

(プロジェクト ID : 03A07002c)

(研究期間 : 平成 15 年 10 月～平成 18 年 9 月)

機能性ポリマー原料の微生物による発酵生産システムの開発

The development of fermentative production systems for monomers of super engineering plastics

研究代表者 東京大学大学院農学生命科学研究科 ○大西 康夫 (E-mail:ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

Abstract ; The purpose of this project is to develop a fermentative production system for 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA), the polymer composed of which is excellent in strength and heat-resistance, using the 3,4-AHBA biosynthesis genes in the grixazone biosynthesis gene cluster from *Streptomyces griseus*. Several experiments showed that 3,4-AHBA was synthesized from dihydroxyacetone-phosphate and aspartate semialdehyde by only two enzymes in *S. griseus*. A recombinant *S. griseus* strain, in which two genes encoding the 3,4-AHBA biosynthesis enzymes were overexpressed, was capable of producing 3,4-AHBA into the culture medium (4 g / L culture). On the other hand, the grixazone biosynthetic pathway was revealed entirely. Because another intermediate in the grixazone biosynthesis was found to be useful as a material for a valuable polymer as well as 3,4-AHBA, an efficient production system for this compound was developed using a recombinant *S. griseus* strain.

1. はじめに

1. 1 研究の背景

ポリベンゾアゾール類ポリマーは強度・耐熱性に優れ、有機繊維としては究極の性質を有する。3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸 (3,4-AHBA) から合成されるポリマー、ポリ-2,5-ベンゾオキサゾール (図 1) もその 1 つであるが、純度の高い 3,4-AHBA を安価に製造する方法は未開発であり、本ポリマーの実用化は遅れている。また、従来このような高分子原料の生産は石油化学工業に依存しており、環境低負荷型プロセスの導入や原料の石油依存からの脱却などといった「グリーンケミストリー」が、近年、特に求められるようになってきている。

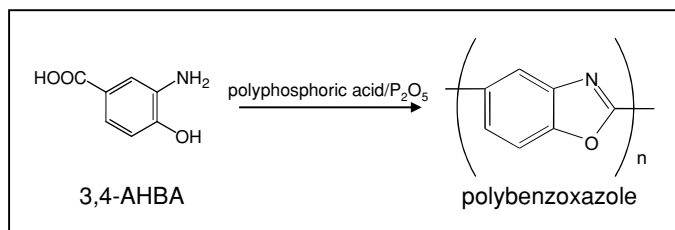


図 1 3,4-AHBAからベンゾオキサゾールの合成

研究代表者は放線菌のある二次代謝産物の生合成中間体が 3,4-AHBA であることを見出すとともに、3,4-AHBA 合成酵素遺伝子の取得に世界で初めて成功した。この発見により、「機能性ポリマー原料として有用な化合物である 3,4-AHBA の発酵生産」という明確な目標を持つに至った。

1. 2 研究の目的および特色

本研究は純度の高い 3,4-AHBA を微生物により大量かつ安価に発酵生産するシステムを開発することを目的とする。生物界においてベンゼン環を生合成する経路はシキミ酸経路がよく知られてい

るが、3,4-AHBA 合成酵素が関与する経路はこれとは全く異なった経路であると考えられ、その反応自体、極めて新規性が高いものである。3,4-AHBA を有機化学合成で製造する方法はすでに開発・特許出願されているが、ニトロ化を伴う危険な反応であるうえ、異性体生成の問題があるため、重合反応に要求される純度の高い 3,4-AHBA を得るには相当のコストがかかってしまう。これに対して、発酵法では異性体の混入が全くない 3,4-AHBA を夾雑物の少ない培養上清に生産させることが可能であるため、純度の高い 3,4-AHBA を低コストで得ることが可能となる。また、危険を伴わない穏和な条件下、ワンポットで生産できるという利点もある。このように石油を原料としないことに加えて環境低負荷型プロセスからなる本手法は、革新的な 3,4-AHBA 製造法であるといえる。

2. 研究開発の内容

2. 1 本プロジェクト開始時の研究進捗状況と研究方針

研究代表者は長年、放線菌 *Streptomyces griseus* の二次代謝・形態分化の制御機構の解明に取り組んできた¹⁾。*S. griseus* は自身が生産する微生物ホルモン A-ファクターおよびリン酸欠乏に応答して黄色色素を生産する。このため、この黄色色素生合成遺伝子群の制御機構に興味をもち、生合成遺伝子クラスターのクローニングおよび黄色色素の構造決定に着手した。その結果、この黄色色素がフェノキサジノン骨格を有する化合物であることを明らかにし、グリキサゾン (grixazone, GX) と命名した²⁾。一方、GX 生合成遺伝子クラスターをクローニングし、転写解析を行った (図 2)。

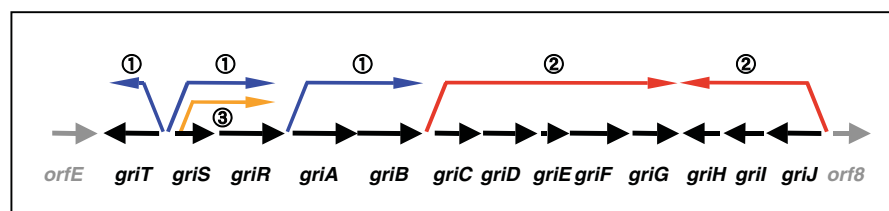


図 2 GX 生合成遺伝子クラスターとその転写様式

①②③の矢印は転写単位を表す。
①の転写は、②や③に比べて遅れて起こる。②の転写は③とほぼ同時期に起こるが培養後期に弱くなる。

このような研究の過程で GX 生合成遺伝子クラスター中の 2 つの遺伝子 *griH*、*griI* を過剰発現させた *S. griseus* において、3,4-AHBA およびそのアミノ基がアセチル化された化合物 (3,4-AcAHBA) が大量に培地中に生産されていることを発見した。生産量は両者を合わせて培養 1 リットルあたり約 1 グラム程度であった。3,4-AHBA は宿主のもつアセチル化酵素により、3,4-AcAHBA に変換されると考えられた。3,4-AHBA の生産は *griH*、*griI* を発現させた *Streptomyces lividans* でも観察されたことから、*griH*、*griI* は 3,4-AHBA 合成酵素をコードしていると考えられた。一方、GX 生合成遺伝子クラスター中の他の遺伝子の解析より、3,4-AHBA が GX の生合成中間体であることを示唆する結果が得られた。研究代表者は 3,4-AHBA が機能性ポリマーであるポリベンゾオキサゾールの原料となることを知り、ポリベンゾオキサゾール系ポリマーに強い株式会社東洋紡総合研究所と連携をとりつつ、3,4-AHBA の発酵生産システムの開発を目指した。

3,4-AHBA 発酵生産システム開発のキーポイントとして、次の 3 つを考えた。(1) 3,4-AHBA 合成酵素遺伝子発現プラスミドの改良。(2) 宿主となる菌株の改良。(3) 培地・培養条件の改良。そして、これらを遂行するためには次の基礎的研究が重要であると考えた。(1) 3,4-AHBA 合成酵素の基質の

同定および触媒反応の解明を含めた 3,4-AHBA 合成経路の解明。(2) GX 生合成に関する遺伝子産物の機能解明。本稿においては、まず、この基礎研究の結果をまとめ、それに続いて、3,4-AHBA 生産量の増大を目指して行った研究結果を述べる。

2. 2 3,4-AHBA 合成酵素の基質の同定および触媒反応の解明を含めた 3,4-AHBA 合成経路の解明

GriH、GriI の両方が 3,4-AHBA 合成に必須であることは、どちらか一方の遺伝子だけでは 3,4-AHBA が合成できないことから明らかであった。GriI は C-C 結合を触媒するアルドラーゼと相同性を有する。一方、GriH はアーキアおよび一部のバクテリアに保存された機能不明の蛋白と相同性を有する。まず、*griH*、*griI* を過剰発現させた *S. griseus* を用いて、安定同位体でラベルした種々の化合物 (^{13}C -グルコース、 ^{13}C -グリセロール、 ^{13}C -アスパラギン酸、 ^{13}C -ピルビン酸、 ^{13}C 、 ^{15}N -アスパラギン酸) の 3,4-AcAHBA への取り込み実験を行った。その結果、3,4-AHBA は解糖系由来の C3 ユニットと TCA サイクル由来の C4 ユニットから合成されることが明らかになった。3,4-AHBA 合成がたった 2 つの酵素によって行われることを考え合わせ、最も可能性の高い C3 ユニットはジヒドロキシアセトンリン酸、C4 ユニットはアスパラギン酸セミアルデヒドであると予想した。次に、GriH、GriI を用いた試験管内反応による 3,4-AHBA の合成を試みた。いくつかの困難を乗り越え最終的には、*S. lividans* を用いて His タグ付加蛋白として生産させ精製した GriH、GriI を用いることによって、ジヒドロキシアセトンリン酸とアスパラギン酸セミアルデヒドから 3,4-AHBA を合成することに成功した。この *in vitro* 系を用いて詳細な解析を行い、図 3 に示した反応経路により 3,4-AHBA が合成されていることを明らかにした。GriH による反応においては Mn^{2+} が必須であったが、 NAD^+ や NADP^+ などの補酵素は不要であった。

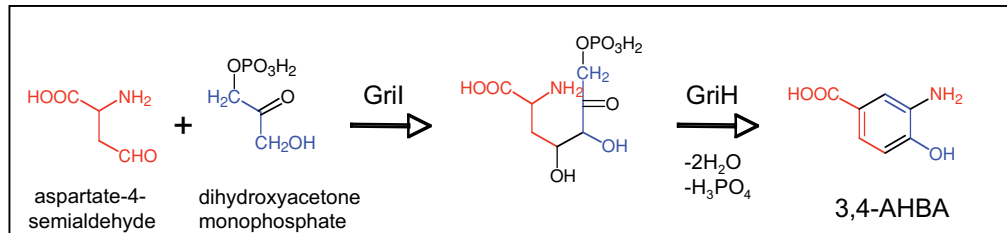


図 3 GriH、GriI による 3,4-AHBA 生合成経路

2. 3 GX 生合成に関する遺伝子産物の機能解明

GX 生合成遺伝子クラスター中の *griH*、*griI* 以外のすべての遺伝子の破壊株を作製し、各破壊株における GX 生産や GX 生合成中間体の蓄積を解析するとともに、異種発現や試験管内反応により、各生合成ステップを担う酵素機能の解明を行った。その結果、図 4 に示したような GX 生合成経路を明らかにした。

GriI、GriH によって生合成された 3,4-AHBA は、GriC、GriD によって、カルボン酸が還元され、3-アミノ-4-ヒドロキシベンズアルデヒド (3,4-AHBAL) となる。2 分子の 3,4-AHBAL は、GriF によってキノニンイミンに酸化される³⁾。生じたキノニンイミン 2 分子が重合しフェノキサジノン骨格が生成するが、この過程において非酵素的に N-アセチルシステインの付加が起こり GX-A が生じる³⁾。GX-A から GX-B への変換は、本遺伝子クラスターの産物とは無関係に起こることを示す結果が得られた。GriF はチロシナーゼと相同性を有する銅蛋白であるが、GriE は GriF に銅を供給する銅シャペロンとして機能する³⁾。GriJ はアスパラギン酸キナーゼと相同性を有しているが、GriI の基質となるアスパラギン酸セミアルデヒド

の供給に関与することを示す結果が得られた。GriGは芳香族化合物の輸送に関する膜蛋白と相同性を有するが、3,4-AHBAの取り込みに関与することを示す結果が得られた。GriAは酸化酵素と相同性があるが、GX生産との関係ははっきりしない。GriBは薬剤排出に関与する膜蛋白と相同性があり、GXの菌体外への分泌に関与することが示された。一方、GriR, GriS, GriTはGX生成遺伝子クラスターの制御因子であることが示唆された。なかでもGriRはA-ファクターおよびリン酸欠乏シグナルをGX生成遺伝子群に伝える重要な因子であり、*griC*および*griJ*プロモーターへの結合も示された。

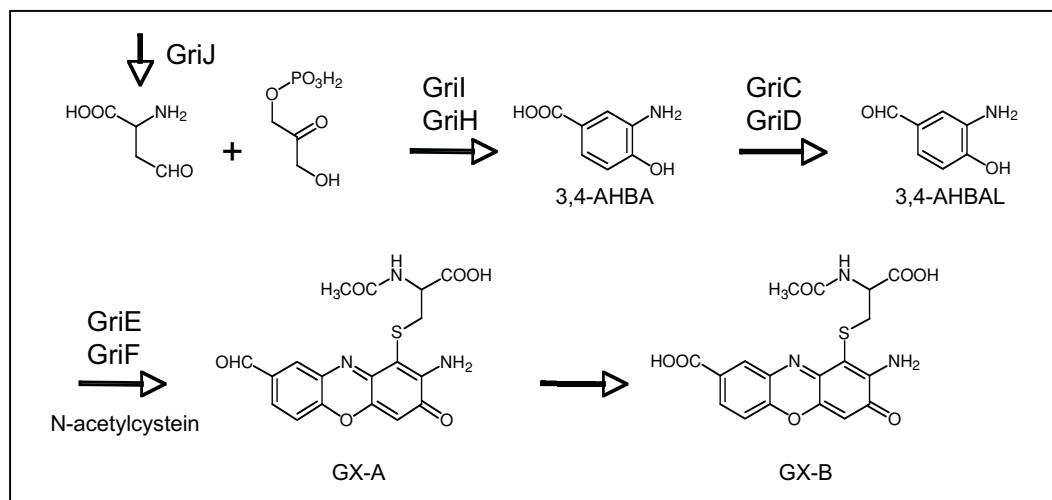


図4 GX 生合成経路

2. 4 3,4-AHBA 生産量の増大を目指して行った研究結果

(1) 3,4-AHBA 合成酵素遺伝子発現プラスミドおよび宿主の改良

高コピー数ベクターである pIJ702 を用いて、ベクター上の *melC* プロモーターの下流に *griIH* を含む DNA 断片をクローニングしたものが当初の 3,4-AHBA 合成酵素遺伝子発現プラスミドであった。GriI が 3,4-AHBA 合成の基質であるアスパラギン酸セミアルデヒドの生成に関与していると考えられたことから、まず *griJ* を *griIH* の上流に配置し、*melC* プロモーターから *griIHI* を発現させるプラスミドを構築したが、本発現プラスミドをもつ株においては 3,4-AHBA の生産量の増大は認められなかった。また、*melC* プロモーターは培養の中期から後期に誘導されるため、より強力で培養初期から機能する *hrdB* プロモーターを用いることで、*griIH* の発現量を増やすことを試みた。*hrdB* プロモーターの下流に *griIH* を連結し、高コピー数ベクター pIJ486 に組み込んだ発現プラスミドを導入した放線菌では、従来の発現プラスミドをもつ株と比較して、より早い時期（培養 1 日目）から 3,4-AHBA の生産が始まったが、最終的な生産量では従来の発現プラスミドをもつ株の 3 分の 1 から同程度にとどまった。

宿主放線菌としては、当初から GX 生合成が全く行われたい変異株 (M31 株) を用いてきた。3,4-AHBA は GX の生合成中間体であるため、GX 生合成経路が活性化された状態では 3,4-AHBA の生産量が減少すると考えられたからである。M31 株の代わりに、GX 生合成遺伝子クラスターの転写が全く起こらなくなる *griR* 破壊株を宿主に用いても 3,4-AHBA の生産量は同程度であった。一方、3,4-AHBA は解糖系や TCA サイクル由来の一次代謝産物から合成されることが明らかになったため、二次代謝・形態分化へのスイッチが入らず栄養増殖が長く続く変異株である *adpA* 破壊株が 3,4-AHBA 生産の宿主として有

望であると考えた。*adpA* 破壊株では *melC* プロモーターの誘導が起こらないことから、*hrdB* プロモーターを利用した発現プラスミドを用いて検討したが、*adpA* 破壊株においても 3,4-AHBA の顕著な増産は観察されなかった。

(2) 培地・培養条件の改良

当初から 3,4-AHBA の発酵生産は基本的にアスパラギン入りの最少培地（グルコース 0.9%、アスパラギン 0.9%、硫酸 0.2%が主成分。以降、標準培地と呼ぶ）で行ってきた。最少培地での発酵生産は培養上清から 3,4-AHBA を精製する際に大きなメリットがある。すでに培養条件を変えることによって 3,4-AHBA と 3,4-AcAHBA の生成比が異なることが観察されていた。当初は 3,4-AcAHBA の生成を抑え、なるべく 3,4-AHBA を多く生産させることを計画していたが、両者の安定性や精製の容易さを考えて、3,4-AcAHBA を大量に生産することが望ましいという結論に至った。3,4-AHBA は培地中で比較的容易に非酵素的な重合を起こしてしまうため収量の低下が見られた。3,4-AcAHBA は酸処理によって容易に 3,4-AHBA に変換可能であった。種々の検討を行った結果、3,4-AHBA の生産は酸素供給量や加えるグルコースやアスパラギンの量比に大きく影響されることなどが明らかになった。また、アスパラギン（14,000 円/kg）の代わりにグルタミン酸（200-270 円/kg）を用いても生産量はほとんど変わらず、さらに安価なフマル酸（150-160 円/kg）を用いても（この場合、窒素源として硫酸を増量）生産量はほぼ同じであった。ただし、それぞれの場合において、3,4-AHBA と 3,4-AcAHBA の生成比は異なり、3,4-AcAHBA の割合はフマル酸（80-90%）がアスパラギン（70-80%）やグルタミン酸（40-60%）より高かった。最終的に標準培地を用いたフラスコ培養では、3,4-AHBA と 3,4-AcAHBA を合わせて培養 1 リットルあたり 4 グラムにまで生産量を上げることに成功した。培養条件の検討においては最少培地を使用しているため、培地成分に加えた炭素量により理論上の 3,4-AHBA の生産限界量が計算できる。標準培地での 3,4-AHBA の生産限界量は 11.7 g/L である。この値は培地中の炭素をすべて使って 3,4-AHBA を合成した場合の値であり、培地中の炭素が菌体の増殖（菌体成分の合成）に使われることを考えると、今回得られた 4 g/L という値は極めて高い値であり、この条件での限界に近い値であると思われる。これ以上生産量を上げるためには炭素源（および窒素源）を加えながら培養するといった方法の導入が不可欠である。そこで、培養時のグルコースの消費を培地中のグルコースを定量することによって追跡した。その結果、通常の培養条件では培地中のグルコースは 3 日で完全に消費されることがわかった。一方、3,4-AHBA の生産は 2 日目の終わり頃から始まり（*melC* プロモーター使用時）、4 日目でほぼ頭打ちになることがわかった。そこで、グルコースが消費された時点でグルコースを新たに添加したところ、3,4-AHBA の生産は 4 日目で頭打ちになることなく、5 日目まで増加し続けることがわかり、この方法の有効性が示された。

2. 5 機能性ポリマー原料となる 3,4-AHBA 以外の化合物の生産システムの開発

3,4-AHBA とは異なる GX 生合成中間体が 3,4-AHBA と同様に機能性ポリマーの合成原料として有望であったため、本化合物を組換え放線菌を用いて生産するシステムを開発した。（特許申請準備中のため、詳細は記述しない。）

3. 考察

3. 1 3,4-AHBA 合成経路の解明

GriI、GriH による 3,4-AHBA 合成経路の解明は、シキミ酸経路に依存しない新規なベンゼン環合成経路の発見という点で非常に大きなインパクトをもつ。アーキアに存在する GriH ホモログについては、*Methanocaldococcus jannaschii* の MJ1249 が NAD 依存性の 3-デヒドロキナ酸合成酵素であることが 2004 年に報告された。GriH はこれと非常によく似た化合物を基質とするものの、これとは全く異なった反応を触媒する。両者の触媒反応の詳細な解析は酵素の分子進化を考える上でも大変興味深い。

3. 2 3,4-AHBA 生産量の増大のための培養方法

2.4 で述べたように、さらに 3,4-AHBA の生産量を増大させるためには、培養方法を根本的に変える必要がある。これまで得られた結果を統合すると、常にフレッシュな培地を供給しつつ菌体を含む培養液を連続的に除いていく連続培養が最も 3,4-AHBA の生産にふさわしいのではないかと考えられる。この際の宿主は二次代謝・形態分化が起こらない *adpA* 破壊株が好都合であり、*hrdB* プロモーターを利用した発現プラスミドが有効であると考えられる。

4. まとめ

新規な 3,4-AHBA 合成経路を解明することができたが、現在の 3,4-AHBA の生産量 (4 g/L) は目標値 (当初 10 g/L であったが、途中で状況が変わり 40 g/L に変更した) にはまだまだ及ばない。しかしながら、種々の培養条件の検討結果に加え、GriI、GriH の基質や触媒反応を明らかにできたことから、生産量増大のための方向性を明確にすることができた。一方、詳細は記述できなかったが、3,4-AHBA とは異なる GX 生合成中間体の生産システムを開発した。

5. 今後の展望

連続培養によって 3,4-AHBA をコンスタントに発酵生産するシステムの開発が今後の大きな課題である。一方、新たに見出した有用化合物の新規生産システムの工業レベルでの有効性を検証することも今後の課題である。

文献

- 1) 大西康夫 (2003) 放線菌の二次代謝・形態分化に関する分子遺伝学的研究 日本農芸化学会誌 **77**: 852-859
- 2) Ohnishi Y., et al. (2004) Structures of grinoxone A and B, A-factor-dependent yellow pigments produced under phosphate depletion by *Streptomyces griseus*. *Journal of Antibiotics* **57**, 218-223
- 3) Suzuki H., et al. (2006) A novel ortho-aminophenol oxidase responsible for formation of phenoxazinone chromophore of grinoxone. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 823-833

キーワード ; 発酵、機能性高分子、ポリベンゾオキサゾール、遺伝子操作

特許 ; 特開 2004-283163 「アミノヒドロキシ芳香族カルボン酸の生産に関する遺伝子およびアミノヒドロキシ安息香酸類の製造方法」