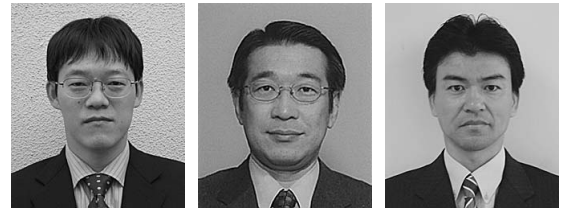


《農芸化学技術賞》

核酸系うまみ調味料新製法の開発と工業化



味の素株式会社・発酵技術研究所 主任研究員 三原 康博①  
 味の素株式会社・バイオ工業化センター センター長 城下 欣也②  
 タイ味の素社・技術開発センター 課長 横山 正人③

1. 核酸系うまみ調味料の製法と当社の取り組み

イノシン酸ナトリウムは鰹節のうまみ成分として、グアニル酸ナトリウムは干し椎茸のうまみ成分として、日本で発見された核酸系のうまみ化合物であり、昆布のうまみ成分であるグルタミン酸ナトリウムと併用することによって相乗的に呈味性を増し、強く豊かなうまみを作り出す。うま味の相乗効果を示し、広く複合的に使用される核酸系うまみ調味料の供給は1909年以來うまみ調味料事業を世界的に展開してきた当社にとって、重要な課題であった。

イノシン酸およびグアニル酸の核酸系うまみ化合物は直接発酵法による生産が難しいため、RNAの酵素的分解法、グルコースからの直接発酵法(イノシン酸)、発酵法で生産したキサンチル酸を、酵素的にグアニル酸に転換する方法、発酵法で生産したヌクレオチド(イノシンおよびグアノシン)を、酵素的あるいは化学的にリン酸化してイノシン酸およびグアニル酸に転換する方法など、さまざまな方法により工業的生産されている。この中で、酵素的リン酸化法としては、イノシン-グアノシンキナーゼを用い、補酵素ATPを再生させながらイノシン酸を生成させる方法が開発されていた。

当社ではすでに *Bacillus* 属の菌によるヌクレオチド発酵生産技術を確認し、発酵法で生産したヌクレオチドを化学的にリン酸化する方法にてイノシン酸およびグアニル酸の工業生産を行っており、核酸系うまみ調味料のトップシェアを有していたが、グローバル化する市場での競争力強化は、大きな命題であった。このような状況の下、さらに優れた製法として、高度なヌクレオチドの発酵技術を活用しながら、小投資型で効率の良い酵素的リン酸化プロセスを組み合わせた新製法開発を目的として、研究に着手した。実用化にあたっては無機リン酸化合物をリン酸供与体とする新規リン酸化酵素の開発、高効率反応プロセスの確立、反応液からの精製法の開発が大きな課題であった。

2. 5'位特異的ピロリン酸-ヌクレオチドリン酸基転移酵素の探索

無機リン酸化合物によるヌクレオチドのリン酸化反応は古くから報告されており、当社でも各種リン酸化合物を用いた酵素的リン酸化法を検討してきた。最初の研究は1960年代に京都大学との共同研究によるパラニトロフェニルリン酸をリン酸供与体とする研究に始まり、次いで1970年代にポリリン酸をリン酸供与体とする研究を行った。それぞれのリン酸化合物をリン酸供与体としてリン酸化反応を触媒する活性を見いだしたものの、基質の価格や、副生物の処理、反応の位置特異性などに課題があり、いずれも実用化には至らなかった。

今回は、リン酸供与体をピロリン酸に限定して、図1に示すようにピロリン酸をリン酸供与体としてヌクレオチドをリン酸化する活性を有する菌のスクリーニングから研究を開始した。ピロリン酸は広く食品添加物としても利用されている安全な化合物であるが、ATPとほぼ同等の高い結合エネルギーを有する高エネルギーリン酸化合物でもある。また、副生するリン酸をピロリン酸に加熱重合して再利用できるという利点もある。ヌクレオチドは2'位、3'位および5'-ヌクレオチドのみであるため、スクリーニングに当たってはリン酸化反応の位置特異性が高いことを第一の指標とした。多くの菌ではリン酸化反応の位置特異性は低く、2'および3'位を副生する菌が多かったが、最終的に腸内細菌群の菌が高い5'位選択性でイノシンをリン酸化する活性を有するを見いだした。精製酵素の位置特異性は非常に高く、ヌクレオチドの5'位選択的にリン酸基を転移した。

3. 酵素改変によるリン酸基転移活性の向上

しかしながら、さらに酵素学的諸性質を調べたところ、本酵素はリン酸基転移活性を有する酸性ホスファターゼであり、生成したイノシン酸を再び脱リン酸化する活性のほうが強いいため、実用に適しない性質であることがわかった。本酵素をヌクレオチドの生産に適用するためには、脱リン酸化反応を抑え、リン酸基転移反応のみを上げるといふ、一見困難な改変が必要となった。酵素の推定反応機構から、両者の反応の違いは、リン酸基の受容体が水となるかヌクレオチドとなるかにあるため、ヌクレオチドに対する親和性を向上させることで、リン酸基転移反応の効率を上げることが可能だと考え、進化分子工学的手法による野生型酵素の改変を試みた。2ラウンドのランダム変異導入とスクリーニングの結果、高収率、高蓄積でイノシン酸を生産できる変異型酵素を得ることに成功した(図2)。

さらに、高分解能で酵素のX線結晶構造解析を行い、立体構造や一次構造の比較結果に基づく酵素の合理的改変により、グアノシンのリン酸化反応にも適用できる変異型酵素を構築することにも成功した。

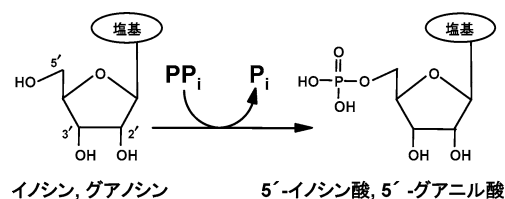


図1 5'位選択的ピロリン酸-ヌクレオチドリン酸基転移反応

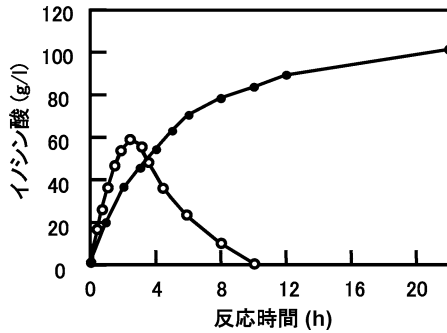


図2 野生型酵素および変異型酵素によるイノシン酸生産反応  
○, 野生型酵素発現菌; ●, 変異型酵素発現菌

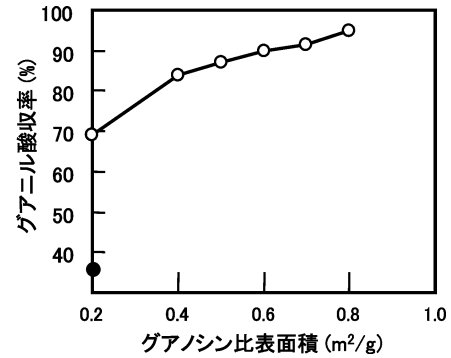


図3 グアノシンの微細化効果  
●, 親酵素発現菌; ○, 改変酵素発現菌

#### 4. 酵素反応プロセスの開発

さらなる酵素改変により、グアノシンのリン酸化反応も可能となったが、核酸系うま味調味料の需要の大部分はイノシン酸ナトリウムとグアニル酸ナトリウムを等量混合した形態のため、効率のよい生産のためには両者を一つの容器で同時に反応させることが望まれた。しかしながら、イノシンとグアノシンを混合して反応させた場合には、グアノシンの反応収率が低下したため、これらを同時にリン酸化できるように反応をうまく制御することが次の課題となった。反応プロセス検討の結果、グアノシンの反応性の低さは、グアノシンの溶解度および溶解速度に起因することが明らかになり、グアノシンの比表面積を上げることで、反応性を飛躍的に向上させることに成功した(図3)。この結果に基づいて最適反応条件を決定し、工業生産のため反応条件に合わせた反応装置の開発、設計を行った。

#### 5. 精製プロセスの開発

最後の課題は、イノシン酸、グアニル酸およびリン酸を高濃度に含む反応液からの精製プロセスの確立であった。イノシン酸ナトリウムとグアニル酸ナトリウムを混晶の形態で精製する方法としては、冷却、濃縮およびアルコール添加による晶析法、両者の混合水溶液に有機溶媒を加える晶析法、グアニル酸ナトリウムのスラリー溶液にイノシン酸ナトリウムを徐々に添加する晶析法などがすでに知られていたが、工程管理の難しさや設備投資の面からみて、実用的な技術ではなかった。そこで、簡単な工程管理および設備のもとで、安定した結晶分離性および品質で製品を得られる方法を検討し、晶析缶内液相に占める有機溶媒の割合を一定に維持しながら、イノシン酸ナトリウムとグアニル酸ナトリウムの水溶液と有機溶媒を同時に注加することで、混晶として晶析させる方法を確立した。混晶の形態で晶析することで、単独で精製したイノシン酸とグアニル酸を混合した製品より、品質的にも向上した製品が得られるようになった。

#### 6. 新製法の確立と工業化

さらに、イノシンおよびグアノシン発酵の改良、新たに構築

した非組換え酵素菌の安全性確認、製品品質と安全性の確認といった諸課題をクリアして、新規酵素的リン酸化法によるイノシン酸およびグアニル酸の工業的生産技術を確立するに至り、2003年より新技術による核酸系うま味調味料の生産が開始されている。当社はヌクレオシド発酵生産技術を確立し工業化していたが、これを酵素的にヌクレオチドに転換する技術の確立は長年の課題であった。1960年代に構想を描き、さまざまな方法を検討してきたが、最初の開発から約40年を経過して、ピロリン酸をリン酸供与体とする酵素的リン酸化法の確立に至った。今後は、本酵素の広い基質特異性を利用して、各種の5'-ヌクレオチド生産といった応用展開も期待される。

核酸系うま味調味料の世界市場は2005年度で16,000トンと推定されているが、当社は本研究の成果である新製法の導入によって、国際的な競争が高まる状況の下、高い競争力を確保し、トップシェアを維持している。核酸系うま味調味料の市場は年間7%ほどのペースで伸張を続けており、新製法による増産も期待されている。本法で生産された核酸系うま味調味料がアミノ酸系うま味調味料とともに世界の食卓を豊かにすることを祈念したい。

最後に、本研究の基盤となった菌株のスクリーニングおよび酵素学的研究は富山県立大学・工学部・生物工学研究センターの浅野泰久先生、山田秀明先生のご指導を得て行ったものであり、両先生に心より感謝いたします。大学における基盤研究の成果を企業の開発力・工業化技術によって実用化を達成した本研究は、産学連携の成功例の一つであらうととらえております。

また、本成果は、酵素の構造解析から工業化に至るまで、当社の基盤、応用研究部門および工業化部門の数多くの研究者・技術者の尽力に負うところが多かったことを付記し、ご協力いただいた共同研究者、関連部門の皆様へ深くお礼申し上げます。