遺伝子工学を用いた CDP コリン生産法の開発とバイオプロセスへのゲノム工学応用の取組み

Development of CDP choline production process with genetic engineering and attempts to apply genomic engineering for bioprocesses

協和発酵工業(株)研究本部

*協和発酵工業(株)バイオケミカルカンパニー

藤尾 達郎 Tatsuro FUJIO

丸山 明彦 Akihiko MARUYAMA*

森 英郎 Hideo MORI

Key words: ATP regeneration; CDP choline; genomic engineering; genellally used host; mini-genomic factory (MGF)

はじめに

微生物を用いる物質生産は、生物が有する生体触媒(酵素)を用いる化学工業プロセスの一環をなすものであるが、タンパク質からなる触媒であることに起因するさまざまな特色、利点、欠点がある。

通常の化学反応では、合成に必要なエネルギーは加熱や加圧などにより外部から供給されるが、微生物ではその生育温度内かつ常圧で必要なエネルギーを供給するため、通常 ATP の分子中に蓄えられたエネルギーを生合成に利用する。そのため、糖質などのバイオマス資源から多段階の酵素反応過程を経てエネルギーを取り出し、いったん ATP に蓄える。

1. 静止菌体法による ATP 再生供給生産法

微生物を用いる物質生産には、大別して培養液中に目的物質を蓄積させる「直接発酵法」、生合成酵素を取り出して前駆物質から目的物質を生産する「酵素反応法」、さらにその中間的な「静止菌体法」¹⁾がある。静止菌体法は、直接発酵法では意識する必要のない ATP 供給が、酵素反応法ではネックになる点を解消するための方法である。菌体を薬剤で処理して、本来は膜非透過性である ATP などの低分子物質を透過し、高分子の酵素については活性を有する状態で閉じ込めた袋の状態にし、これを触媒として用いる²⁾。静止菌体法の利点は、多段階の酵素反応系が使えることから、触媒量の ATP さえあれば高価な ATP の代わりにグルコースを生合成のエネルギー供給源にできること、また、目的物質の生合成経路上に存在する任意の化合物がその物質生産の主原料として使えることである。

筆者らはこの静止菌体法を用いることによって、バイオプロセスによる物質生産の一つの問題点であった「ATP を消費する生合成酵素反応による工業的な物質生産プロセス」を可能とし、グルコースをエネルギー源とする、アデニンからの ATP 生産³⁾、キサンチル酸からのグアニル酸生産⁴⁾、イノシンからのイノシン酸生産⁵⁾、L-グルタミン酸、L-システイン、グリシンからの還元型グルタチオンの生産⁶⁾、およびオロット酸と塩化コリンからの CDP コリンの生産⁷⁾などの各プロセスを実用化した。

2. 遺伝子工学技術によるプロセス開発の革新

静止菌体法を用いることにより、経済的な ATP 供給の手段は確立した。一方、これと組み合わせる生合成酵素に関しても、医療・医薬の分野で確立された遺伝子工学技術を応用して活性を強化することが可能となり、バイオプロセスにとって新たな時代を迎えた。これは、単にある微生物が有している生合成活性を強化できるだけでなく、その微生物が本来もっていない生合成機能を付与することが可能になったことを意味する。これまでは、自然界から目的物質生産能を有することを指標に選択したところ、その生育や培養方法などに問題があるため生産不能に終わり、あるいはその解決に多くの労力を要することも多かった。今では、その生合成経路に関与する酵素遺伝子をクローニングできれば、例えば大腸菌などのように工業的に扱いやすい微生物に導入することが可能となった。バイオプロセス開発にとっての大きな転換点であったといえる。その一例として、CDP コリン生産プロセス開発につき述べる。

3. CDP コリン生産プロセス

CDP コリンは頭部外傷や脳手術に伴う意識障害などに対する改善剤として広く用いられている薬剤である。従来

図1 複合共役反応法による CDP コリンの生産

酵母由来のコリンリン酸シチジルトランスフェラーゼ遺伝子とコリンキナーゼ遺伝子および大腸菌の CTP 合成酵素遺伝子を強化した大腸菌と、*C. ammoniagenes* との共役反応による CDP コリン生産法。オロット酸からの UTP 生成に必要な ATP は自己共役反応により、またそれ以後の CDP コリン生成反応に必要な ATP は異菌体共役反応により、微量の ATP を再生使用することにより供給される。

は、CMP を主原料とする化学的合成法により製造されていた⁸⁾が、原料コストが高いという問題点があった。協和発酵では、静止菌体法を用いる独自の ATP 再生供給技術⁹⁾と、遺伝子組換え技術を組み合わせた新規な方法により、安価な原料を用いる工業的バイオプロセスの開発に取り組んだ⁷⁾。

オロット酸は、*Corynebacterium glutamicum* の変異株を用いる直接発酵法により、また、塩化コリンは合成法により極めて安価に生産されているので、これらを原料とする方法を検討した。

グルコースを原料とする ATP の再生・供給、およびオロット酸から UTP への変換には、*Corynebacterium ammoniagenes* を界面活性剤ならびに微量の有機溶剤で処理して得た静止菌体を酵素源として用いた。また、UTP から CTP への変換には、セルフクロニングで CTP 合成酵素を強化した大腸菌を酵素源として用いた。

一方、CDP コリンの生合成経路は、大腸菌など原核生物には存在せず、酵母など真核生物に存在する。幸い、*Saccharomyces cerevisiae* の CDP コリン生合成関連の 2 種の遺伝子がクローニングされ、大腸菌での発現にも成功していたので、これを入手し、塩化コリンのリン酸化によるコリンリン酸への変換¹⁰⁾と、コリンリン酸と CTP とから CDP コリンへの変換¹¹⁾の酵素源として用いた。

反応の全体像と、ATP の供給について図 1 に示す。このようなプロセスが可能となったことは、非自己の遺伝子の導入と発現が極めて容易であり、かつ大腸菌などの工業用微生物として扱いやすく、また遺伝学的知識が集積され

た微生物をさまざまな生合成酵素の供給源として用いる技術の有用性を物語るものであり、微生物による物質生産における遺伝子工学技術の革新性・可能性を示すものであると考える。

4. ゲノムの時代を迎えたバイオプロセス開発

21 世紀に入り、ヒトや稲をはじめとする多数の生物ゲノムの全塩基配列が決められ、このゲノム情報をいかに活用するかが問われる時代を迎えた。遺伝子工学の場合と同様に、ゲノムサイエンスの成果もまず医薬・医療の分野においてさまざまな技術開発および応用展開が始まり、すでに新聞紙上などを賑わしている。ゲノム情報がバイオプロセス開発と無縁でありえず、遺伝子工学技術が遅れてではあったがバイオプロセスの革新につながったと同様のことがもたらされるであろう。両者が異なるのは、今からであれば後追いではなく、われわれが独自の技術開発を進められることである。遺伝子工学の場合は、インターフェロンなどヒトの遺伝子を大腸菌で発現させることが医学分野において必要であったために、その技術開発が積極的に進められた。その結果、大腸菌をはじめとする多くの微生物について、遺伝子工学技術に必須のさまざまな基盤技術が整備された。一方、ゲノムの時代はまだ始まったばかりである。われわれは自らその活用を行うために必要な基盤技術を整備する機会に恵まれている¹²⁾。

5. ゲノム情報によるプロセス開発革新の試み

バイオプロセス分野において、ゲノムサイエンスによっ

図2 工業用宿主細胞 (Mini-Genome Factory) の概念

表1 天然微生物と工業用微生物の対比

自然界の微生物	工業微生物
○環境変化に対応	○環境変化に備える必要なし
○合目的代謝制御必須	○ターゲット物質の代謝制御は不要 (障害)
○最小限生命維持に必要な以外に多くの形質を備える	○生産には不要あるいは有害な形質除去が有効ないし必須
○分解能など多数の代謝能を有する	○外来遺伝子受容能が重要
	○旺盛な育成が重要

て初めて可能になったことの一つは、工業用に特化した微生物を育種する道が開かれたことであろう。

ゲノム時代以前においては、物質生産に用いる微生物は基本的に自然界から分離されたものをそのまま用いてきた。もちろん、目的生産物に応じて、それを分解する活性を除いたり、代謝制御をはずしたり、膜透過性を強化したりと、さまざまな改良を加えた菌を育種するが、あくまでも生産に必要な変異を付与するという枠内にとどまっている。

しかし、自然界の微生物は、気が遠くなるような年月を通じて、さまざまな環境変化や生存競争に耐え抜くために多数の遺伝子を獲得し、それらをそのゲノム内に保持している。その中には、化学物質の工業的生産という極めて限定された目的のためには不要なものや、むしろ有害なものも多く含まれている (表1)。一方、例えばエネルギー供給のように、物質生産には共通に必要なであって、単に生育に必要なレベル以上の能力をもつことが望まれる機能については必ずしも十分な能力を備えてはいない。このような問題点がありながら、これまでは抜本的に対処する方法がな

かった。

微生物の全塩基配列が明らかになったことによって、個々の遺伝子にとどまらず、多数の遺伝子 (いずれは全遺伝子) を対象として、その機能を明らかにし、工業生産という観点から取捨選択し、あるいは特定機能を担う一連の遺伝子を強化することが可能な時代を迎えた。自然界から分離した個別の微生物を品目ごとに用いるという受け身の時代から、共通の生産基盤となりうる、工業生産用に特化した微生物を創り出すという、バイオプロセスにとって一つの夢が叶う時代が到来した。この汎用的宿主としての工業用に特化した微生物を、Mini(mum) Genome Factory (MGF)¹³⁾と呼んでいる (図2)。

おわりに

協和発酵では、「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」プロジェクト¹²⁾に参加し、大腸菌を対象として、これまでにその創製に必要な大規模 DNA 削除技術の開発に成功し、現在 1 Mb 程度のゲノム DNA 大規模削除株の造成についてほぼ目的を達成しつつある。今後、このようにして得た菌株について、物質生産における有用性を実証する予定である。

- 1) 柘倉辰六郎: 発酵工学, **56**, 508-526 (1978).
- 2) T. Fujio and A. Furuya: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 261-267 (1983).
- 3) A. Maruyama and T. Fujio: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 644-650 (2001).
- 4) T. Fujio, T. Nishi, S. Ito and A. Maruyama: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 840-845 (1997).
- 5) H. Mori, A. Iida, T. Fujio, and S. Teshiba: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 693-698 (1997).
- 6) 藤尾達郎: *BIO INDUSTRY*, **3**, 453-461 (1986).

- 7) T. Fujio and A. Maruyama: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 956-959 (1997).
 - 8) E. P. Kennedy: *J. Biol. Chem.*, **231**, 185-191 (1956).
 - 9) 藤尾達郎, 丸山明彦, 青山良秀, 河原 伸, 西 達也: 生物工学会誌, **77**, 104-112 (1999).
 - 10) K. Hosaka, T. Kodaki, and S. Yamashita: *J. Biol. Chem.*, **264**, 2053-2059 (1989).
 - 11) Y. Tsukagoshi, J. Nikawa, K. Hosaka, and S. Yamashita: *J. Bacteriol.*, **173**, 2134-2136 (1991).
 - 12) 水上 透, 清水 昌: バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 735-738 (2003).
 - 13) 藤尾達郎: ファインケミカル, **30**(10), 5-12 (2001).
-