

バイオベースインダストリーを創出する 有用微生物機能の設計・探索・開発

小川 順

昨今の省エネルギー・環境調和型社会への転換志向が後押しとなり、微生物機能を積極的に産業に活用する機運が高まってきている。本稿では、最近の産業界におけるキーワード「環境」、「健康」を見据えたバイオベースインダストリーの創出に資する微生物機能開発の新展開を、筆者らの機能探索研究を中心に、バイオプロセス・環境保全・健康志向・食糧生産を切り口に俯瞰してみたい。

化学品を持続的に生産、供給するためには、石油由来原料を石油以外の原料へ転換・多様化していくことが必要である。この認識のもと、現在、植物バイオマスであるデンプン、セルロース、ヘミセルロース、リグニンなどから主に酵素糖化と発酵生産を組み合わせた手法により、糖類、アルコール類、有機酸類、アミノ酸類を一次化成品原料として生産するバイオリファイナリープロセス開発が盛んに試みられている。バイオリファイナリープロセスにより生産される一次化成品原料は、現在の石油化学産業において利用されている基幹合成原料と比べると、分子構造上の特性が少し異なっている。石油化学産業における基幹合成原料とは、還元度の高い炭化水素骨格に重合反応などに必要な分子構造である炭素-炭素不飽和結合、水酸基、カルボキシル基、アミノ基などを有する化合物群である。したがって、バイオリファイナリーと現在の石油化学産業をうまく連結させるためのキーテクノロジーの一つとして、バイオマスから発酵生産的に誘導される一次化成品原料を効率的に基幹合成原料へと変換する技術が重要であると思われる。炭化水素骨格に不飽和結合、水酸基、カルボキシル基、アミノ基などを有する基幹合成原料を誘導しうる微生物変換反応

としては、水和・脱水反応、酸化・還元反応、飽和・不飽和化反応、水酸化反応などが挙げられる(図1)。

筆者らは最近、脂質の微生物変換研究を展開するなかで、嫌気性細菌に新規な還元的不飽和脂肪酸代謝を見いだし、不飽和脂肪酸の水和・脱水を伴う共役脂肪酸への異性化、二重結合の飽和化など上記変換反応への応用が期待される酵素反応を明らかにしてきた¹⁾。また、脂肪酸のカルボキシル基をアルデヒド経由でアルコールへと還元する活性も見いだしている。さらに、好氣的代謝に関して、糸状菌に高い不飽和化活性を²⁾、また、細菌類に高い水酸化活性を見いだしている³⁾。また、これらの微生物反応の解析結果からATP、CoAなどの高エネルギー補因子、ならびにNAD(P)H、FADなどの酸化還元補因子、 α -ケトグルタル酸やチオレドキシン、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)などの電子伝達関連補因子がこれらの反応に必要なことを見いだしている。

これらの知見に基づき、ここでは主に基幹合成原料に必要な分子構造を誘導しうる新規微生物触媒の開発、ならびに、エネルギー・電子を橋渡しする複合酵素系の開発を紹介する。あわせて、基幹合成原料の重合などにも有用な酸化酵素(ラッカーゼ)の開発と環境保全やエネルギー生産にむけた用途拡大について、さらには酵素機能を活用する機能性食品生産や、食糧供給の主役である植物の生育を促進するための微生物機能利用についても触れてみたい。

新規微生物触媒の開発

バイオプロセスの導入による環境負荷低減を目指し、反応の多様化に向けた酵素開発が盛んに行われている。その変遷と今後の展開を、水酸基生成反応を例に俯瞰してみる。

光学活性アルコール生産に見る酵素触媒研究動向

リパーゼ、エステラーゼによる不斉加水分解から、還元酵素を用いた不斉還元プロセス(図2A)へと移行し、次世代酵素触媒の開発を目指した酸化反応(オキシゲナーゼ)(図2B, C)の活用、あるいは炭素-炭素結合反応による複不斉点制御へと発展してきている(図2D)。これらに関し、筆者らはP450モノオキシゲナーゼの開発、機能性アミノ酸生産に有用なジオキシゲナーゼ・ア

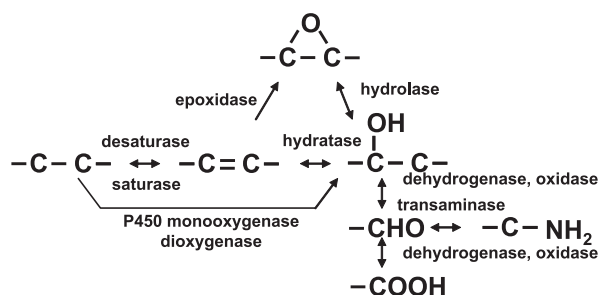


図1. 基幹合成原料の誘導に有用な微生物反応

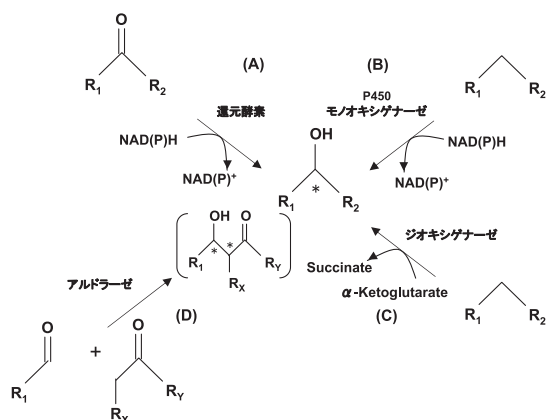


図2. 光学活性アルコール生産に有用な微生物反応

ルドラーゼの開発に取り組んでいる。

P450モノオキシゲナーゼ：精密酵素合成への応用が期待されている *Bacillus megaterium* 由来のシトクローム P450モノオキシゲナーゼ BM-3 の実用化を目指し、部位選択性ならびに立体選択性の高い変異型酵素を誘導するとともに、BM-3 触媒反応の効率化を検討してきた。その結果、BM-3 の活性化および安定化因子として SOD を同定した。BM-3 高機能化のためのプラットフォーム技術を目指し、SOD 発現大腸菌の BM-3 発現宿主としての機能評価を行い、活性ならびに安定性の向上を確認するとともに、医薬中間体合成に有用な 2-benzyloxyphenol のパラ位特異的水酸化反応の効率化に応用した⁴⁾。

ジオキシゲナーゼ：抗肥満活性が期待される 4-ヒドロキシイソロイシン (HIL) などの水酸化アミノ酸の生産にあたり、脂肪族アミノ酸の微生物代謝を詳細に解析した結果、水酸化アミノ酸を経てオキソアミノ酸を生成する新規代謝系を見いだした⁵⁾。また、本代謝系に関与する α -ケトグルタル酸依存性新規ジオキシゲナーゼを単離精製・機能解析するとともに⁶⁾、 α -ケトグルタル酸を高蓄積するべく TCA サイクルを代謝改変した大腸菌を汎用宿主として開発し、HIL の大量生産に応用した⁷⁾。

アルドラーゼ：大量生産が可能となった HIL の微生物代謝を解析した結果、トランスアミナーゼ、アルドラーゼが関与する分解代謝系を見いだした。この代謝系に関与するアルドラーゼならびにその相同遺伝子産物をライブラリー化するとともに、トランスアミナーゼとのカップリングによる水酸化アミノ酸合成法を構築した⁸⁾。

複合酵素系の活用 加水分解酵素による光学分割などの単一酵素系から、補酵素再生系を含む還元酵素系や、電子伝達系、高エネルギー基質供給系などのカップリングによる複合酵素系へと反応系が複雑化してきている。ATP 要求性反応と共役した複合酵素系を活用する基盤技術として、解糖系酵素と核酸分解系酵素がカッ

プリングしたデオキシリボヌクレオシド生産を構築したり、触媒としてはパン酵母解糖系、ヌクレオシド分解系酵素共発現大腸菌を用いた、鍵中間体であるリン酸化糖の合成に必要なエネルギー (ATP) を解糖系から効率よく獲得できたこと、反応平衡を分解側に向けてしまうリン酸の生成を ATP 再生に活用する工夫がうまく機能し、グルコース、アセトアルデヒド、核酸塩基からのデオキシリボヌクレオシドのワンポットでの効率生産を達成した (投稿中)。

微生物酸化酵素の開発と用途拡大

石油代替バイオマス燃料生産や、バイオリファイナリーに活用される微生物酵素についてはさまざまな角度から議論がなされているので、ここでは少し違った角度から、微生物酵素を環境保全に活用する事例を紹介してみたい。

酵素機能を活用した新たな生態系制御ツール 微生物ラッカーゼが示す殺菌作用を植物病原菌の駆除に利用すべく、その機能を賦活するメディエーターとの併用によるラッカーゼ・メディエーターシステムを新たな生態系制御ツール (酵素農薬) として開発した。 *Trametes* 属担子菌由来ラッカーゼならびにメディエーターとしてオイゲノールを用いてイチゴ炭疽病菌、そうか病菌、青枯病菌、トマト根腐萎凋病菌を対象に殺菌効果を検討した結果、いずれの菌に対してもラッカーゼとオイゲノールの共存下にて顕著な殺菌効果を認めた (図3)。

一方、ラジカル消去剤の添加により、殺菌効果が減少したことから、ラジカル様中間体の殺菌作用への関与が推測された。さらに、オイゲノールに代わるメディエーターを食品添加物群に探索した結果、オイゲノールに構造が類似するフェノール性化合物に活性を認めた¹⁰⁾。以上の研究により、ラッカーゼ・メディエーターシステムを用いるバイオ農薬の基礎を確立することができた。

バイオ電池モジュールとしての微生物酵素 バイオ電池のカソード電極に用いる酵素モジュールとして、酵素の水への変換を触媒しうる微生物ラッカーゼ群の機能評価を行い、中性 pH に作用域を持つラッカーゼの一種ビリルビンオキシダーゼに有用性を見いだした¹¹⁾。

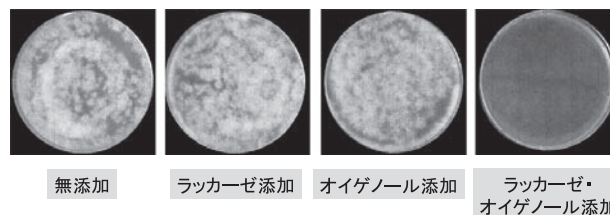


図3. ラッカーゼ・メディエーターシステムを用いる殺菌 (イチゴ炭疽病菌の例)

健康志向

食品成分の機能に対する意識が高まるにつれ、酵素機能を機能性食品や栄養補助食品（サプリメント）の生産ツールとして利用する動きがでてきている。また、より積極的に微生物酵素そのものを、機能性食品・サプリメントに応用する検討もなされている。

機能性脂質生産 共役リノール酸（CLA）には、抗腫瘍活性、体脂肪減少作用などが報告されている。プロバイオティクス素材としても注目される乳酸菌を対象にリノール酸変換活性を探索した結果、新たな不飽和脂肪酸飽和化酵素系を見だし、その酵素機能をCLA生産に活用したり。また、乳酸菌における不飽和脂肪酸飽和化経路を詳細に解析した結果、不飽和脂肪酸の水酸化脂肪酸への水和、水酸化脂肪酸の酸化とそれに引き続く二重結合の転移によるエノンの生成、さらにはエノンの二重結合還元を経て、それまでの反応を折り返すように進行するカルボニル還元、脱水反応により飽和化を完結する一連のルートの主経路とし、さまざまな共役脂肪酸、水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸を生じる分岐路を伴った複雑な代謝系を明らかにした。本代謝系に参与する複数の酵素を単離精製し、一部については遺伝子・ゲノム情報を活用して特定したのち機能解析を行った結果、単独もしくはは適当な組み合わせにより、水酸化脂肪酸、共役脂肪酸、オキソ脂肪酸などの機能性脂質、ポリマー素材などを誘導しうる応用的にも興味深い酵素群であることを明らかにした（未発表）。

酵素サプリメント 微生物酵素ラッカーゼが、ポリフェノール性食品成分の機能性増強を通して、潜在的食品機能の向上に用いられている。ラッカーゼによるフラボノイドやポリフェノールの変換物質は、脱臭効果や抗菌作用を示すことが報告されており、脱臭・殺菌を目的にラッカーゼを食品に添加する試みがなされている。たとえば、ローズマリーの香気成分であるロズマノールがラッカーゼにより酸化されることで、脱臭効果が約20倍向上することが報告されており、市販ガムの機能性向上に活用されている。

植物の生育を促進するための微生物機能利用

従来、有機廃棄物はコンポスト化され、土壌の潜在力を頼りに施肥利用されてきた。筆者らは、野菜茶業研究所の篠原信博士らと共に、より積極的かつ計画的に有機廃棄物を活用・循環すべく、量的・質的制御がより柔軟な作物生産形態である水耕栽培系への有機廃棄物の活用を目指している¹²⁾。植物工場に代表される水耕栽培系は、計画的作物生産が可能であり、人口増加が予想される未来社会における重要な食糧生産技術である。しかし、こ

れまでの水耕栽培系は、化学肥料を用いる無菌的な技術であり、有機質肥料の導入が困難とされていた。筆者らは、有機廃棄物の積極的利用と循環を計画的作物生産を介して実現すべく、有機廃棄物を水耕栽培系で利用できる形態に変換しうる微生物剤の開発を目指している。具体的には、有機態窒素の硝化を効率化し、かつ水耕栽培時の根部病害抑制効果を持つ微生物剤の開発に取り組んでいる。これにより有機廃棄物を活用する循環型作物生産の実現を目指している。

まとめにかえて：健やかな物質循環と微生物機能

10年後の2020年に向けて地球社会が目指しているものは、幾世代先に渡ってもエネルギー・食糧が安定供給されうる持続可能な社会システムの構築であろう。そもそも、宇宙的観点からは地球は閉じた空間であり、たとえば人工衛星「はやぶさ」がはるかなる旅から帰還したり、隕石が落下したりするようなことがなければ、物質の大きな出入りはない。地球上では、物質はさまざまに形を変えつつも、ただ循環するのみであり、そのためのエネルギーは根源的には唯一太陽から供給されている。したがって、持続的社会とは、供給された太陽エネルギー量に見合った健やかな物質循環の流れが実現している社会であるとも言える。この点、すなわち健やかな物質循環において、微生物が果たす役割が大きいことは周知のことである。地球環境において微生物が物質循環の主役を担っているという思いが潜在的にあるせいも、昨今の省エネルギー・環境調和型社会への転換志向とともに、微生物機能を積極的に産業に活用する機運が高まってきている。よろず存在する微生物機能は多彩である。それらに着目した産業利用が今後いかに展開され、どのようなバイオベースインダストリーが創出されるか興味深い。

文 献

- 1) 岸野重信, 小川 順: *Bio Industry*, **27**, 32 (2010).
- 2) 櫻谷英治ら: 蛋白質 核酸 酵素, **54**, 725 (2009).
- 3) Sulistyaningdyah, W. T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 556 (2005).
- 4) 小川 順ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.95 (2010).
- 5) Ogawa, J. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press (2010).
- 6) Kodera, T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 506 (2009).
- 7) Smirnov, S. V. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 719 (2010).
- 8) 藤井秀美ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.95 (2010).
- 9) Horinouchi, N. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 615 (2006).
- 10) 山出晋也ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.178 (2007).
- 11) Tsujimura, S.: *J. Electroanal. Chem.*, **496**, 69 (2001).
- 12) 篠原 信: 現代農業, **10**, 310 (2010).