

ミニマムゲノムファクトリー

穴澤 秀治

ミニマムゲノムファクトリー (MGF) の概念を短く表現すると「その発酵生産において必要な遺伝子セットだけを有し、その親株を用いた発酵生産より格段に生産性が向上した変異株」といえる。これは、発酵という物質生産を目的としたものであり、生命体として生きる最小限の遺伝子セットを有するミニゲノム細胞とは、発想の起点がまったく異なる考え方である。MGFの言葉を最初に明確に取り上げたのは、藤尾 (協和発酵)、井上 (花王)、熊谷 (旭硝子) が経済産業省生物化学産業課との論議で立案し、スタートさせたNEDOの研究開発プロジェクト「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」(2001年4月より)の提案の中にある^{1,2,3)}。5年後、その研究成果は、「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」(2011年3月まで)に引き継がれ、昨年、研究開発プロジェクトは終了した⁴⁾。

発酵生産菌育種研究の流れ

本特集の主題である「代謝工学」の原点は、各種発酵生産菌の育種研究にある。そこで、その代表例であるアミノ酸発酵菌の育種の歴史を振り返り、この分野の研究の流れを再認識し、その中から必然的に生まれてきた、MGFの発想の原点を示したい。

アミノ酸発酵の端緒は、それまで抽出法で製造されていたグルタミン酸を、微生物を用い、糖質からの発酵による製造法の確立に始まる。①自然界より、糖質からグルタミン酸を生産する微生物 (*Corynebacterium glutamicum*) の発見、②培地、培養方法の検討により、生産性の向上を図り、工業的製造法を確立、③生合成経路上の分岐、酵素反応を低下させる反応阻害、酵素発現の抑制制御などの生産性を抑え、狙い通りに描いた生合成経路を邪魔する要因を除いた変異株を分離し、選択する手法が大いに発達した。

C. glutamicum の発見から約20年で、20種の生体アミノ酸の大部分が発酵法で製造が成立した。その結果、アミノ酸工業として推計3000億円を超える市場が形成されるようになった。もっとも高品質が求められる医薬

品用途から、栄養飲料、家畜飼料、化成品原料と価格、生産量に対応して、今後とも市場が拡大していくことはまずまちがいない。その中で、製造方法におけるコストダウンの要求は続き、高生産性を示す発酵菌の育種改良の研究は、継続している。1976年以降、遺伝子組換えの技術が発酵生産菌の育種にも取り入れられるようになった。生合成経路上で律速になっている反応を担う酵素遺伝子を増幅し、経路上のボトルネック (律速反応) 解消する戦略がとられた。しかし、単一遺伝子の強化では別に新たな律速反応が出現するケースが認められた。その際に蓄積する代謝中間物には、発酵菌に毒性をもたらす場合もあり、律速段階の遺伝子増幅が、逆に生産性の低下をもたらすケースさえ生じてきた。遺伝子組換え技術はきわめて有力な発酵菌育種のツールであるが、そこには綿密に練られた育種戦略が必要である。その基盤が「代謝工学」といえる。すでに、上記②の変異育種手法では、生合成経路上の不要有害な分岐経路を遮断したり、反応阻害を受ける酵素に、阻害物質に対する耐性をどう獲得させるかなど、経験と工夫を積み重ねた育種戦略として、「代謝工学」の概念には取り入れられている。

21世紀型発酵生産菌育種戦略

1990年代末には微生物のゲノム配列情報が容易に入手できるようになり、21世紀にはいと、遺伝子の発現量の把握、酵素タンパク質の定量、代謝中間体の定量など、分析機器と手法の改良が急速に進展し、これらのいわゆるオミクス情報を発酵菌の育種に活用できる環境が整ってきた。これが、システム生物学の登場である。ランダム変異と優良株の選択、遺伝子組換え技術を用いた遺伝子増幅や欠損変異によるこれまでの育種から、一歩進んだ新しい発想として、MGFが21世紀型戦略の一つとして、ここに生まれてきた。もう一つの発想が、ヒトゲノムの解析で名を成したC. Venterの提唱した合成生物学である (Synthetic Biology)。彼は、その強大なDNA配列決定施設を駆使してサルガッソ海、マンハッタン上空などから分離した微生物由来のゲノムをランダ

ムに配列決定し、メタゲノムの概念を展開してきた。そこにシステム生物学の手法が組み合わされ、微生物の遺伝子機能解析、物質生産への活用を考え、「水から水素、セルロースからエタノール」を標榜し、自然界から分離した微生物遺伝子のベストな組合せを作り上げて、これらの生産にベストな微生物を創造するということを宣言した⁵⁾。最新の報告⁶⁾では、*Mycoplasma genitalium*という小さな微生物の全ゲノム582,970塩基対が合成され、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の中で一つのゲノムとして連結回収され、そして元の細胞にもどしたところ、細胞が増殖したとの報告がなされた。

MGFの発想による発酵生産菌育種戦略

石油化学工業に匹敵する圧倒的な生産性をしめす、バイオ化学工業の触媒として使える発酵菌の創製につながる技術的ブレークスルーをもたらすという大目標を掲げ、MGF創製研究が始まった。

発酵菌の宿主細胞の持つ不要有害な遺伝子をどのように選択するかが最初の課題である。大腸菌では、削除する遺伝子の選択基準を、最少培地での生育に影響を及ぼさない遺伝子とした。まず、臨床分離株も含め複数の大腸菌のゲノムの内、共通に保持されている遺伝子は大腸菌として必要と考え、共通に保持されていない遺伝子を不要ゲノム領域として検出することを検討した。comparative genome hybridization (CGH) の手法を用い、削除候補領域を選択した。次に、奈良先端科学技術大・森教授のもとで作成された大腸菌の4320個の遺伝子を個々に欠損変異させたライブラリーを使い、バイオログ社のフェノタイプ解析システムを用い、代謝機能を中心とした機能解析を行った。この93種の化合物に対する代謝能のデータをクラスタリング解析することで、ある機能未知遺伝子が機能既知遺伝子と類似の機能を有することがある程度推定できる手法である。一度のゲノム削除操作には週単位の時間がかかり、得られた欠損変異株の評価にもかなりの手間と時間を要する。したがって、削除領域を同時に複数設計し、最少培地での生育という評価基準によって、各段階での最良変異株を選択する手法で研究を進めた(図1)。その結果、図2に示す26 stepの操作で、56領域、総計1.03 Mbpのゲノム領域を削減したMGF-01株を創製した⁷⁾。

枯草菌においては、奈良先端科学技術大・小笠原教授

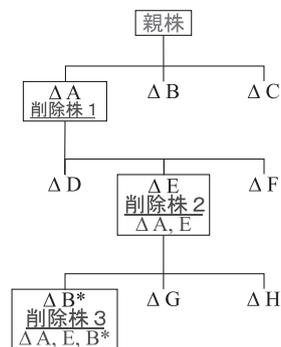


図1. ゲノム削除領域のデザインと選択. 削除領域の集積.

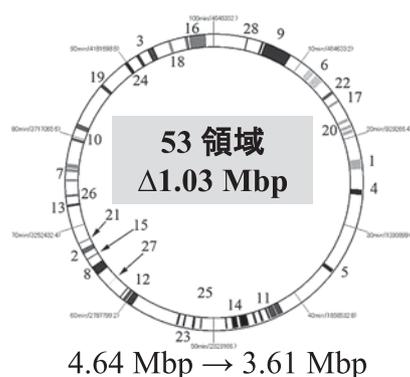


図2. 大腸菌MGF-01株の削除ゲノム領域

を中心に取りまとめられた、枯草菌の一遺伝子破壊株ライブラリーをもとに、削除遺伝子の候補を検討した。変異株それぞれに、セルラーゼ生産プラスミドを導入し、生産性が向上した株、低下した株、変化しなかった株に分け、低下した株で削除された遺伝子は残す遺伝子、向上した株と変化しなかった株の変異遺伝子は削除候補遺伝子とした。その結果、0.9 Mbpを削除した枯草菌MGF株を創製した⁸⁾。組換えタンパク質の生産に用いる分裂酵母では、三つの染色体の末端領域のnon-code領域を中心に0.5 Mbpほどのゲノム削減ができた⁹⁾。さらに、62種のプロテアーゼ、ペプチダーゼ遺伝子について削除を試み、削除変異株について、各種の組換えタンパク生産性を評価した。このように、使用目的の明確な発酵生産菌については、それぞれの用途を想定しながら、削除すべき遺伝子を選択する。

このようにして、作成したMGF株のゲノム削減の効果を見ると、大腸菌MGF-01株においては、最少培地

で培養したときに、親株の1.5倍の生育向上を見せたこと、ATP生産をもたらず $\Delta nlpD$ 変異を導入すると、親株の生産性の5倍以上の生産性を示したこと、L-Thr生産プラスミドを導入したところ親株の1.8倍の生産性を示したなど、物質生産能の大幅な向上が認められた。とくに、最少培地での生育向上の効果は、予想外の成果であった¹⁰⁾。枯草菌MGF株においては、ゲノム削減効果に加え、タンパク分泌能、翻訳効率向上、窒素代謝改変、細胞表層改変の検討も加味し、親株の5倍以上の生産性向上を示した¹¹⁾。分裂酵母のMGFにおいては、組換えタンパクの種類によって、削除できる分解酵素の組み合わせや種類が異なることが見いだされた¹²⁾。

有用物質の発酵生産に用いられる微生物には、発酵タンク内という十分な栄養源と安定な環境の下においては不要有害な遺伝子が多数存在すると考えられ、それらは遺伝子の発現制御として物質の高生産にはネガティブに働く要素と考えられる。そこで、物質生産用の汎用性宿主細胞の創製を目指し、機能未知遺伝子をなくしていくこと、生育を親株より低下させないことの二点を基準に、物質生産に不要有害な遺伝子の削除を進め、物質生産に

必要な遺伝子セットのみを持つMGFの有用性は、その顔を見せ始めた。この発想がさらに広く、微生物のみならず、物質生産に用いられる多様な細胞で検討されることを期待したい。

文 献

- 1) 藤尾達郎：ファインケミカル, **30**, 5 (2001).
- 2) 清水 昌, 水上 透：バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 735 (2003).
- 3) 藤尾達郎ら：微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線, シーエムシー出版 (2007).
- 4) 新エネルギー・産業技術総合開発機構：focus NEDO微生物でのものづくり「ミニマムゲノムファクトリー」その誕生と未来, No.41 (2011).
- 5) Venter, J. C.: *Nature*, **420**, 350 (2002).
- 6) Giboson, D. *et al.*: *Science*, **319**, 1215 (2008).
- 7) Mizoguchi, H. *et al.*: *DNA Res.*, **15**, 277 (2008).
- 8) Ara, K. *et al.*: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **46**, 169 (2007).
- 9) Giga-Hama, Y. *et al.*: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **46**, 147 (2007).
- 10) 森 英郎ら：微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線, CMC出版 (2007).
- 11) 荒 勝俊：合成生物学の隆起, CMC出版 (2012).
- 12) 浜 祐子ら：微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線, CMC出版 (2007).