

光合成細菌変異株を用いたレブリン酸濃度, pHの最適化, および酸化還元電位の制御による 5-アミノレブリン酸の大量生産

田中 享^{1*}・西川 誠司²・渡辺圭太郎^{1,2}・田中 徹³・佐々木 健⁴

¹コスモ石油(株)中央研究所事業開拓G, ²コスモ石油(株)海外事業部 ALA 事業センター
³SBI アラプロモ(株), ⁴広島国際学院大学大学院工学研究科物質工学

(2010年5月14日受付 2010年8月4日受理)

Industrial production of 5-aminolevulinic acid by a mutant photosynthetic bacteria (*Rhodobacter sphaeroides* strain CR-720) cultured under optimal conditions

Toru Tanaka^{1*}, Seiji Nishikawa², Keitaro Watanabe^{1,2}, Tohru Tanaka³, and Ken Sasaki⁴
(¹New Technology Development Group, Research and Development Center, Cosmo Oil Co. Ltd., 1134-2
Gongendo, Saitte, Saitama 340-0193; ²Cosmo Oil Co. Ltd., Toshiba Bldg., 1-1 Shibaura, Minato-ku, Tokyo
105-8528; ³SBI ALApromo Co. Ltd., Izumi Garden Tower 18F, 1-6-1 Roppongi, Minato-ku, Tokyo 106-
6018; ⁴Graduate School of Engineering, Hiroshima Kokusai Gakuin University, 6-20-1 Nakano, Aki-ku,
Hiroshima 739-0321) *Seibutsu-kogaku* **88**: 455-462, 2010.

Mutations were induced by repetitive exposure of *Rhodobacter sphaeroides* to *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine; the resultant high-productivity strain CR-720 can produce 5-aminolevulinic acid (ALA) even in the absence of light. This strain showed 40% ALA production compared with CR-606, when cultured in medium containing 50 mM glucose, 60 mM glycine, 5 mM levulinic acid (LA), and 10 g l⁻¹ yeast extract. When CR-720 was cultured in medium whose pH was optimized to 6.25 ± 0.05 and to which 1 mM LA was added, 43 mM ALA was obtained. In addition, medium optimization to increase cell mass production was carried out. The ALA synthetase activity of CR-720 grown on the improved medium was about 3 times greater than that of CR-606. Furthermore, CR-720 produced 52 mM ALA with a high productivity rate of 1.6 mM h⁻¹ under conditions of optimized pH, LA, and cell mass production, when the redox potential (ORP) of the medium was controlled between -150 and -100 mV during aerobic culture (DO = 0) in a 3-l jar fermentor. Thus, industrial production of ALA was possible under these culture conditions.

[**Key words**: 5-aminolevulinic acid, *Rhodobacter sphaeroides*, mutant, ORP, pH]

5-アミノレブリン酸 (ALA) は、ポルフィリン、ヘム、ビタミン B₁₂ など、ポルフィリン誘導体生合成における最初の間体として知られ、植物、動物、ヒトに広く分布している。チトクロムやヘモグロビンもすべてALAを経て合成され、すべて生理的にも重要な物質である。ALA生合成は、グリシンとスクシニル-CoAからALA合成酵素 (ALAS) を経て生成される、いわゆる Shemin 経路 (C-4経路) と、グルタミン酸から生成されるC-5経路で主に行われる¹⁾。ALA脱水酵素 (ALAD) により、2分子

のALAが脱水縮合され、ピロール化合物であるポルフォビリノーゲン (PBG) を生成する。1950年代に精力的に行われたポルフィリン誘導体生合成研究を通じて、細菌、動物、植物においてその最終産物であるポルフィリン誘導体の存在量に比べて、遊離のALAやPBGの存在量がきわめて少量であることが指摘され²⁾、多くの場合ALA合成がポルフィリン誘導体生合成における律速段階であることが知られている。

1984年、RebeizらによってALAは低毒性除草剤とし

*連絡先 E-mail: tor_tanaka@cosmo-oil.co.jp

て応用できることが報告された³⁾。現在は除草剤としてよりはむしろ耐塩性や植物生長促進の効果が報告され、農業分野での用途開発が進んでいる^{1,4-10)}。さらに、がん治療薬、腫瘍診断薬としての医用分野での用途が最近注目されている¹⁰⁾。

ALAの生産については化学合成法が報告されている¹⁰⁾。しかし、収率は低く現在でも一部でしか実用化されていない。1970～1985年までの微生物によるALA生産研究では、光合成細菌、嫌気性菌、藻類などでほとんどがALADの競争阻害剤であるレブリン酸(LA)を培地に添加することでALA菌体外生産が認められているが、いずれもALA生産量は低い¹⁰⁾。最近では、*Rhodobacter sphaeroides*, *Bradyrhizobium japonicum* および *Agrobacterium radiobactor* のALA生合成遺伝子(*hemA*)を導入した*Escherichia coli*の遺伝子変異株による発酵槽を用いたALA生産に関する研究が行われており¹¹⁻¹⁵⁾、最大で39.3 mMの生産が報告されている¹¹⁾。

一方、光合成細菌は光合成増殖ばかりでなく、好気暗条件下でも呼吸により増殖できる。ALAの実用的大量生産には好気暗条件がコスト的に優れているので、著者らは好気暗条件下でもALA生産が可能な菌の開発を進めた。すでに報告した通り、第5次変異株(CR-520)および第6次変異株(CR-606)のALA生産量を増大させるためには通気および攪拌速度の調節が特に効果的であった。通常に通気条件下でのCR-606株のALA生産量は、前駆体であるグリシン、ALADの競争阻害剤であるLAおよび酵母エキスを添加後18時間で20 mMだった¹⁶⁾。

さらなる高生産を考えて変異源処理を行い、試験管による培養で27.5 mM生産することができるCR-720株を得た¹⁷⁾。光合成細菌によるLA添加濃度の検討は、IFO12203株、CR-17株およびCR-286株に関して報告されている^{18,19)}。好気条件下での培養によりCR-520株のALADの活性は、その親株であるCR-450株のおよそ1/2に低下しており、CR-606株はその親株とほぼ同程度の活性であった。試験管での培養条件下ではCR-520株、CR-606株およびCR-720株の最大ALA蓄積量に対する至適LA濃度は5 mMと報告されている¹⁷⁾。

一方、遺伝子組換え*E. coli*を用いたALA生産研究により、pHを6.5に調節することでALA生産が上がるということが報告されている¹¹⁾。*R. sphaeroides*のALA合成酵素活性に対する至適pH範囲は7.8～8.0との報告がある²⁰⁾。酸化還元電位とALA生産の関係についてはCR-520株で報告されている¹⁰⁾。しかしながら、発酵槽を用いたALA生産に対するLA濃度、pHおよび酸化還元電位の至適値を検討した報告はこれまでにない。本報ではCR-720株を用いた発酵槽でのALA生産について、LA添加、pH、およ

び酸化還元電位の至適条件の検討を行い、さらなる高生産を目指した。

実験方法

供試菌株と培地 *R. sphaeroides* CR-520, CR-606, CR-649およびCR-720株は、著者らの実験室保有のものを使用した¹⁷⁾。培地はグルタミン酸-グルコース培地(GGY2)¹⁶⁾および改変培地(2×GGY2およびTT2)を使用した。121°C, 20分、高圧蒸気滅菌した後、最終濃度が50 mMとなるよう別に滅菌した2 Mグルコースを加えた。2×GGY2培地の組成は、グルコースの最終濃度を200 mMとした以外は、すべてGGY2培地成分の2倍量とした。培地はオートクレーブする前に5 N-NaOHを用いてpH 6.8に調整した。TT2培地の組成は、酵母エキスを工業用酵母エキス(オリエンタル酵母工業社, 東京), 3 g; NaH₂PO₄・2H₂O 1.2 g; Na₂HPO₄・12H₂O 4.37 g; 無水FeCl₃, 3.24 mgとした以外は、2×GGY2培地と同様の組成とした。

菌株は、攪拌条件下32°Cで培養を行った(21 mmφ試験管では振幅幅5 cmで250 rpm, 仕込量10 ml, 32°Cで培養, 500 ml容坂口フラスコでは、振幅幅50 mmで100 rpm, 仕込量100 ml, 32°Cで培養, 300 ml容パッフル付三角フラスコでは、回転半径35 mmで120 rpm, 仕込量30 ml, 32°Cで培養)。

発酵槽によるALA生産 種培養は、10 mlのGGY2培地または2×GGY2培地を含む21 mmφ試験管を用いて48時間行った。次いで、200 mlのGGY2培地または2×GGY2培地を含む坂口フラスコに対し試験管による培養液を2% (v/v) 植菌し、48時間、前培養を行った。GGY2培地を用いて本培養を行う場合、1 lの培地を含む、2 l発酵槽CTB-33 (TAITEC社, 東京)に前培養液を10% (v/v) 植菌した。培養は通気速度0.2 vvm, 攪拌速度300 rpm, 32°Cで行った。24時間培養後、グリシン、LA、グルコースおよび酵母エキスを培養液に加えた。pHは1N-NaOHおよび1N-硫酸を用いて、6.3～6.9の間に調整した。2×GGY2またはTT2培地を用いて本培養を行う場合、1.8 lの培地を含む溶存酸素電極(TOA-DKK社, 東京)、酸化還元電位電極およびpH電極(メトラー・トレド社, Swiss)を装着した3 l発酵槽(MDL-300, 丸菱バイオエンジニアリング社, 東京)に前培養液を10% (v/v) 植菌した。培養は通気速度0.2 vvm, 攪拌速度180から400 rpm, 32°Cで行った。

ALA合成酵素活性 培養は、溶存酸素電極(TOA-DKK社, 東京)を装着した、1.8 lの2×GGY2培地を含む3 l発酵槽を用いた。菌体は5000×g, 20分の遠心分離により集菌し、リン酸カリウム緩衝液(50 mM, pH 7.5)

を用いて2回洗浄した。菌体は、同様の緩衝液を用いて菌体を $3\sim 5 \times 10^9$ 個 ml^{-1} に再懸濁した後、電動式フレンチプレス（大岳製作所社，東京）を用い、150 MPa、4°C条件下で菌体を破碎した。破碎した菌体の懸濁液は、 $15,000 \times g$ 、20分、2回遠心分離を行った。その上清液を粗酵素液とした。粗酵素液のタンパク濃度はプロテインアッセイキット（バイオラッド社，USA）を用いて分析した。ALA合成酵素の測定は、Yubisuiらの方法に従って実施した²¹⁾。

分析方法 培養液中のALA濃度は、蛍光分析法により分析を行った²²⁾。分析条件詳細は前報の通りとした¹⁶⁾。菌体濃度は、分光光度計UV1600（島津製作所社，京都）を用いて660 nmの濁度によって分析した。培養液中のグリシン濃度は、LC-10Aシステムおよび蛍光検出器RF-10A（島津製作所社，京都）により、オルトフタルアルデヒドを用いたポストカラム-HPLC分析法によって分析した²³⁾。グルコース濃度は酵素電極分析計（AS-210，旭化成社，東京）を用いて分析した。

実験結果

第7次変異株（CR-720）の好気暗条件でのALA生産能力 Fig. 1に変異株CR-520，CR-606およびCR-720のALA生産および菌体濃度の挙動を示す。CR-606株を親株として変異を行い、低濃度グリシン添加（10 mM）でもALAを生産し、さらに60 mMグリシン存在下でもALAを高生産する菌株として選抜した第7次変異株（CR-720）のALA生産量は、CR-606株を上回っていた。CR-720株のALA生産量は前駆体であるグリシン，ALAD阻害剤であるLA，および酵母エキスを添加後24時間で22 mM，また生産速度は 0.92 mM h^{-1} であった（Fig. 1A）。このとき、CR-520株およびCR-606株のALA生産量はそれぞれ18時間で3.9 mM，24時間で16 mMであった。またCR-606株のALA生産速度は 0.67 mM h^{-1} であった。

グリシン，LA，および酵母エキス添加後，CR-720株の菌体濃度（ OD_{660} ）は、0時間で3.4，30時間で7.1であった。一方、CR-520株およびCR-606株の菌体濃度（ OD_{660} ）は、0時間で5.1および6.6，30時間で16および14であった（Fig. 1B）。

グリシン追添加によるALA生産の増大 グリシンを追添加することによるALA生産の増大を試みた。グリシン，LA，および酵母エキスを添加後，12時間後に最終濃度としてグリシンを60 mM追添加した以外はFig. 1Aと同一の条件下で培養を行った結果，Fig. 2に示すようにCR-720株のALA生産量はグリシン，LA，および酵母エキスを添加後36時間で32 mMであった。また、このときのALA生産速度は 0.89 mM h^{-1} であった。グリシン，

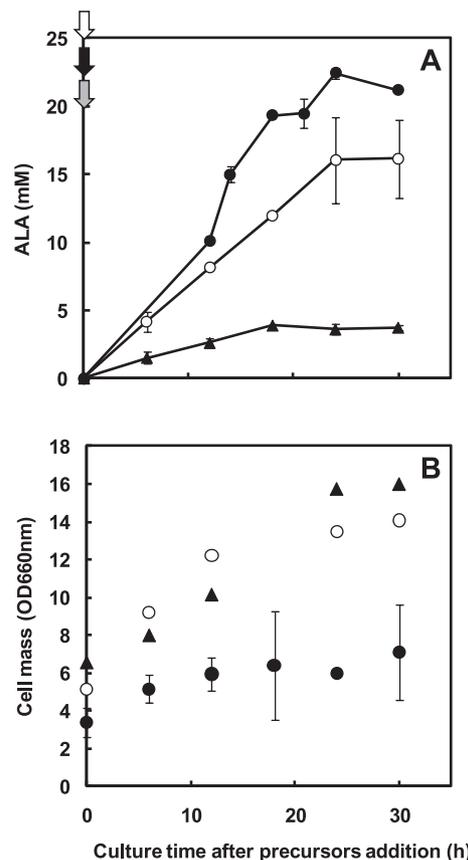


Fig. 1. ALA production by mutants of *R. sphaeroides* in a 2-l jar fermentor containing GGY2 medium (pH: controlled at 6.55 ± 0.05). (A) ALA production, and (B) cell mass. Strains: ●, CR-720; ○, CR-606; ▲, CR-520. ↓, Glycine addition (60 mM); ↓, LA addition (5 mM); ↓, yeast extract addition (10 g l^{-1}). The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

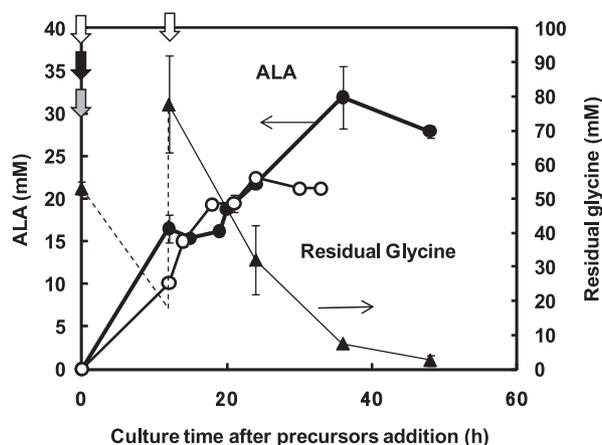


Fig. 2. Effects of repeated addition of glycine on the ALA production of strain CR-720 in a 2-l jar fermentor containing GGY2 medium (pH: controlled at 6.40 ± 0.05). ●, ALA concentration with repeated addition of glycine; ▲, residual glycine concentration with repeated addition of glycine; ○, ALA concentration with 1-time addition of glycine. Arrows are the same as in Fig. 1. The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

LA, および酵母エキス添加後, 12 時間後にグリシンを追添加した場合, 残存グリシン濃度は, グリシン, LA, および酵母エキス添加直後で 53 mM, 12 時間後 (追添加後) 78 mM, 36 時間後 7.4 mM, および 48 時間後 2.5 mM であった. 36 時間以降, ALA 生産は停止した.

CR-720 株の ALA 生産に対する至適レブリン酸 (LA) 濃度 グリシン, LA, および酵母エキス添加後の pH を 6.4 ± 0.1 に調節し, グリシン添加 (最終濃度として 60 mM) を 2 回行う条件下で, 2 l 発酵槽を用いて CR-720 株の ALA 生産量に対する LA 濃度の至適範囲を検討した. LA を最終濃度として 1, 2 および 4 mM 添加した場合は, グリシン, LA, および酵母エキス添加後 30 時間での ALA 生産量は, それぞれ 25, 27 および 22 mM であった (Fig. 3A). ALA 生産速度はそれぞれ 0.8, 0.9 および 0.7

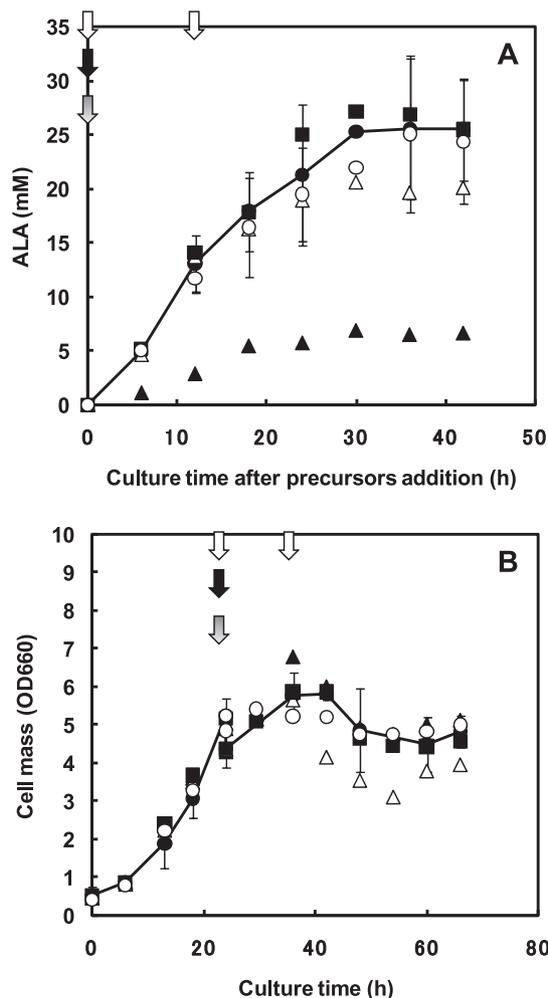


Fig. 3. Effects of LA concentration on the ALA production of strain CR-720 in a 2-l jar fermentor (pH: controlled at 6.55 ± 0.05). (A) ALA production and (B) cell mass after precursor addition at the following conditions, LA at concentrations of ▲, 0 mM; △, 0.5 mM; ●, 1 mM; ■, 2 mM; ○, 4 mM. ↓, Glycine addition (60 mM); ↓, LA addition (0–4 mM); ↓, yeast-extract addition (10 g l^{-1}). The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

mM h^{-1} であった. また, 最終濃度として 0.5 mM にて 1 回 LA を添加した場合の ALA 生産量は 21 mM であった. LA 無添加の場合, グリシン, LA, および酵母エキス添加後 30 時間での ALA 生産量は 7 mM であった. 一方, グリシン, LA, および酵母エキス添加後の菌体濃度は, LA を 4 mM 添加した場合に菌体濃度 (OD_{660}) が他の濃度と比較して高く推移した (Fig. 3B). しかしながら, 菌体濃度 (OD_{660}) は 5~6 であった.

CR-720 株による ALA 生産に対する pH の影響

CR-720 株を用いて ALA 生産に対する pH の至適範囲を検討した. 2 l 発酵槽を用い, GGY2 培地にて CR-720 株を 24 時間培養したのち, 前駆体としてグリシン, ALAD 阻害剤として LA, および酵母エキスを, 最終濃度がそれぞれ 60 mM, 1 mM, および 10 g l^{-1} になるよう添加し, pH の設定値を 6.05, 6.25, 6.45, 6.65 および 6.85 ± 0.05 として硫酸および NaOH を用いて自動制御を行った. また, グリシン, LA, および酵母エキス添加後, さらにグリシンを 12 時間後, および 24 時間後に最終濃度として 60 mM 上昇するよう添加した. 結果を Fig. 4 に示す. pH 設定値が 6.05 のとき, グリシン, LA, および酵母エキス添加 36 時間後の ALA 生産量は 17 mM であった. その他の pH 設定値における ALA 生産量は 25 から 31 mM を示した. グリシン, LA, および酵母エキス添加 36 時間以降, pH 設定値が 6.25 および 6.45 の場合, 66 時間後に ALA 生産量はそれぞれ 45 および 43 mM となった. 一方, pH 設定値が 6.05, 6.65 および 6.85 の場合は, 66 時間後の ALA 生産量はそれぞれ 24, 32, および 32 mM であった. 以上の結果, pH は 6.25 ± 0.05 が最適と言える.

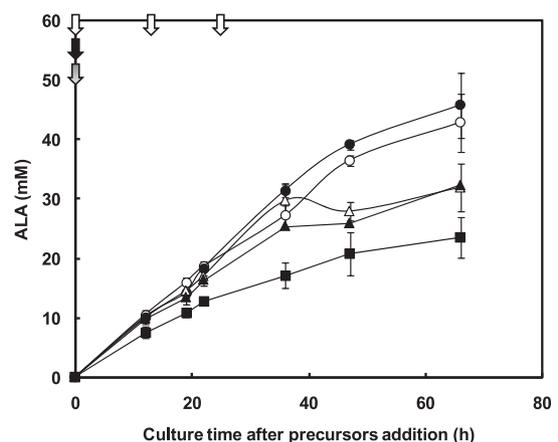


Fig. 4. Effects of pH on ALA production of strain CR-720. In 2-l jar fermentors, the pH was controlled at ●, 6.25 ± 0.05 ; ○, 6.45 ± 0.05 ; ▲, 6.65 ± 0.05 ; □, 6.85 ± 0.05 ; ■, 6.05 ± 0.05 . ↓, Glycine addition (60 mM); ↓, LA addition (1 mM); ↓, yeast extract addition (10 g l^{-1}). The values represent the average and standard deviation of triplicate measurements.

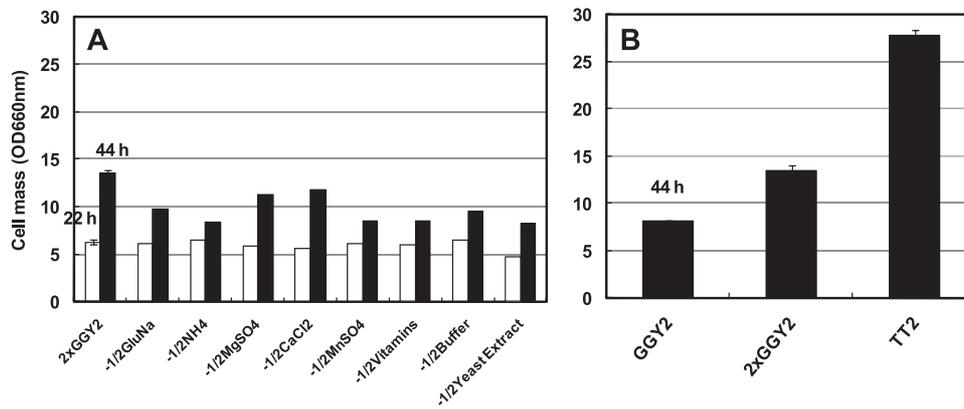


Fig. 5. Growth of strain CR-720 on various media. (A) Growth on 2 × GGY2 medium with half concentration of each constituent. (B) Growth on GGY2 medium, 2 × GGY2 medium, and TT2 medium in 300-ml Erlenmeyer flasks containing 30 ml of each medium. Strain CR-720 was grown at 32°C and 120 rpm agitation. The cell mass was measured after 22 h and 44 h. The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

Table 1. ALA synthetase activity of mutant strains exposed to different dissolved oxygen levels.

DO (mg l ⁻¹)	ALA synthetase activity (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹) ^a		
	CR-720	CR-649	CR-520
0.02 ± 0.04	9.6 ± 1.9	5.8 ± 0.4	6.9 ± 1.2
0.81 ± 0.28	10.4 ± 3.7	3.3 ± 0.4	2.4 ± 0.1
1.61 ± 0.13	5.3 ± 1.6	1.6 ± 2.3	1.1 ± 1.1

^a After 48-h culture, DO was controlled by agitation in a 3-l jar fermentor. The values represent the average and standard deviation values of triplicate measurements.

好気条件下でのCR-720株のALA合成酵素活性 グリシン添加条件, およびpHの検討により, CR-720株の最大ALA生産量を増大させることができた (Fig. 4). しかしながら, 菌体濃度 (OD₆₆₀) は5~7程度と低かった (Fig. 1B, Fig. 3B). そこで, 菌体濃度を増加させることでALA生産速度を向上させることを目的として, 培地の検討を行った.

GGY2 培地の各成分を2倍としグルコース濃度を200 mMとした改変培地 (2 × GGY2およびTT2) によりCR-720株を培養した. Fig. 5に示すように44時間後の菌体濃度 (OD₆₆₀) はGGY2培地による培養では8.2であったのに対し, 2 × GGY2培地による培養では13となった. また, 酵母エキスを工業用酵母エキス (オリエンタル酵母社) を主体としたTT2培地による培養では28に達した (Fig. 5B). 2 × GGY2培地に含まれる成分の中で, 菌体増殖に寄与する成分を確認するため, 各成分を半量添加した培地を作製しCR-720株を培養したところ, 成分を半量にしたそれぞれの培地で培養による44時間後の菌体濃度は, 2 × GGY2培地の菌体濃度よりも低く, すべての成分は必要十分量であることを確認した (Fig. 5A).

そこで, 3 l発酵槽を用いて, 改変培地 (2 × GGY2) に

よりCR-720株の培養を行い, 溶存酸素濃度が1.61, 0.81, 0.02 mg l⁻¹のときに培養液をサンプリングし, それぞれの菌体のALA合成酵素 (ALAS) 活性を測定した. 結果をTable 1に示す. 比較対照として第5次変異株 (CR-520) および第6次変異株 (CR-606) を用い同じ培養を行った結果を示す. 溶存酸素濃度が1.61 mg l⁻¹の場合, CR-720株のALAS活性はCR-520株の約5倍であった. また, 0.02 および0.81 mg l⁻¹においてもCR-720株のALAS活性は有意に上昇していた. 一方, 溶存酸素濃度が1.61 mg l⁻¹の場合のALAS活性は, 0.81 mg l⁻¹の場合のALAS活性に対して約1/2であった.

CR-720株のALA蓄積に対する酸化還元電位 (ORP) を指標とした酸素供給条件の設定 CR-720株の最大ALA蓄積を確認するため, 酸素供給条件の検討を行った. 3 l発酵槽を用い, 2 × GGY2培地により40時間生育させた後, グリシン, LA, および酵母エキスをそれぞれ最終濃度が60 mM, 1 mM および10 g l⁻¹となるよう添加し, 通気速度は0.2 vvm一定のもと攪拌速度を180, 300, 350, 400 rpmとして, ALA生産量, 酸化還元電位 (ORP) および菌体濃度を観察した. Fig. 6に示すように攪拌速度を300 rpmとしたとき, グリシン, LA, および酵母エキ

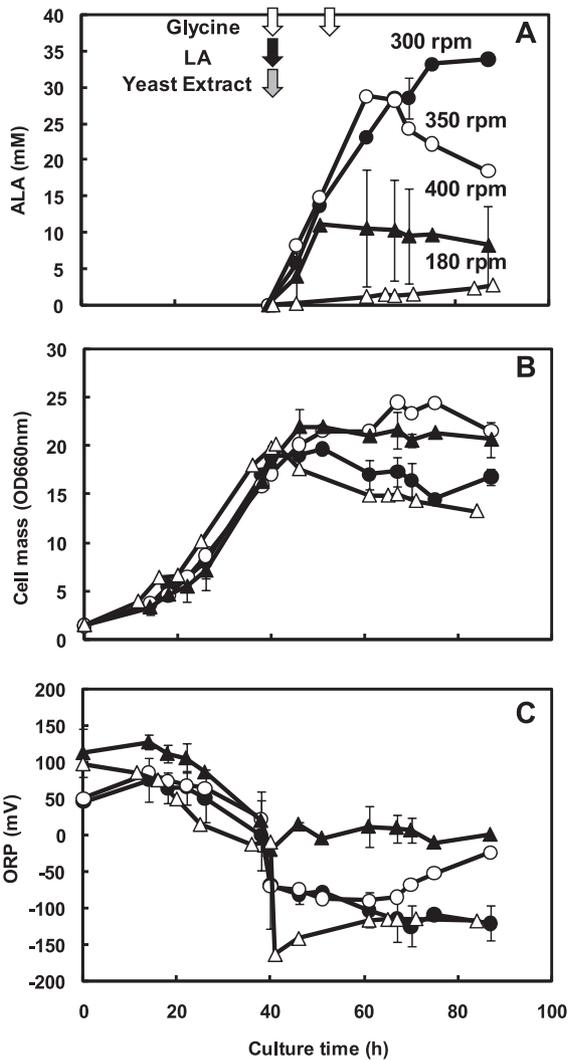


Fig. 6. Effects of agitation on ALA production of strain CR-720. A 3-l jar fermentor containing $2 \times$ GGY2 medium was used and the pH was controlled 6.3 ± 0.1 . Agitation after the addition of glycine, LA, and yeast extract was controlled at \triangle , 180 rpm; \bullet , 300 rpm; \circ , 350 rpm; \blacktriangle , 400 rpm. (A) ALA production, (B) cell mass, and (C) redox potential (ORP). Arrows are the same as in Fig. 4. The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

スを添加した35時間後にALA生産量33 mM (生産速度; 0.94 mM h^{-1}) を得た。また攪拌速度が300 rpm のとき、グリシン、LA、および酵母エキスを添加した35時間後の菌体濃度 (OD_{660}) は、14であった (Fig. 6B)。一方、350および400 rpm とした場合のALA生産量は、グリシン、LA、および酵母エキスを添加した21時間後にそれぞれ29および10.6 mM ($1.38, 0.53 \text{ mM h}^{-1}$) であった (Fig. 6A)。このとき、グリシン、LA、および酵母エキスを添加した35時間後の菌体濃度は、24および21であった (Fig. 6B)。

これらの条件下でのORP値を測定すると、攪拌速度180, 300, 350および400 rpm のとき、それぞれ-164,

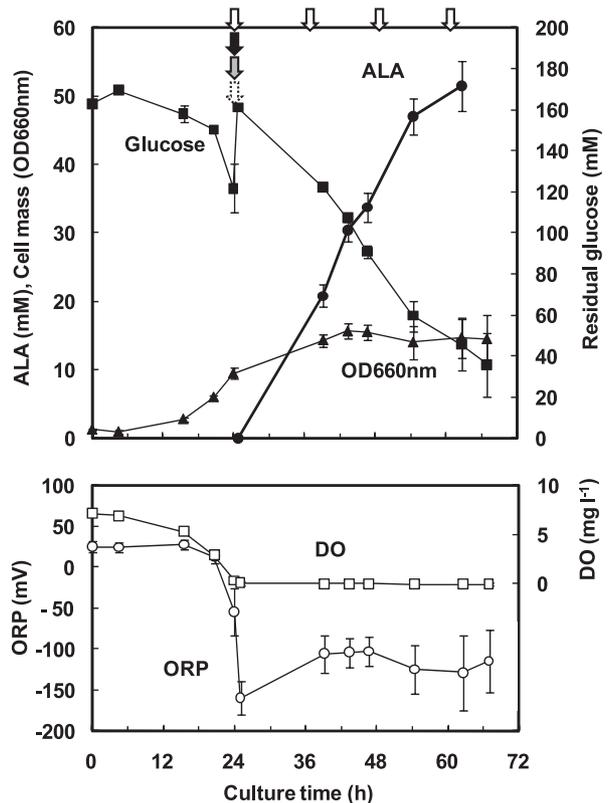


Fig. 7. ALA production of strain CR-720 with agitation and redox potential (ORP) control in a 3-l jar fermentor containing TT2 medium. Agitation was carried out at 350 rpm and pH was controlled at 6.3 ± 0.1 after the addition of LA, yeast extract, glycine, and glucose. \bullet , ALA production; \blacktriangle , cell mass; \blacksquare , residual glucose; \square , dissolved oxygen (DO); \circ , ORP. \downarrow , Glycine addition (60 mM); \Downarrow , LA addition (1 mM); \Downarrow , yeast-extract addition (5 g l^{-1}); \Downarrow , glucose addition (50 mM). The values represent the average and standard deviation of triplicate experiments.

-111, -71および22 mVを示した。350 rpm のとき、グリシン、LA、および酵母エキスを添加した21時間後には培養液中のグリシン濃度分析値は4.2 mMであった。溶存酸素濃度は前駆体添加後、すべて 0 mg l^{-1} であった。

ORPを指標として設定した酸素供給条件によるCR-720株のALA生産量 ORPの違いによりALA生産に大きく差異が見られたので、3 l発酵槽を用いてCR-720株を40時間培養後、前駆体としてグリシン、ALAD阻害剤としてLA、グルコースおよび酵母エキスをそれぞれ60 mM, 5 mM, 50 mMおよび 10 g l^{-1} となるよう添加、硫酸を用いてpHを 6.3 ± 0.1 に調整しALA生産を行った。また、ALA生産開始時の攪拌速度は、ORP測定値がおおよそ-150 mVになるよう調整した結果、350 rpmが適当であったので、ALA生産時の攪拌速度は350 rpm一定とした。グリシン、LA、グルコース、および酵母エキス添加後グリシンを、12, 24, および36時間後に最終濃度として60 mM分をそれぞれ追添加した。Fig. 7Aに示すよう

に、CR-720株のALA生産量はグリシン、LA、グルコース、および酵母エキスを添加した30時間後および38時間後に、それぞれ47および52 mMに達した。また、ALA生産開始から27時間後までのALA生産速度は1.6 mM h⁻¹に達した。ALA生産時の溶存酸素濃度は0 mg l⁻¹を推移し、ORPは-150~-100 mVの範囲内であった(Fig. 7B)。ALA生産開始から30時間後および38時間後のグルコース残存量は、それぞれ60および46 mMであった。また、ALA生産時の菌体濃度(OD₆₆₀)は、16から19を推移していた(Fig. 7A)。グルコースの減少とALAの生産は並行しており、ALA生産開始から30時間までのグルコースからALAへのモル収率は46%であった。

考 察

今回、3 l発酵槽を用いCR-720株によって得たALA生産濃度(52 mM)は、最近の報告、*Rhodospseudomonas palustris*による0.2 mM²⁴⁾、*R. palustris*の*hemA*遺伝子を含んだ*E. coli*による39.3 mM¹¹⁾、遺伝子組換え*E. coli*による24 mM²⁵⁾、29 mM¹²⁾、23 mM¹³⁾と比較して1.3倍以上高い結果であった。

CR-720株は、GGY2培地ではALA生産時の菌体濃度(OD₆₆₀)が5~7と低く、一方、ALA生産量は22 mMの結果を得、CR-606株やCR-520株と比較して好気暗条件で高かった。本結果は、CR-720株では菌体生産に回るエネルギーが、より多くALAに振り向けられたと考えられる。

遺伝子組換え*E. coli*によるALA生産では、グリシン90 mMを1回添加、1~2 g l⁻¹(13~26 mM)を1回もしくは数回¹¹⁻¹⁵⁾添加している。グリシン26 mMを1回さらに13 mMを2回添加した場合のグリシンからのALAの収率は54%であるのに対し¹²⁾、今回の著者らの実験ではグリシンを合計120 mM添加し、ALAを34 mM生産した(Fig. 2)ことから、グリシンからのALAの収率は28%となり、遺伝子組換え*E. coli*と比較してCR-720株はグリシンからのALA収率は低かった。CR-720株ではグリシンが、アンモニアなどの他の物質に代謝され、ALA生産に用いられていないためと考えられる¹⁸⁾。

ALA脱水酵素阻害剤としてのLA添加濃度は、CR-720株については試験管培養で5 mMと報告されている¹⁸⁾。また、遺伝子組換え*E. coli*では、30 mMと10 mMでの2回添加での報告がある¹²⁾。今回、CR-720株は1 mMを1回添加することでも、5 mM添加とほぼ同様のALA生産を得た。このことはLAのコスト低減に効果的である。

CR-720株のALA生産時のpH制御値はきわめて狭い範囲(pH 6.25~6.45)で、前駆体添加後30時間以降のALA生産を継続可能なことを今回明らかにした。pH 6.5

に制御を行いALAを生産させた例は報告されているが、遺伝子組換え*E. coli*を含め、これまでにALA生産を増大させるためのpH設定幅についての報告がなく、新たな知見を得た。

従来、光合成細菌*R. sphaeroides*の変異株の培養にはLascellesら²⁷⁾の培地を基本としてヘムによるフィードバックを避けるためクエン酸鉄などの微量金属成分やスクシニル-CoAの供給源としてグルコースを添加し改変したGGY2培地を使用してきた¹⁶⁾。

グルコース濃度を200 mMとし、GGY2培地のその他成分を2倍とした2×GGY2培地を用いて培養したCR-720株は、溶存酸素濃度が0.81 mg l⁻¹存在下でもALAS活性が10.4 nmol min⁻¹ mg protein⁻¹を示し、GGY2培地で生育したCR-720株のALAS活性13.3 nmol min⁻¹ mg protein⁻¹¹⁶⁾と比較してほぼ同等の活性を有していた(Table 1)。菌体濃度はGGY2培地のほぼ1.3倍得られた(Fig. 5)ことから、菌体あたりの酵素活性は上昇していると考えられた。

2×GGY2培地で生育したCR-720株は、ALA生産に対する最適な酸素供給条件として、通気量0.2 vvm条件下でのORP値が-150~-100 mV程度であることを3 l発酵槽を用いたALA生産試験で今回新たに確認した(Fig. 6)。

さらに、酵母エキスを工業用酵母エキスを主体としたTT2培地に変更し、ALA生産時ORP値の推移が-150~-100 mVとなる攪拌速度は350 rpmであることを確認し、ALA生産が52 mM、また、生産開始後30時間までのALA生産速度は1.6 mM h⁻¹であることを確認した(Fig. 7)。ALA生産速度についてはこれまで報告されている遺伝子組換え*E. coli*による1.6 mM h⁻¹¹¹⁾と比較してほぼ同等の結果を得た。以上のことから、本報では、工業的な生産に応用が可能となるよう、新規にORPを指標として、ALA生産の至適酸素供給条件を設定したことを報告した。さらに、これまでとは安価な培地を使用し、工業レベルに達する52 mMのALA生産を可能にした。なお、これまで、ALAをバイオ生産で実用化している例は報告されていない。

要 約

すでに得ている光合成細菌変異株*R. sphaeroides* CR-720株は、*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンによる変異を逐次行い取得した変異株であり、光照射せずに従来の変異株に対して5-アミノレブリン酸(ALA)を高蓄積する。本菌株は前駆体として50 mMグルコース、60 mMグリシン、ALA脱水酵素阻害剤として5 mMレブリン酸および10 g l⁻¹酵母エキス存在下、2 l発酵槽でALAを生産させたところ、親株であるCR-606株に対して生

産量は40%増大した。また、グリシンの追添加およびレブリン酸添加濃度の最適化を行い、厳密にpHを6.25 ± 0.05に制御した結果、ALAを43 mM生産した。さらに、培地を改良し高菌体濃度を得た。本培地で生育したCR-720株の菌体が持つALA合成酵素活性はCR-606株の約3倍であった。さらに、3 l 発酵槽を用いて酸化還元電位(ORP)を指標とした酸素供給条件の設定を行った結果、ORP値が-150から-100 mVでALAの生産は最大値を示した。CR-720株は最終的にALAを52 mM生産し、生産速度は1.6 mM h⁻¹を得た。

文 献

- 1) 田中 徹, 岩井一弥, 渡辺圭太郎, 堀田康司: 植物の生長調節, **40**, 22-29 (2005).
- 2) Mauzerall, D. and Granick, S.: *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-446 (1956).
- 3) Rebiez, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H. J., and Wu, S. M.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 390-396 (1984).
- 4) 渡辺圭太郎, 船田茂行, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p.59 (2008).
- 5) 船田茂行, 小堀寿浩, 藤田峰斎, 堂田正彦, 渡辺圭太郎, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p.60 (2008).
- 6) Awad, M. A.: *Sci. Hortic.*, **118**, 48-52 (2008).
- 7) 渡辺圭太郎, 船田茂行, 小堀寿浩, 笛木正一, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会発表記録集, p.38 (2007).
- 8) 船田茂行, 渡辺圭太郎, 田中 享, 田中 徹, 竹内安智: 植物化学調節学会研究発表記録集, p.39 (2007).
- 9) 岩井一弥, 倉持仁志, 竹内安智: 芝草研究, **35**, 99-104 (2007).
- 10) Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., and Tanaka, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23-20 (2002).
- 11) Choi, H. -P., Lee, Y. -M., Yun, C. -W., and Sung, H. -C.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 1136-1140 (2008).
- 12) Fu, W., Lin, J., and Cen, P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 777-782 (2007).
- 13) Qin, G., Lin, J., Liu, X., and Cen, P.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 316-322 (2006).
- 14) Xie, L., Eiteman, M. A., and Altman, E.: *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1751-1755 (2003).
- 15) Xie, L., Hall, D., Eiteman, M. A., and Altman, E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 267-273 (2003).
- 16) Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 798-804 (1999).
- 17) 上山宏輝, 堀田康司, 田中 徹, 西川誠司, 佐々木 健: 生物工学, **78**, 48-55 (2000).
- 18) Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y., and Hayashi, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 403-406 (1991).
- 19) Tanaka, T., Watanabe, K., Hotta, Y., Lin, D., Sasaki, K., and Nagai, S.: *Biotechnol. Lett.*, **13**, 589-594 (1991).
- 20) Burnham, B. F. and Laccelles, J.: *Biochem. J.*, **87**, 462-472 (1963).
- 21) Yubisui, Y. and Yoneyama, Y.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 77-85 (1972).
- 22) Okayama, A., Fjii, S., and Miura, R.: *Clin. Chem.*, **36**, 1494-1497 (1990).
- 23) 安居嘉秀: 島津評論, **47**, 365-372 (1990).
- 24) Saikur, A., Choerit, W., Prasertsan, P., Kantachote, D., and Sasaki, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 987-992 (2009).
- 25) Liu, X. X., Wang, L., Wang, Y. J., and Cai, L. L.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**, 822-830 (2010).
- 26) 田中 享, 西川誠司, 室岡義勝: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.98 (2003).
- 27) Lascelles, J.: *Biochem. J.*, **72**, 508-518 (1959).