。いずれの場合も形質転換頻度は大して高くない。

Pc-プロトプラストの形質転換はプラスミドを移入する手段としては有用である。しかし、組換え DNA 実験に常用するには、形質転換効率が必ずしも十分とはいえず、しかも形質転換株の取得に時間がかかるので、作業効率が悪くなると言わざるを得ない。また予測される制限系は起源を異にする DNA との組換え体プラスミドの回収を困難にするにちがいない。組換え DNA 実験を効率的に行なうには、この 2 つの障害を克服する必要がある。

3) 形質転換の効率化

ペニシリンは細胞壁合成に関与する膜蛋白質に不可逆的に結合することが他の細菌で明らかにされている。一方、リゾチーム感受性で単にリゾチーム処理するだけで調製できる *B. subtilis* のプロトプラストは、グルタミン酸生産菌の Pc-プロトプラストより高い効率で速く再生することが知られている。これらの知見を踏まえると、Pc-プロトプラストの再生能が乏しいのは、ペニシリンの膜蛋白質への結合が細胞壁の再生を抑制すること起因していると推測することもできる。もしそうだとすると、ペニシリンを使う限り再生障害を回避するのは難しい。そこで、*B. subtilis* と同様にリゾチーム処理するだけでプロトプラスト化される変異株を誘導できないかと考えた。低張寒天平板上でのリゾチーム感受性を調べたところ、グルタミン酸生産菌は 400~800 $\mu\text{g/ml}$ で生育が阻止されるのに対し、*B. subtilis* は 25 $\mu\text{g/ml}$ で感受性を示した。細胞壁の溶解性とリゾチーム感受性が

図 1 ペニシリン処理した野生株 *C. glutamicum* T 106 (Δ , $\blacktriangle$) とリゾチーム感受性変異株 L 22 ($\circ$, $\bullet$) のプロトプラスト形成とプラスミド pCG 4 による形質転換

相関することに着目し、*B. subtilis* と同等のリゾチーム感受性を示す変異株が得られるならば、リゾチーム処理するだけでプロトプラスト化されるのではないかと予想した。

野生株 *C. glutamicum* T 106 からの誘導を試み、実際にリゾチーム感受性変異株を分離することに成功した⁽⁵⁾。これらの変異株はいずれも親株より 100 倍以上高いリゾチーム感受性を示した。短桿状の培養細胞は高張下でリゾチーム処理することによって容易に球状細胞に変換され、この球状細胞は低張液に移すと溶菌死することから、プロトプラストであることが確認された。ほとんどのリゾチーム感受性変異株のプロトプラストは、再生効率 (20~80%) と再生速度 (4~5 日) いずれにおいても Pc-プロトプラストよりも優れていた。また各変異株で効率は異なるが、ポリエチレングリコールを介してのプロトプラストへのフェージ DNA 感染が成立した。最優良株として選んだ L 22 株と親株のペニシリン処理細胞のリゾチームによるプロトプラストの形成速度と形質転換能を図 1 に示した。親株のペニシリン処理細胞に比べ、L 22 株の細胞は短時間で完全にプロトプラスト化され、しかも非常に高い効率 (10⁶ 形質転換細胞数/ml, 使用 DNA 濃度 10 ng) で pCG 4 の形質転換株が得られることがわかる。この形質転換効率は塩化カルシウム法による *E. coli* の

形質転換効率を凌ぐ効率である。このようにL22株を取得することによって、形質転換の不都合が解消された。またL22株は、リゾチームによる細胞壁の溶解が迅速・完全であるため、プラスミドの抽出を容易に行なえる利点も備えている。

4) 制限系の削除

あと一つの問題である制限系の存在は、ファージ粒子の感染効率を比較して簡便に調べることができる。すなわち、ある菌株の制限系は、感染効率がファージの増殖に使われた菌株に比べて低いことで検知される。制限障害を逃れる一法は制限のない野生株を選び出すことである。これを目的として前述の4種のファージを使って感受性株の制限系を調べたが、制限系のない菌株は見いだせず、むしろグルタミン酸生産菌全般に菌株特異的制限修飾系の存在することが明らかとなった。そこで、制限欠損変異株を取得することにした。

制限系をもつ菌株が、一定量の修飾ファージ(その菌株で増殖したファージ)を含む寒天平板上で感受性を示すとき、同一量の非修飾ファージ(別の菌株で増殖したファージ)では制限のため感受性を示さない。しかし、制限能を失った変異株は非修飾ファージにも感受性を示すはずである。その際、溶原化しないクラー型変異ファージを使えば感受性の判定がしやすいにちがいない。この選択法を用い、 ϕ CG1に対して 10^{-2} の制限を示す野生株T106から非修飾 ϕ CG1c(ϕ CG1のクラー型変異株)に対して感受性の高まった変異株を誘導した⁽¹³⁾。これらの変異株は、実際に ϕ CG1に対する制限能を失っていた。同様な方法で*B. lactofermentum*の制限欠損変異株が分離されている⁽¹⁴⁾。

5) 組換えDNA実験用宿主菌の育成

以上のように、野生株に存在した2つの障害はリゾチーム感受性変異株と制限欠損変異株を取得することにより解消された。当然、両障害を克服した菌株が組換えDNA実験に適した宿主菌となるので、この2種の有効変異を共有する菌株を育成する必要がある。この目的菌株を染色体組換

え株として取得するために、プロトプラスト融合法⁽⁹⁾を適用した。すなわち、前節で得た ϕ CG1制限欠損変異株の一株R32とL22株に異なる薬剤耐性マーカーをつけて両者のプロトプラスト融合を行ない、まず耐性マーカー間の組換え株を選択した後、その中からリゾチーム感受性・非修飾 ϕ CG1c感受性を示す菌株を分離した。しかしながら、これらの染色体組換え株には別の溶原ファージ ϕ CG4を制限する第二の制限系があることが判明した。そこで、その一株から非修飾 ϕ CG4c(ϕ CG4のクラー型変異株)に対する感受性上昇株を誘導し制限系がほぼ完全に欠失したRRL5株を取得した⁽¹³⁾。RRL5株は他の野生株から調製したプラスミドに対しても高い形質転換能(5×10^5 形質転換細胞数/ml)を有し、外来DNAをも対象にした組換え体プラスミドを取得するのにきわめて好適な宿主菌となった。以下に述べるベクターの作製と遺伝子のクローニングは、RRL5株を宿主菌とした組換えDNA実験で効率的に行なえるようになった。

6) セルフ系プラスミドベクターの作製

E. coli や *B. subtilis* で多用されているプラスミドベクターがそうであるように、実用的なベクターとしては数種の制限酵素に対する1箇所の切断部位を有し、その存在を検知できる選択マーカーをもつことが必要である。したがって、Sm/Sp耐性プラスミドpCG4は耐性遺伝子をもつ点で貴重であるが、分子量が大きく制限酵素の切断部位が複数あるため、そのままではベクターとして使用することはできない。pCG1とpCG2は多コピー性で分子量が小さく種々の制限酵素の切断部位1箇所をもっている点で有用であるが、選択マーカーがないのでベクターとなり得ない。そこで、これらのプラスミドを材料としてpCG4のSm/Sp耐性遺伝子を選択マーカーとするプラスミドベクターを作製した⁽⁵⁾。in vitroでの制限酵素による切断とDNAリガーゼによる再連結で組換え、このDNAでRRL5株を形質転換しSp耐性形質転換株を選択することにより、種々のプラスミドベクターを取得した。種々の制限酵

図 2 セルフ系ベクターとシャトルベクターの作製

素を用いた pCG 4 の分子内組換えで、pCG 4 を小型化した低コピー数のプラスミドベクターが得られた。pCG 4 の Sm/Sp 耐性遺伝子領域の制限酵素地図に基づき、pCG 1 あるいは pCG 2 と組換えて多コピー数のプラスミドベクターを作製した。一例として、図 2 に示した pCG 11 は、分子中に 1 箇所の切断部位をもつ制限酵素 *Bgl* II で pCG 1 を切断し、同じ付着端をもつ pCG 4 の *Bam* HI-DNA 断片と連結して得られたものである。これらの Sm/Sp 耐性マーカーを有するプラスミドベクターは、比較的分子長が小さく複数の制限酵素に対する各 1 箇所の切断部位をもち、ベクターとしての条件を満たしている。pCG 4 由来の Sm/Sp 耐性遺伝子は染色体上の交差耐性を示さない Sm あるいは Sp 自然誘発耐性変異と識別できるので、有効なベクターマーカーとなる。

7) 異属細菌の遺伝子を利用したプラスミドベクターの作製

前節のセルフ系ベクターは十分実用性のあるものであるが、多様な組換え DNA 実験を行なうには他の選択マーカーも有用である。選択マーカーとして *E. coli* や *B. subtilis* のベクターで使われている薬剤耐性遺伝子を導入することができれば、耐性機構や遺伝子構造が解明されているので有利なベクターが開発できるはずである。このことを検討するために、グルタミン酸生産菌のプラ

スミドと *E. coli* あるいは *B. subtilis* のプラスミドとのシャトルプラスミドを作製⁽¹⁵⁾し、これをグルタミン酸生産菌に導入して耐性遺伝子の発現を調べることとした。*E. coli* のプラスミドとしてテトラサイクリン (Tc)、クロラムフェニコール (Cm)、カナマイシン (Km)、アンピシリンの耐性遺伝子を持っている pGA 22 を選び、その 2 箇所ある *Bam* HI の 1 つの部位に *Bgl* II で切断した pCG 1

を連結してシャトルプラスミド pCE 53 を作製した(図 2)。別に、pGA 22 と pCG 11 のシャトルプラスミド pCE 60、Km 耐性遺伝子をもつ *B. subtilis* のプラスミド pUB110 と pCG 11 のシャトルプラスミド pCB 101 を作製した。シャトルプラスミドを *C. glutamicum* に導入した結果、pCE 53 は Km, Cm, Tc 耐性形質を、pCB 101 は Km 耐性形質を付与することが判明した。これらの形質転換株には、Km および Cm 耐性遺伝子のコードする薬剤不活化酵素の活性が検出され、耐性形質が導入遺伝子の発現に基づくことが確認された。pCG 4 由来の Sm/Sp 耐性遺伝子は *E. coli* で発現し耐性を付与したが、*B. subtilis* では発現しなかった。これらの知見に基づき、*E. coli* あるいは *B. subtilis* 由来の薬剤耐性遺伝子をマーカーとするベクターが作製されている^(15,6,8)。耐性遺伝子に加えて、グルタミン酸生産菌のファージゲノム DNA の付着末端を挿入することにより、ファージによる形質導入でも菌株間を移送できるコスミドベクターも作製されている⁽¹²⁾。

異属細菌の耐性遺伝子がグルタミン酸生産菌中で発現するという事実は、グルタミン酸生産菌の遺伝子発現機構を推察する上で注目に値する。とりわけ、*E. coli* プラスミドの耐性遺伝子がグルタミン酸生産菌で発現し、pCG 4 の Sm/Sp 耐性遺伝子が *E. coli* で発現することは、グラム陽性のグルタミン酸生産菌とグラム陰性の *E. coli* の転

写・翻訳装置が似ていることを示唆し興味深い。両細菌における遺伝子の相互発現性は、グルタミン酸生産菌の遺伝子を遺伝体系の完備した *E. coli* のシステムを使ってクローニングしたり、*E. coli* の遺伝子をグルタミン酸生産菌に導入して機能改善を図れる可能性を予測させ、応用面でも重要な知見である。

組換え DNA 技術によるアミノ酸生産菌の育種

以上述べてきたように、宿主ベクター系が開発されたことにより、グルタミン酸生産菌における組換え DNA 技術の適用が可能となった。冒頭にもふれたように、各種アミノ酸生産菌は代謝調節機構が遺伝的に解除された変異株を誘導することによって育種されてきたが、これらの生産菌を組換え DNA 技術を用いて改良する試みがすでになされている。ここでは、従来のリジン (Lys)・スレオニン (Thr) 生産菌の特性について簡単にふれ、組換え DNA 技術で改良した Thr 生産菌の育種例を紹介する。

図 3 は *C. glutamicum* における Lys・Thr 生合成経路と主要な代謝調節を示している。野生株では、Lys と Thr によるアスパルトキナーゼ (AK) の協奏フィードバック阻害と Thr によるホモセリンデヒドロゲナーゼ (HD) のフィードバック阻害がかかり、Lys と Thr は過剰生産されない。Lys 発酵が成立するためには AK の協奏阻害解除が必要で、それが可能な変異株としてホモセリン (または Thr+メチオニン) 要求性変異株と Lys アナログ・S-アミノエチルシステイン

(AEC) に対する耐性変異株が知られている。ホモセリン要求株では Thr 量を制限した培養条件下で AK の協奏阻害が解除されるために、また AEC 耐性株では AK が阻害を受けないように改質されているために、それ以降に制御点のない生合成経路を経て Lys が生産される。一方、Thr 発酵が成立するためには HD の阻害解除が一義的に必要で、阻害解除変異株として Thr アナログ・ α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸 (AHV) に対する耐性変異株が知られている。AHV耐性株では HD が Thr による阻害から脱感作されているために、アスパラギン酸セミアルデヒドの多くはホモセリン合成に費やされ、結果的に Lys プールが減少して AK の協奏阻害も回避されることになり、Thr が生成蓄積する。このように主要制御が解除された Lys 生産菌と Thr 生産菌の生産性を比べると、共通経路を経て合成されるにもかかわらず、Lys 生産菌が高生産性を示すのに対して Thr 生産菌ではそれほど高い生産能を有する菌株が得られていない。このことから、Thr 合成系を強化することによって Thr 生産性を改善できることが予測される。

筆者らは、*E. coli* 遺伝子がグルタミン酸生産菌中で発現するという前述の知見と *E. coli* K-12 株の Thr オペロンがアスパラギン酸から Thr に到る生合成経路上の 4 種の酵素 AK, HD, ホモセリンキナーゼ (HK) およびスレオニンシンターゼをコードすることに注目し、Thr オペロンによる Thr 合成系の補強効果を評価した⁽¹⁶⁾。まず野生型 Thr オペロンを *E. coli* の宿主ベクター系

図 3 *C. glutamicum* におけるリジン・スレオニンの生合成経路と代謝調節
AK: アスパルトキナーゼ, ASD: アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ,
HD: ホモセリンデヒドロゲナーゼ, HK: ホモセリンキナーゼ, TS: スレオニンシンターゼ, ←--: フィードバック阻害

でクローニングし、さらに pCG 11 と組換えてシャトルプラスミド pEthr 1 を作製した。pEthr 1 は *C. glutamicum* の HD, HK および TS 欠損変異株の栄養要求性を相補することから、Thr オペロンがグルタミン酸生産菌中で発現することが確認された。HD 欠損変異株中での HD 活性でみたとき、pEthr 1 は *C. glutamicum* 野生株と同等の活性を与える発現度を示した。さらに、pEthr 1 を保有する RRL 5 株から AHV 耐性変異株を誘導することにより、Thr オペロンの thr A シストロンにコードされる AK・HD が Thr によるフィードバック阻害から緩和された変異プラスミド pEthr 115 を分離した。これらのプラスミドを Thr 生産菌 *C. glutamicum* KY 10440 に導入し生産性を比較した結果、親株 KY 10440、プラスミド保有株 KY 10440 (pEthr 1), KY 10440 (pEthr 115) は、グルコース 10% を含む培地で各々 5.6, 9.8, 21.0 g/l の Thr を生産した。Thr オペロンの発現と制御解除による代謝系の強化が生産性の向上に寄与しているのがよくわかる。

石田らは、グルタミン酸生産菌の HD 遺伝子の増幅による Thr 生産性の向上を試みた⁽¹⁷⁾。Thr 生産菌 *B. lactofermentum* M-15 の染色体 DNA から Thr による阻害が緩和された HD 遺伝子をセルフクローニングし pAJ 210 を得た。pAJ 210 を M-15 株に導入すると HD 活性は 2 倍に上昇し、M-15 株、M-15 (pAJ 210) 株はグルコース 10% を含む培地で各 16, 25 g/l の Thr を生産した。さらに高木らは、同一菌の染色体 DNA から HK 遺伝子をクローニングし、pAJ 210 と共存可能なプラスミド pAJ 212 を取得した⁽¹⁸⁾。M-15 (pAJ 210, pAJ 212) 株の HD および HK 活性は M-15 株の各 4~14 倍、22~29 倍に増加していた。この菌株ではホモセリンと Lys の副生量が一段と減少し、Thr 生産性は 33 g/l に向上した。セルフ系遺伝子でも Thr 合成系の有効性が示された。

Lys 生産菌は変異による育種が最も進んでおり、原料糖の 40~50% にも相当する収率で Lys を生産する菌株が育成されている。これらの菌株では、主要制御が解除されているだけでなく初発

図 4 ホモセリンデヒドロゲナーゼ・ホモセリンキナーゼ遺伝子のクローニングと欠失解析

基質供給系も強化されていると考えられる。筆者らは、共通経路の最終代謝中間体アスパラギン酸セミアルデヒドまでの供給系が強い Lys 高生産菌にセルフ系 Thr 合成遺伝子を導入して Thr 生産菌に変換することを試みた⁽¹⁹⁾。そのために、野生株 *C. glutamicum* T 106 の染色体 DNA から Thr 合成へ分枝する第一酵素 HD の遺伝子を 3.6 kb の SalI-DNA 断片としてセルフクローニングし pChom 9 を得た (図 4)。この断片上には HD 遺伝子とともに HK 遺伝子も存在することが相補試験で判明した。欠失と DNA 塩基配列の解析結果から、両遺伝子はぎわめて近接しているが、オペロンを形成していないことが確認された。

次いで、pChom 9 保有株の AHV 耐性変異株を誘導することにより、HD の Thr による阻害が緩和された変異プラスミド pChom 93 を取得した。pChom 93 は野生株に対して 16 倍の HD 活性、17 倍の HK 活性を付与した。*C. glutamicum* の Lys 高生産菌 LH 4 から誘導したイソロイシン要求性変異株 TK 42 に pChom 93 を導入し、Thr 生産性を調べた。廃糖蜜を糖源として培養中途から連続的に糖を添加して総量 18% の糖を原

図5 ホモセリンデヒドロゲナーゼとホモセリンキナーゼの遺伝子増幅によるリジン生産菌のスレオニン生産菌への変換

(A) *C. glutamicum* LH4 株, (B) LH4 株から誘導したイソロイシン要求株 TK42 の pChom 93 保有株

料とする培養で, LH4 が Lys 67 g/l を蓄積するのに対し, TK 42 (pChom 93) は Thr 52 g/l を蓄積し, 期待通りの代謝変更が成立した (図 5)。

*

以上述べてきたように, グルタミン酸生産菌の宿主ベクター系が開発され, Thr 生産菌で例示したごとく, 従来ではできなかったアミノ酸生産菌の育種が可能となっている。今後, 代謝制御解除変異株の代謝特性を把握し, 組換え DNA 技術を用いてその弱点を補い, あるいは有利な機能を付与することにより, 一段と優秀な生産菌が育成されるものと予想される。一方で, 組換え DNA 技術とその関連技術によって, 産業上重要なこの細菌の分子遺伝学的特性が明らかにされてゆくことになるであろう。

文 献

- 1) アミノ酸核談集編: “アミノ酸発酵”, 上巻・下巻, 共立出版, 1972.
- 2) 中山 清: 発酵と工業, 40, 102 (1982).
- 3) 中山 清: 醸酵工学, 56, 425 (1978).
- 4) 椎尾 勇: 生化学, 50, 1 (1978).
- 5) 勝亦瞭一, 岡 徹夫, 古屋 晃: 昭和 58 年度日本農芸化学会大会要旨集, p. 333.
- 6) R. Santamaria, J. A. Gil, J. M. Mesas & J. F. Martin: *J. Gen. Microbiol.*, 130, 2237 (1984).
- 7) K. Miwa, H. Matsui, M. Terabe, S. Nakamori, K. Sano & H. Momose: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2901

(1984).

- 8) 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 (1985).
- 9) H. Kaneko & K. Sakaguchi: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1007 (1979).
- 10) A. Ozaki, R. Katsumata, T. Oka & A. Furuya: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2597 (1984).
- 11) R. Katsumata, A. Ozaki, T. Oka & A. Furuya: *J. Bacteriol.*, 159, 306 (1984).
- 12) K. Miwa, K. Matsui, M. Terabe, K. Ito, M. Ishida, H. Takagi, S. Nakamori & K. Sano: *Gene*, 39, 281 (1985).
- 13) 勝亦瞭一, 古屋 晃: 昭和 59 年度日本農芸化学会大会要旨集, p. 247.
- 14) 三輪清志, 百瀬春生, 中森 茂, 佐野孝之輔: 昭和 59 年度日本農芸化学会大会要旨集, p. 430.
- 15) A. Ozaki, R. Katsumata, T. Oka & A. Furuya: *Mol. Gen. Genet.*, 196, 175 (1984).
- 16) 勝亦瞭一, 原 雅子, 水上民夫, 岡 徹夫, 古屋 晃: 昭和 59 年度日本農芸化学会大会要旨集, p. 248.
- 17) 石田雅昭, 高木博史, 伊藤宏一, 三輪清志, 佐野孝之輔, 中森 茂: 昭和 58 年度日本醸酵学会大会要旨集, p. 284.
- 18) 高木博史, 森永 康, 佐藤孝明, 三輪清志, 石田雅昭, 中森 茂, 佐野孝之輔: 昭和 60 年度日本農芸化学会大会要旨集, p. 29.
- 19) 勝亦瞭一, 水上 透, 菊池泰弘, 木野邦郎, 堀田恵子: 昭和 61 年度日本農芸化学会大会要旨集, p. 323.

最 新 刊

アミノ酸発酵

相田 浩, 滝波弘一, 千畑一郎 A 5, 550 頁
中山 清, 山田秀明 編 定価 8,900 円

組換え DNA 技術による育種も含めて,
最近十数年間の研究成果を集大成

<主要目次>

- I. アミノ酸発酵研究の発展と展望
- II. アミノ酸生産菌株の育種技術
- III. アミノ酸発酵の生物化学工学
- IV. アミノ酸発酵・各論
- V. アミノ酸関連物質の生合成

学会出版センター