



醸造微生物の細胞表層機能に関する生化学的研究とその産業応用

東北大学大学院農学研究科 阿部 敬悦

はじめに

日本の伝統的発酵産業である日本酒や醤油、味噌の醸造は、米・麦・大豆などの穀類基質に対して麹菌、乳酸菌、酵母と多様な微生物を巧みに組み合わせることで香味豊かな醸造物を製造してきた。日本独自の醸造工程の複雑さの中には、欧米で行われている発酵・醸造とは異なる工程ゆえに未知の微生物反応が存在しており、結果として特徴的な醸造物特性を示すと考えられる。醸造微生物が穀類固体基質に作用する際には、微生物細胞表層が固体基質との相互作用の場となり、基質が加水分解されて供給される糖やアミノ酸の低分子栄養を利用する場合にも細胞表層を通して行われる。筆者は、特に微生物細胞表層機能である輸送体、細胞壁、界面分子等の細胞表層因子の機能に着目し、その機能の解明と応用技術開発を行ってきた。筆者は大学卒業後にキッコーマン株式会社に奉職し、醤油の醸造微生物の研究開発に従事する過程で、日本の醸造工程の規模観、複雑さ、独自性に魅せられて、醸造における微生物反応の探索とその産業応用研究を開始した。17年間の企業勤務を経て1999年に東北大学に異動後も、醸造からの概念を拡張しつつ醸造微生物の細胞表層機能の解明とその応用研究を展開してきた。本講演ではそれらの概略を紹介する。

1. 醤油乳酸菌の輸送体の機能解析とその応用技術開発

微生物発酵生産では、細胞内代謝系の変更により生産性の向上が図られてきた。更なる生産性の向上や新規化合物の生産では、基質の菌体内取り込みや生産物の菌体外排出が律速となる事例が増えており、基質輸送能及び産物排出能の強化・変更による生産性の改善が望まれてきた。細菌では糖輸送がカタボライト抑制を引き起こし、生産の制限要因となるために抑制解除も必要となった。1990年代前半まではグラム陽性細菌のカタボライト制御機構は不明であったが、筆者は醤油乳酸菌を対象に糖輸送体・解糖系代謝制御によるカタボライト抑制解除株の育種に成功した。また発酵生産では代謝制御によりエネルギー生成に制約がある場合が多く、基質輸送・産物排出過程でエネルギーを消費せずにエネルギーを生成しつつ物質生産を高効率に行う代謝系の探索を行った。その結果、醤油乳酸菌にアスパラギン酸 (Asp) : アラニン (Ala) 交換輸送体 (AspT) を発見し、生化学的解析から産業応用までを行った。AspT が菌体外の Asp を取り込み、Asp の脱炭酸反応によって生じた Ala をプロトン勾配形成的に菌体外に排出することを証明した (図1)。AspT は Asp:Ala 交換輸送体 (AAEx) ファミリーの最初の例となった。筆者は、コリネ細菌の AAEx ファミリー輸送体 SucE1 が、コハク酸発酵におけるコハク酸排出輸送体であることも明らかにした。さらに AspT の構造と基質認識・輸送機構の解析を進めた。AspT 発現大腸菌の細胞膜より AspT を可溶性・精製を行った後に、精製 AspT を人工膜小胞に再構成して輸送の速度論解析を行った。基質アナログの Asp, Ala 輸送反応への阻

害様式の解析から、AspT は Asp, Ala に対して独立した結合部位を有することを明らかにした。また、AspT が10本の膜貫通領域 (TM) を有し、第3 TM が基質透過経路に位置することを生化学的に示した。AspT は醸造過程で Asp:Ala 交換による醤油の香味の改質に実用化されて、輸送体の産業利用の先駆的事例となった。筆者は、他にも類似反応機構のグルタミン酸 : GABA 交換輸送体の発見、シュウ酸 : ギ酸交換輸送体 (OxlT) 遺伝子の単離と OxlT の輸送に関する生化学解析を行った。

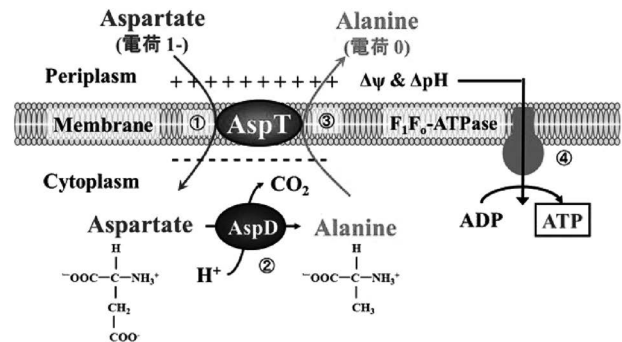


図1. 醤油乳酸菌アスパラギン酸 : アラニン交換輸送体とアスパラギン酸脱炭酸反応によるプロトン駆動力の発生

2. 産業糸状菌の産生する界面活性蛋白質の新機能の発見とその応用技術開発

大学に転出後、筆者は醸造の製麹工程と糸状菌の植物感染との類似性に着目し、生分解性ポエステル分解酵素や分解促進因子の探索を行った。麹菌 DNA マイクロアレイを利用して、生分解性のポリブチレンコハク酸コアジバート (PBSA) を固体培養基質とした際に誘導される PBSA 分解酵素及び、他の蛋白質性 PBSA 分解促進因子の探索を行った。その結果、麹菌が PBSA 固体表面に生育する際に複数の界面活性蛋白質群 (ハイドロフォビン RolA 及び新規蛋白質 HsbA) を産生することを見出した。それら界面活性蛋白質が菌体より分泌され、疎水固体表面に吸着した後に PBSA 分解酵素クチナーゼ CutL1 を特異的にリクルートし、PBSA 固体表面に分解酵素を濃縮することで PBSA 分解を促進する新奇分解機構を発見した (図2)。精製蛋白質を用いた RolA-CutL1 相互作用解析により、RolA N 末端の His, Lys 等の陽性荷電残基、CutL1 側分子表面の Asp, Glu 等の陰性荷電残基によるイオンの相互作用がリクルートの主因であることも示した。CutL1-RolA 高発現麹菌を用いた PBSA 固体発酵で、80% 以上の PBSA 分解率を達成した。従来、両親媒性のハイドロフォビンは固体培養時に菌糸細胞表層を被覆して、菌糸の固体接着と空気界面の形成に機能することが知られていた。これらの発見は、糸状菌界面活性蛋白質が固体基質に応じて界面活性蛋白質-酵素の組み合わせで多様な固体を分解する新機能を有し、自然界での感染や高分子分解過程の重要な分子機構である

ことを先駆的に提示した。本研究は、固体麹法利用の拡張性も提示した。筆者は RoLA の界面での機能を可視化解析するために、疎水化および親水化シリコン基板上での RoLA 自己組織化膜の作製法を確立し、シリコン基板上での原子間力顕微鏡 (AFM) による自己組織化膜構造の観察に成功した。界面での RoLA 機能の可視化解析を通じた RoLA 分子の界面化学的特性の把握から、表面加工などの新たな応用の可能性が広がるものと考えられる。

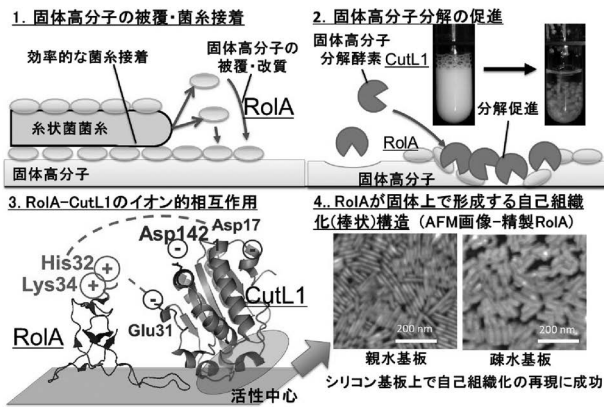


図2. 麹菌界面活性蛋白質 RoLA の固体表面での固体分解酵素のリクルートと固体表面での RoLA の自己組織化

3. 糸状菌のシグナル伝達研究から細胞表面菌糸接着因子の発見と培養技術への応用

筆者は糸状菌の細胞表面センサー及び下流シグナル伝達系の機能解明と抗真菌剤開発を目的に、二成分性情報伝達系と MAP kinase 経路のうち浸透圧経路と cell wall integrity (CWI) 経路の解析を行ってきた。真菌の細胞壁構築では、出芽酵母の CWI 経路は細胞壁多糖の β -1,3-グルカン (BG)・キチンの生合成遺伝子の転写を制御する。糸状菌の CWI 経路の解析から、出芽酵母とは異なり、糸状菌 CWI 経路は出芽酵母が有しない多糖 α -1,3-グルカン (AG) の合成酵素遺伝子の転写を制御すること、BG とキチンの合成関連遺伝子の転写は未知経路で制御されることを解明し、糸状菌と出芽酵母の CWI 経路の生物学的機能が全く異なることを一般化した。多くの真菌が AG を有するが、その生物学的機能は不明であった。筆者が糸状菌 CWI 経路による AG 生合成の制御を報告した後に、動植物感染性真菌で細胞壁表面の AG が下層の BG を被覆して、動物免疫系や植物抵抗性機構による BG 認識を回避することが海外の研究室により報告され、AG の宿主認識回避機能が示された。筆者はモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の AG 合成酵素遺伝子欠損株の細胞壁の生化学解析で AG が欠損したことを観察し、AG 欠損株が菌糸塊を作らず菌糸分散することを観察し、AG が菌糸接着因子であることを発見した。*A. nidulans* は AgsA, AgsB の 2 種の AG 合成酵素を有する。各酵素の単独高発現株より精製した AG の生化学解析から、AgsB が合成する AG は分子量 30-50 万で細胞壁表面に局在して菌糸接着に寄与し、AgsA の合成する AG は分子量 150 万で BG 下層に分布して菌糸接着への寄与が低いことを明らかにした。本成果は、低分子量 AG の細胞壁表面移行による菌糸接着機構を提示すると共に、多糖の分子量差による細胞壁空間局在機構の先駆的モデルとなった。産業糸状菌麹菌の AG 欠損株は野生型株より小さな菌糸塊を作り、液体培養では菌体が高密度化して酵素生産性に優れることを見出した。AG 欠損に加えて、細胞外マトリックス多糖 galactosaminogalactan (GAG) 合成能を欠損した AG-GAG

二重欠損株 (AG-GAG Δ) の菌糸が完全分散したことから、GAG を第 2 の菌糸接着因子と同定した。精製 GAG を AG-GAG Δ 株菌糸に添加することで GAG の菌糸凝集能を確認し、GAG の N 脱アセチル化によるアミノ基が水素結合を介して菌糸接着に働くことを解明した。AG-GAG Δ 株は野生型株、AG 欠損株に比較して高い酵素生産性を示し、AG 及び GAG を有する多くの糸状菌に両因子欠損が適用可能であることを示した。AG-GAG Δ 株はリアクターでも高い酵素生産性を示し、現在国内外に技術移転を行っている。糸状菌の菌糸接着による菌糸塊形成は産業上の大きな課題であり、菌糸接着因子の発見とその制御による菌形制御は、糸状菌発酵生産における新技術として期待されている。

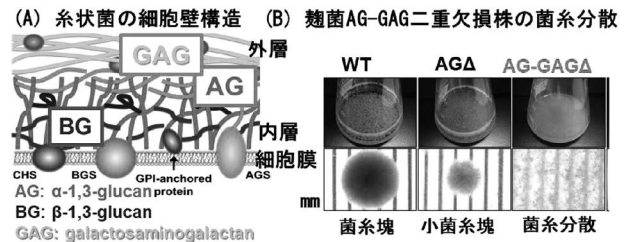


図3. 麹菌の細胞壁構造と AG-GAG 二重欠損株の菌糸分散

おわりに

微生物を利用する発酵・醸造は、農産物利用の一形態として長い歴史の中で育まれてきた。人類は植物や動物と微生物の相互作用現象の観察から学び、有用物質生産に適した微生物を選んで使いこなす大規模な産業にまで発展させた。世界を見回すと発酵や醸造プロセスは、農産物の地域性とと同じくらいに多様性に富む。それは多様で未知の微生物反応や物質の存在を示唆している。醸造は古くて新しい研究分野であり、「温故知新」の観点で見直す価値のある研究対象である。我々の先達がそうであったように、自然界に学ぶと共に生産プロセスと微生物の中に新たな反応を見出し活用することは、醸造や発酵をバイオテクノロジーとして新たな高みへと導く営みといえる。

謝辞 学生時代にご指導いただきました故・松田和雄先生 (東北大学名誉教授)、中島佑先生 (東北大学名誉教授) に御礼申し上げます。中島佑先生には東北大学での研究教育の道を開いていただくと共に、ご指導賜りましたことに重ねて御礼申し上げます。キッコーマン株式会社においてご指導・ご支援を賜りました故・吉田文彦研究本部長、内田金治グループ長他、多くの先輩・同僚に篤く御礼申し上げます。博士論文研究でご指導賜りました山崎真狩先生 (東京大学名誉教授) に心より感謝申し上げます。故・Peter Maloney 先生 (Johns Hopkins 大学教授) には輸送体研究のご指導を賜ると共に基礎研究の様々な視点を教えていただきましたことに深謝いたします。東北大学異動後、糸状菌研究で常にご支援・ご指導賜りますと共に、本賞にご推薦いただきました五味勝也先生 (東北大学教授) に篤く御礼申し上げます。本研究は東北大学農学研究科応用微生物学研究室及び分子酵素学研究室、同大学未来科学共同研究センターで、吉見啓博士 (現・京都大学准教授)、七谷圭博士 (現・東北大学助教)、山形洋平博士 (現・東京農工大学教授)、博士研究員・研究補助員・大学院生・学部生、共同研究企業の方々の協力のもとになされました。紙面の都合上、お名前をあげられなかった方々も含め、ご支援賜りました皆様に篤く御礼申し上げます。