

メタノール資化性高温メタン生成細菌によるビタミン B₁₂ 類縁体の高効率生産

成 富 隆 昭 (技術研究所)	谷 本 祐 一 (技術研究所)
岡 村 和 夫 (技術研究所)	藤 村 勇 (技術研究所)
山 口 一 (技術研究所)	南 清 司 (技術研究所)

§ 1. はじめに

ビタミン B₁₂ (シアノコバラミン, 図-1) は, 肝臓中の抗悪性貧血因子として1948年に発見された水溶性ビタミンの一種であり, 抗貧血や抗肝臓機能障害用としての医薬品および家畜などの成長促進のための飼料添加剤などに広く用いられている。しかし, ビタミン B₁₂ はその化学構造が複雑であるため化学合成が極めて難しく, 現在は微生物を用いた発酵生産法によってのみ生産されている¹⁾。

我々は通産省の大型国家プロジェクトである「水総合再生利用システムの開発」(通称: アクアルネサンス '90 計画) に参画し, メタノール含有廃水の嫌気性廃水処理に関する研究を行ってきたが, その中で研究の対象とした嫌気性微生物の中にはビタミン B₁₂ 類縁体(以下, コリノイドと称する)をその菌体内に多く含む種が存在することが近年知られるようになった。特に, メタノール資化性メタン生成細菌と呼ばれる嫌気性微生物はその菌体内にコリノイドを多く含み, しかも菌体内で合成したコリノイドの一部を菌体外へ放出するため, 連続生産に適したビタミン B₁₂ 生産菌として期待されている²⁾。

メタン生成細菌のメタン生成機構の解明は1970年代以降, 新規な補酵素の発見などによって急速な進展を見せているが, メタン生成細菌が菌体内で合成するコリノイドもメタン生成機構の中でメチル基転移反応を担う酵素の補酵素として機能しており, メタノール資化性メタン生成細菌のコリノイド含量が他のメタン生成細菌と比較して高いのも, メタノールからのメチル基転移をコリノイド酵素によって行なっているためであると考えられている³⁾⁴⁾。このようなメタン生成細菌の代謝経路の解明は, これまでメタン発酵という廃水処理技術にしか応用されていなかったメタン生成細菌が持つ新規な微生物機能を, 有用物質生産などの発酵生産や難分解性物質および有害物質の生分解などへ積極的に応用しようとする機運を高めつつある⁵⁾⁶⁾。

このような研究背景のもとに, メタン生成細菌が持つ新規な微生物機能であるビタミン B₁₂ 類縁体の生合成機能に着目した研究も試みられている。広島大学の永井らは, 中温性のメタノール資化性メタン生成細菌 *Methanosarcina barkeri* strain Fusaro (DSM804) を保持した固定床式バイオリアクターを用いて, 79 mg/l/日のビタミン B₁₂ 類縁体(コリノイド)を菌体外で生産することに成功している。また, 生産された菌体外コリノイドの約59%にビタミン B₁₂ としての活性が存在したと報告している⁷⁾。

そこで, 我々は嫌気性廃水処理の研究の対象であったメタノール資化性高温メタン生成細菌を用いた, より高効率なビタミン B₁₂ 類縁体の菌体外生産の確立を目的として, メタノール資化性高温メタン生成細菌によるビ

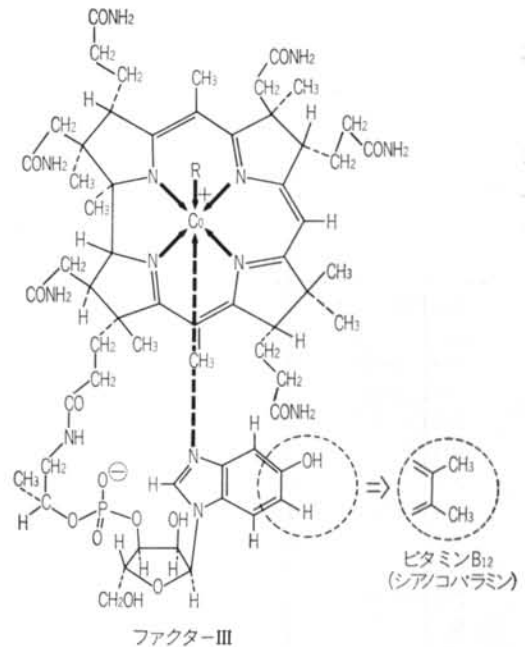


図-1 ビタミン B₁₂ とメタン生成細菌産生コリノイドの化学構造

ミン B₁₂ 類縁体 (コリノイド) の菌体外生産に関する研究を行なったので報告する。

§ 2. 実験

2.1 使用菌株

我々の研究室で保有しているメタノール資化性メタン生成細菌の分離菌株のうち、1)生育が速い、2)溶菌しにくい、3)ビタミン B₁₂ 類縁体であるコリノイドの生産量が多いなどの理由から、*Methanosarcina* sp. CHTI 55 (DSM2906) をコリノイド生産菌として用いた。このメタン生成細菌は、メタン生成の基質としてメタノールの他に酢酸、メチルアミンを利用することができ、その最適生育温度は 55°C である。また、このメタン生成細菌の大きな特徴は菌体自体が顆粒化しながら増殖することである⁸⁾。

2.2 使用培地および培養条件

回分培養試験に用いた培地には、*Methanosarcina* 属用の標準的な培地である DSM318 培地から高分子成分であるイーストエキス、トリプチケースおよび酸化還元電位の指示薬であるレザズリンを除いた改良培地を基本培地として用いた。また、生産される菌体外コリノイドの量を正確に測定するため、基本培地に添加するビタミン溶液中のビタミン B₁₂ は除くこととした。基本培地の組成を表-1 に示す。

実容積 0.6 l の硬質ガラス製バイオリアクターを用いた連続生産実験に使用した供給培地は、基本培地のメタノール濃度を 8 g/l とし、培養液の粘性上昇による発泡および菌体浮上を防止するため、消泡剤 (エイノール, Biott 社製) を 0.001% 添加したものをを用いた。

KH ₂ PO ₄	0.3 g
NaCl	0.6 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.08 g
NH ₄ Cl	1.0 g
KHCO ₃	2.0 g
メタノール	4.0 g
微量金属塩溶液 (DSM318)	10.0 ml
ビタミン溶液 (DSM141)	10.0 ml
cysteine·HCl	0.3 g
Na ₂ S·9H ₂ O	0.3 g
脱イオン水	1000 ml
pH	6.8

表-1 培地組成

回分培養試験における培養は、以下のようにして行なった。表-1 に従って調製した培地 100 ml を硬質ガラス製バイアル瓶 (実容積 150 ml) に分注し、ヘッドスペースを N₂:H₂:CO₂=80%:10%:10% の嫌気性ガスで置換後、プチルゴム栓で密栓し、オートクレーブにて 120°C で 20 分滅菌した。放冷後、ヘッドスペースガスと同組成の嫌気ガス雰囲気下の嫌気グローブボックス内で対数増殖期後期の *Methanosarcina* sp. CHTI 55 の菌体を含む培養液 1 ml を植菌した。植菌後のバイアル瓶は、55°C の恒温培養槽の中で静置培養した。メタノール資化性高温メタン生成細菌の菌体外コリノイド生産を促進する物質のスクリーニング試験では、スクリーニング物質をオートクレーブ滅菌後の培地に滅菌フィルタを用いて所定の濃度となるように添加した。培地中の Co²⁺ 濃度を上昇させるときは、硫化物イオンとの沈澱を避けるため還元剤である硫化ナトリウムを除去し、代替の還元剤としてジチオトレイトール (DTT) を 0.05 g/l となるように添加した。連続生産実験用の供給培地は、実容積 10 l のポリプロピレン製ボトルに分注後、ヘッドスペースガスを 100% N₂ とし、オートクレーブにて 120°C で 30 分滅菌したものをを用いた。

2.3 回分培養試験

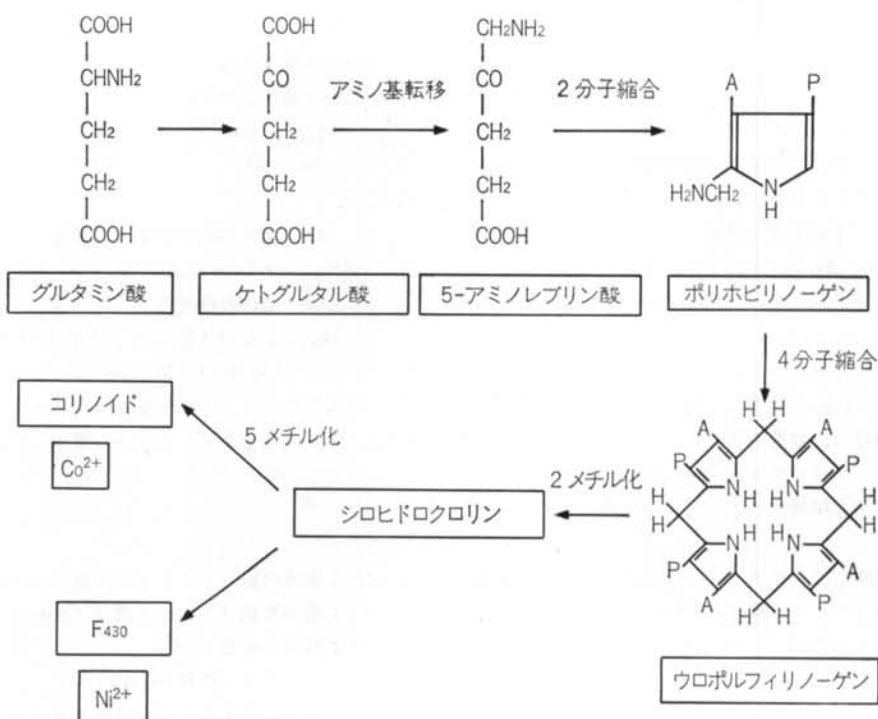
Methanosarcina sp. CHTI 55 の菌体外コリノイド生産に関する諸性質を把握し、高効率なコリノイド生産を達成するため、以下のような項目について回分培養試験を行なった。

1) *Methanosarcina* sp. CHTI 55 の菌体外コリノイド生産に及ぼす増殖基質の影響

Methanosarcina sp. CHTI 55 は、メタン生成の基質としてメタノールの他に酢酸、メチルアミンを利用することができる。本菌による菌体外コリノイド生産に適した増殖基質を決定するため、メタノール、酢酸、メチルアミンを含む基本培地で 6 世代継代培養した *Methanosarcina* sp. CHTI 55 を用い、消費基質当たりの菌体外コリノイド生産性を比較した。また、最も効率の良い菌体増殖を与える増殖基質を選定するため、各基質消費量当たりの菌体変換率も同時に検討した。

2) 菌体外コリノイド生産促進物質のスクリーニング

Methanosarcina 属は、炭素数 5 個の化合物であるグルタミン酸を初発物質とし、5-アミノレブリン酸を経てコリノイドを合成する、いわゆる C-5 経路 (five carbon pathway) によってコリノイド、その他のテトラピロール化合物を生合成するとされている⁹⁾ (図-2)。また、コリノイドのコリン環の中央には、図-1 のように配位



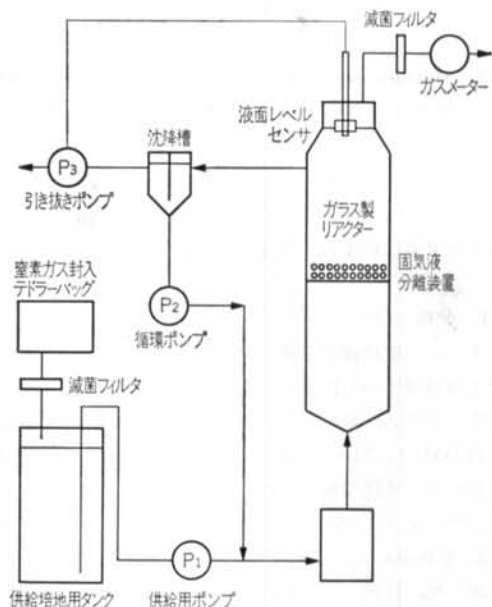
図一2 メタン生成細菌のビタミンB₁₂類縁体(コリノイド)合成経路(C-5経路)の概略
金属としてCo²⁺が配位している。

そこで、C-5経路関連物質の中からグルタミン酸、5-アミノレブリン酸(以下、ALAと略す)および配位金属であるCo²⁺に注目し、これらの物質を基本培地に種の濃度で添加し、*Methanosarcina* sp. CHTI55による菌体外コリノイド生産に及ぼす影響を検討した。また、コリノイド促進効果が確認されたC-5経路関連物質については、配位金属であるCo²⁺との同時添加によるコリノイド生産促進への相乗効果も検討した。

3) *Methanosarcina* sp. CHTI55のグルタミン酸-オキサロ酢酸アミノ基転移酵素(GOT)の活性とALA生成-グルタミン酸添加による菌体外コリノイド合成の促進効果を明確にするため、グルタミン酸を含む基本培地で6世代継代培養した*Methanosarcina* sp. CHTI55のグルタミン酸-オキサロ酢酸アミノ基転移酵素(glutamate-oxaloacetate transaminase, GOT)の活性およびALAの生成量を測定した。

2.4 連続生産試験

Methanosarcina sp. CHTI55による菌体外コリノイドの連続生産試験には、実容積0.6lの硬質ガラス製バイオリアクター(内径4.5cm×高さ38cm)を用いた。その概略図を図一3に示した。



図一3 菌体外コリノイドの連続生産実験に用いた0.6lバイオリアクターの概略図

顆粒化したメタン生成細菌の菌体を保持するため、リアクター内部の中央にはステンレス製の円形網(内径4.3cm, 3×3mm)と球形ガラスビーズ(直径7mm)を組

み合わせた固気液分離装置を設置した。嫌気性グローブボックス内において、滅菌済みのリアクターにオートクレーブ滅菌した基本培地を満たし、リアクター下部に38の湿菌体を植菌した。リアクターはグローブボックスから取り出した後、回分培養で前培養を行ない、メタノールを完全消費した時点で新鮮な供給培地を上向流で連続的に供給し、連続生産を開始した。リアクター内のメタノール濃度とpHを一定にするため、リアクター内の培養液は循環ポンプによって25ml/minで循環した。コロノイドを含む培養液は、リアクター上部に設けた液面レベルセンサに連動させたポンプによって沈降槽を介して引き抜いた。供給培地容器と発生ガスラインには滅菌フィルタを接続し、雑菌汚染を防止した。また、供給培地容器のヘッドスペースは、100%窒素ガスを満たしたテドラーバッグを接続することによって嫌気雰囲気を保った。

連続生産実験では、リアクターから引き抜いた培養液中の菌体外総コロノイド濃度、菌体外ファクターⅢ濃度、メタノール濃度を測定し、菌体外総コロノイド生産量、菌体外ファクターⅢ生産量およびメタノール消費量を求めた。また、 Co^{2+} とグルタミン酸を添加した培地を用いた連続生産実験では、リアクター内の菌体のGOT活性およびALA生成量を測定した。

2.5 *Methanosarcina* sp. CHTI55 が生産した菌体外コロノイドのビタミン B_{12} 活性

Methanosarcina sp. CHTI55 が生産した菌体外コロノイドのビタミン B_{12} 活性保有画分の割合は、ビタミン B_{12} 要求性大腸菌変異株 *Escherichia coli* 215 を用いた微生物定量法によって評価した¹⁰⁾。

2.6 分析

メタン生成細菌が生産した菌体外コロノイドは、培養液上澄み液中から抽出し、比色法によって定量した。培地中のメタノールの完全消費を確認後、100 ml の培養液を $30,000 \times G$ で10分間遠心し、上澄み液を0.45 μm の酢酸セルロース膜で濾過した。濾液100 ml に対し、0.1%のシアン化カリウムを含む200mM 酢酸バッファー(pH 4.5)を10 ml 加え、オートクレーブで120 $^{\circ}\text{C}$ 、10分加熱処理した。析出した蛋白などを再度酢酸セルロース膜で除去し、その濾液を Sep pak C_{18} カートリッジに負荷した。樹脂に保持された物質をメタノールで溶出し、ロータリーエバポレータでメタノールを蒸発、乾固させ、0.1%のシアン化カリウム水溶液5 ml (pH10)を加えてジシアノ化した¹¹⁾。培養液中の菌体外総コロノイド濃度

は、ジシアノ化したコロノイドの367 nm の吸収を測定し、そのモル吸光係数 $\epsilon_{367} = 30.4 \times 10^3 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ から式(1)を用いて算出した¹²⁾。

$$C_c = \frac{Abs_{367} \times 10^6}{\epsilon_{367} \times 20} \quad \dots\dots(1)$$

ここで、

C_c : 菌体外総コロノイド濃度 ($\mu\text{mol/l}$)

Abs_{367} : 367 nm における ジシアノ型コロノイド溶液の吸光度

ϵ_{367} : ジシアノ型コロノイドのモル吸光係数 ($30.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

また、菌体外総コロノイド生産量は、式(1)から算出した総コロノイド濃度を用いて式(2)から算出した。

$$P_c = \frac{C_c \times F}{V} \quad \dots\dots(2)$$

ここで、

P_c : 菌体外総コロノイド生産量 ($\mu\text{mol/l/d}$)

C_c : 菌体外総コロノイド濃度 ($\mu\text{mol/l}$)

F : 培地供給量 (l/d)

V : リアクター体積 (0.6 l)

メタン生成細菌が生産する完全型コロノイドであるファクターⅢは、高性能薄層クロマトグラフィー(以下、HPTLCと略す)によって分離定量した。上記のメタノール溶出液2 μl をHPTLCプレート上に負荷し、アセトン:アセトニトリル:2-プロパノール:ジエチルアミン:5%アンモニア水=30:30:10:3:27の展開溶液を用いて展開した¹³⁾。分離されたファクターⅢのスポットは、2波長フライングスポットスキャナ(CS9000, 島津製作所株式会社)で検出波長361 nmの反射吸収を測定することにより定量した。また、ファクターⅢ定量のための検量線は、*Methanosarcina* sp. CHTI55 から Thauerらの方法で分離精製したファクターⅢを用いて作成した¹⁴⁾。

Methanosarcina sp. CHTI 55 のグルタミン酸-オキサロ酢酸アミノ基転移酵素(GOT)の活性は、臨床用の簡易GOT活性測定キット(イatron社製)を用いて測定した¹⁵⁾。

また、*Methanosarcina* sp. CHTI55 による5-アミノレブリン酸(ALA)生成量は、MauzerallとGranickの方法によって測定した¹⁶⁾。

培地および培養液中のメタノール濃度は、紫外可視検出器および示差屈折検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー装置(HPLC, 分離カラム; Shodex Ionpak KC-811 \times 2本, プレカラム; KC-811 p \times 1本)によって測定し、メタノール消費量は式(3)によって算出した。

$$M = \frac{(M_{IN} - M_{OUT}) \times F}{V} \quad \dots\dots(3)$$

ここで、

M : メタノール消費量 (g/l/d)

M_{IN} : 供給培地のメタノール濃度 (g/l)

M_{OUT} : リアクター流出液中のメタノール濃度 (g/l)

菌体濃度は、あらかじめ恒量化した0.45 μmの酢酸セルロース膜を用いて培養液を濾過、乾燥させ、その重量差を乾燥菌体として評価した。

§ 3. 結果

3.1 メタノール資化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 の菌体外コリノイド生産能

メタノール資化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 を基本培地で回分培養し、比色法によって培養液上澄み液中のコリノイドの存在を確認したところ、コリノイドの特徴的な吸収である367 nmの吸収が見られ、培養液中に菌体外コリノイドが存在することが確認された。式(1)により培養液上澄み液中の菌体外の総コリノイド濃度を計算すると、その濃度は0.55 μmol/lであった。同様に、菌体外ファクターⅢをHPTLCで定量すると0.15 μmol/lであった(表-2)。

3.2 菌体外コリノイド生産に及ぼす増殖基質の影響

Methanosarcina sp. CHTI55 による菌体外コリノイド

生産への増殖基質の影響を検討するため、メタノール 125 mM, メチルアミン 125 mM, 酢酸ナトリウム 62.5 mMを含む基本培地で回分培養を行ない、培養液上澄み液中の菌体外コリノイド濃度、消費基質当たりのコリノイド生産性、乾燥菌体当たりのコリノイド生産性を比較した。また、消費基質当たりの菌体収率を求めることにより、最も効率の良い菌体増殖を与える基質についても検討した。結果を表-2に示した。

メタノールを基質とした培養液の上澄み液中には0.55 μmol/lのコリノイドが存在し、その消費基質当たりの菌体外コリノイド生産性、乾燥菌体当たりの菌体外コリノイド生産性は、それぞれ4.2(μmol/mol メタノール), 1.3(μmol/g dry cell)であったが、メチルアミンおよび酢酸を基質とした培養液の上澄み液中のコリノイド濃度、消費基質当たりの菌体外コリノイド生産性および乾燥菌体当たりの菌体外コリノイド生産性はメタノール培養の値よりも低く、それぞれ0.35 μmol/l, 0.11 μmol/l, 2.8(μmol/mol メチルアミン), 1.7(μmol/mol 酢酸), 0.7(μmol/g dry cell in メチルアミン培地), 1.1(μmol/g dry cell in 酢酸培地)であった。

消費基質当たりの菌体収率は、メチルアミン培養によるものが13%と最も優れており、メタノール培養では10.5%、酢酸培養では2.5%であった。しかし、メチルアミン培養では回分培養終了時の培養液のpHが遊離のアモニア生成のため10以上となるため、培養中のpH制御が困難になることが予想された。メタノールを基質とした回分培養は、他の二つの物質を基質としたときよりも消費基質当たりのコリノイド生産性および菌体当

基 質	菌体外総コリノイド濃度 (μM)	消費基質当たりの菌体外コリノイド生産性 (μmol/mol 基質)	乾燥菌体当たりの菌体外コリノイド生産性 (μmol/g dry cell)	菌体収率 (g dry cell/g 基質)
メタノール	0.55	4.2	1.3	0.105
メチルアミン	0.35	2.8	0.7	0.13
酢 酸	0.11	1.7	1.1	0.025

表-2 菌体外コリノイド生産に及ぼす増殖基質の影響

添加物質	濃 度	菌体外コリノイド			
		菌体外総コリノイド濃度 (μM)	無添加系との相対値	菌体外ファクターⅢ濃度 (μM)	無添加系との相対値
無添加	—	0.55	1.0	0.15	1.0
Co ²⁺	40 μM	0.78	1.4	0.15	1.0
グルタミン酸	10 mM	0.90	1.6	0.16	1.07
ALA	2 mM	1.50	2.7	0.17	1.13
Co ²⁺ +グルタミン酸	40 μM+10 mM	1.20	2.2	0.16	1.07
Co ²⁺ +ALA	40 μM+0.1 mM	3.90	7.1	0.17	1.13

表-3 菌体外コリノイド生産に対する Co²⁺, グルタミン酸, ALA の影響

りのコリノイド生産性が優れており、また消費基質当たりの菌体収率もメチルアミンを基質とした回分培養とほぼ同等であることから、以後の回分培養試験および連続生産実験はメタノールを増殖基質として行なった。

3.3 菌体外コリノイド生産促進物質のスクリーニング

メタノール資化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHT155 が持つコリノイド合成経路である C-5 経路に関与する物質のうち、グルタミン酸、ALA および配位金属である Co^{2+} に注目して、これらの物質の菌体外コリノイド生産への促進効果について検討した。各物質の検討濃度範囲は Co^{2+} が 1, 10, 20, 30, 40, 50, 100 μM 、グルタミン酸が 1, 10, 50 mM、ALA が 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mM である。結果を表-3 に示した。

Co^{2+} 、グルタミン酸および ALA には、無添加系と比較して菌体外総コリノイド生産を促進する効果が認められた。 Co^{2+} 添加においては、菌体外総コリノイド濃度は Co^{2+} 40 μM 添加時に最大となり、その濃度は無添加系の 1.4 倍 (0.78 $\mu\text{mol/l}$) となった。 Co^{2+} を 50 μM 添加するとメタノール消費速度に阻害が見られ、また Co^{2+} を 100 μM 添加した系では菌体増殖は完全に阻害された。グルタミン酸は 10 mM 添加時に最大の菌体外総コリノイド濃度が得られ、無添加系の 1.6 倍 (0.9 $\mu\text{mol/l}$) となった。50 mM のグルタミン酸添加では、グルタミン酸 10 mM 添加時と菌体外総コリノイド濃度に相違は認められなかったが、菌体増殖とメタノール消費速度は無添加系と比較して遅くなった。ALA 添加による菌体外総コリノイド濃度は 2 mM 添加時に最大となり、その濃度は無添加系の 2.7 倍 (1.5 $\mu\text{mol/l}$) であった。

菌体外コリノイド生産を促進した物質のうち、グルタミン酸と ALA について、コリノイドの配位金属である Co^{2+} との同時添加による菌体外コリノイド生産への促進効果を検討した。検討濃度を Co^{2+} で 1, 10, 20, 30, 40, 50 μM 、グルタミン酸で 1, 10, 50 mM、ALA で 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mM とし、これらの濃度を組み合わせて回分培養で検討を行なった。その結果、 Co^{2+} とグルタミン酸の組み合わせでは 40 μM の Co^{2+} と 10 mM のグルタミン酸の同時添加時、 Co^{2+} と ALA の組み合わせでは 40 μM の Co^{2+} と 0.1 mM の ALA の同時添加時に菌体外コリノイド濃度の極大値が得られ、その濃度は無添加系と比較してそれぞれ 2.2 倍 (1.2 $\mu\text{mol/l}$) および 7.1 倍 (3.9 $\mu\text{mol/l}$) となった。

回分培養によるスクリーニング試験では、菌体外ファクターⅢ濃度は Co^{2+} 、グルタミン酸、ALA 添加などによっても無添加系と有意な差は認められず、 Co^{2+} とグ

ルタミン酸および ALA の同時添加によっても無添加系とほぼ同様な値にとどまり、上記物質による菌体外ファクターⅢ生産の促進は認められなかった。

3.4 連続生産実験

メタノール資化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHT155 による菌体外コリノイドの連続生産実験では、基本培地の供給による菌体外コリノイド生産性の把握と、スクリーニングされた菌体外コリノイド生産促進物質 (Co^{2+} 、グルタミン酸、ALA) を用いた連続生産における菌体外コリノイド生産性向上の確認を目的とした。

回分培養試験でスクリーニングされた物質の菌体外コリノイド生産促進効果の確認は、一定菌体濃度に達したリアクターに基本培地および菌体外コリノイド生産促進物質を添加した 3 種の培地 (40 μM Co^{2+} 添加培地、40 μM Co^{2+} +10 mM グルタミン酸添加培地、40 μM Co^{2+} +0.1 mM ALA 添加培地) を供給し、同一メタノール消費量時の菌体外総コリノイド生産量を比較することによって行なった。その結果を図-4 に示した。

基本培地供給による菌体外コリノイドの連続生産では、リアクター中の菌体濃度はメタノール消費量の増加に伴って増加し、最終的に 8 l/日の供給量で 59 g dry cell/l となった。菌体外総コリノイド生産量もメタノール消費量に伴って増加したが、その生産量はメタノール消費量 106.7 g/l/日において 7.8 $\mu\text{mol/l/日}$ であった。

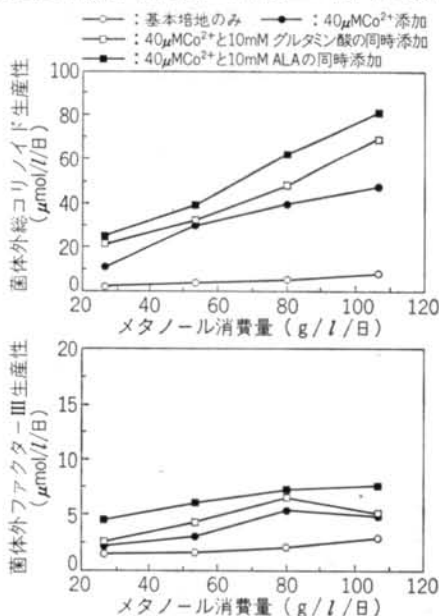


図-4 バイオリアクターによる菌体外コリノイドの連続生産

回分培養試験で菌体外コロノイド生産に促進効果の認められた Co^{2+} , グルタミン酸, ALA を添加した培地による連続生産実験では, 無添加の基本培地と比較してより高い菌体外総コロノイド生産量が得られた. $40 \mu\text{M}$ の Co^{2+} を添加した培地を用いた連続生産では, リアクター中の菌体濃度は 58 から 64 g dry cell/l でほぼ一定であり, 菌体外総コロノイド生産量はメタノール消費の増加に伴って 10.9 から $48 \mu\text{mol/l}$ /日まで増加した. また, $40 \mu\text{M}$ の Co^{2+} と 10 mM のグルタミン酸を同時添加した培地および $40 \mu\text{M}$ の Co^{2+} と 0.1 mM の ALA を同時添加した培地を用いた連続生産では, 菌体濃度は $60 \sim 62, 59 \sim 64 \text{ g dry cell/l}$ であり, メタノール消費量 106.7 g/l /日において菌体外総コロノイド生産量は $69 \mu\text{mol/l}$ /日および $82 \mu\text{mol/l}$ /日となった.

基本培地, $40 \mu\text{M}$ の Co^{2+} 添加培地, $40 \mu\text{M}$ の Co^{2+} と 10 mM のグルタミン酸を同時添加した培地および 40

培養条件	メタノール消費量 (g/l/日)	GOT 活性 (Abs./100 mg dry cell)
基本培地による回分培養	—	0.099
$40 \mu\text{M}$ Co^{2+} 添加培地による回分培養	—	0.105
10 mM グルタミン酸添加培地による回分培養	—	0.680
$40 \mu\text{M}$ Co^{2+} と 10 mM グルタミン酸同時添加培地による回分培養	—	0.745
基本培地による連続培養	53.3	0.090
	80.0	0.092
	106.7	0.090
$40 \mu\text{M}$ Co^{2+} 添加培地による連続培養	53.3	0.097
	80.0	0.110
	106.7	0.093
$40 \mu\text{M}$ Co^{2+} と 10 mM グルタミン酸同時添加培地による連続培養	53.3	1.360
	80.0	1.000
	106.7	0.560

表一四 回分培養試験および連続生産実験における *Methanosarcina* sp. CHTI55 の GOT 活性

培養条件	培養液中の ALA 濃度 (μM)	菌体収率 (g dry cell/g methanol)
基本培地による回分培養	3.1~3.9	0.092
10 mM グルタミン酸添加培地による回分培養	11.6~16.9	0.093

表一五 *Methanosarcina* sp. CHTI55 による ALA 生成へのグルタミン酸の影響

μM の Co^{2+} と 0.1 mM の ALA を同時添加した培地を用いた連続生産実験では, メタノール消費量が増加しても, 菌体外ファクターⅢ生産量は 3.0 から $7.5 \mu\text{mol/l}$ /日と低い値にとどまった.

3.5 *Methanosarcina* sp. CHTI55 のグルタミン酸一オキサロ酢酸アミノ基転移酵素 (GOT) の活性と ALA 生成

回分培養試験により, グルタミン酸はメタノール酸化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 による菌体外コロノイド生産を促進することが確認された. グルタミン酸はコロノイド合成経路である C-5 経路の初発物質とされており, 図一2からも分かる通り, アミノ基転移酵素によってケトグルタル酸へ変換されるといわれている. そこで, メタノール酸化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 の菌体内で, この反応に関与する酵素であるグルタミン酸一オキサロ酢酸アミノ基転移酵素 (glutamate-oxaloacetate transaminase, GOT) の酵素活性を, 回分培養菌体および連続生産実験のリアクター内の菌体について測定した. 結果を表一4に示した.

回分培養試験では, 基本培地で6世代継代培養した菌体の GOT 活性は, $40 \mu\text{M}$ の Co^{2+} を添加した基本培地で同世代継代培養した菌体の GOT 活性とほぼ同様であったが, 10 mM のグルタミン酸を添加した培地で6世代継代培養した *Methanosarcina* sp. CHTI55 の GOT 活性は, 基本培地で6世代継代培養したものよりも6.8倍高い GOT 活性を示した.

$40 \mu\text{M}$ の Co^{2+} と 10 mM のグルタミン酸を同時添加した培地による回分培養では, その GOT 活性は7.5倍となった. また, Co^{2+} とグルタミン酸を同時添加した培地による連続生産実験でのリアクター内菌体の GOT 活性も, 基本培地で培養した菌体より6~14倍高い値を示した.

10 mM のグルタミン酸を添加した基本培地で6世代継代培養した *Methanosarcina* sp. CHTI55 の培養液中の ALA 濃度を表一5に示した. グルタミン酸添加培地で継代培養した本菌の培養液中の ALA 濃度は $11.6 \sim 16.9 \mu\text{M}$ となり, 無添加系の $3.1 \sim 3.9 \mu\text{M}$ と比較して3~5.4倍高い値を示した.

3.6 *Methanosarcina* sp. CHTI55 の生産した菌体外コロノイドのビタミン B_{12} 活性

Methanosarcina sp. CHTI55 が生産する完全型コロノイド, すなわちファクターⅢの化学構造は, 現在医薬

培養条件	培養に使用した培地	菌体外総コリノイド量に占めるビタミンB ₁₂ 活性保有画分の割合 (%)
回分培養	基本培地	26.9
	40 μM Co ²⁺ 添加培地	24.6
	10 mM グルタミン酸添加培地	22.6
	2 mM ALA 添加培地	29.5
連続培養	基本培地	24.2~26.5
	40 μM Co ²⁺ 添加培地	26.0~45.2
	40 μM Co ²⁺ +10 mM グルタミン酸添加培地	29.4~36.3
	40 μM Co ²⁺ +0.1 mM ALA 添加培地	52.1~68.1

表一六 菌体外コリノイド中のビタミンB₁₂活性保有画分の割合

品などで用いられている一般的なビタミンB₁₂であるシアノコバラミンの化学構造と極めて類似しているが、下方配位子であるイミダゾール塩基の構造が異なっている(図一1)。現在、ファクターⅢとシアノコバラミンの医薬品としての生理活性の相違については知られていないが、メタン生成細菌が生産する菌体外コリノイドにシアノコバラミンと同様の生理活性が存在すれば、メタン生成細菌はビタミンB₁₂生産菌としてより有望となると考えられる。そこで、今回の回分培養試験と連続生産実験で得られた菌体外コリノイドのビタミンB₁₂活性を、ビタミンB₁₂要求性大腸菌変異株 *E. coli* 215を用いた微生物定量法によって測定し、生産された全菌体外コリノイド中のビタミンB₁₂活性保有画分の割合を調べた。結果を表一六に示した。

基本培地による回分培養で得られた菌体外コリノイド(0.55 μmol/l)は、その26.9%(0.15 μmol/l)がビタミンB₁₂としての活性を有していた。また、40 μMのCo²⁺、10 mMのグルタミン酸、2 mMのALA添加による回分培養で得られた菌体外コリノイドは、その中の24.6%(0.19 μmol/l)、22.6%(0.20 μmol/l)、29.5%(0.44 μmol/l)にビタミンB₁₂活性が存在した。40 μMのCo²⁺と10 mMのグルタミン酸の同時添加、および40 μMのCo²⁺と0.1 mMのALAの同時添加による回分培養で得られた菌体外コリノイドは、それぞれの物質の単独添加時よりもやや高いビタミンB₁₂活性を示し、その値は30.8%(0.37 μmol/l)、45.0%(1.75 μmol/l)であった。連続生産実験で得られた菌体外コリノイドのビタミンB₁₂活性は、基本培地培養で24.2~26.5%、Co²⁺添加培地培養で26.0~45.2%、Co²⁺とグルタミン酸添加培地培養で29.4~36.3%、Co²⁺とALA添加培地培養で

52.1~68.1%であった。

§ 4. 考察

メタノール資化性高温メタン生成細菌である *Methanosarcina* sp. CHTI55 は、メタノールを基質とした基本培地による回分培養によって、その培養液上澄み液中にビタミンB₁₂類縁体であるコリノイドを生産した。また、その生産量は0.55 μmol/lであった。本菌に限らずメタン生成細菌は、メタン生成反応を生育のためのエネルギー獲得系としているが、メタノール資化性メタン生成細菌によるメタン生成反応にはメチル基転移酵素としてコリノイド酵素が関与しているため、本菌もコリノイドを生合成する機能を有していたものと考えられた。

Methanosarcina sp. CHTI55 はメタノールの他にもメチルアミン、酢酸を利用してメタンを生成することができるが、本菌による菌体外コリノイド生産において、最も高い菌体外コリノイド生産性を与えた増殖基質はメタノールであった。この結果も、本菌によるメタノールからのメタン生成にコリノイド酵素が関与しているためであると考えられ、メタノール利用のために他の基質よりもより多くのコリノイドを菌体内で合成したため、コリノイド生産性が高まったものと推定された。

回分培養試験による菌体外コリノイド生産促進物質のスクリーニング試験では、コリノイドの配位金属であるCo²⁺およびC-5経路関連物質であるグルタミン酸、ALAの添加によって、菌体外総コリノイド生産は無添加系と比較して1.4倍から2.7倍促進された。これは、*Methanosarcina* sp. CHTI55のコリノイド合成がC-5経路を介して行なわれることを示すものであり、グルタミン酸、ALAの添加によって菌体外コリノイド生産が促進されたのは、C-5経路に関与する各酵素反応がそれぞれの物質添加によって活性化されたことによるものと考えられた。また、コリノイドの配位金属であるCo²⁺とC-5経路関連物質であるグルタミン酸、ALAを同時添加すると、各物質の単独添加時よりも高いコリノイド生産性が得られ、菌体外コリノイド生産促進物質の同時添加による相乗的な生産促進効果が認められた。スクリーニング試験において、ALAは他の物質と比較して菌体外コリノイド生産を促進する効果が高い傾向が認められたが、これはメタン生成細菌の菌体内においてグルタミン酸がアミノ酸合成や菌体合成経路などにも利用されるのに対し、ALAはコリノイド合成経路であるC-5経路の中でテトラピロール環を合成するための直接的な前

駆体として利用されるため、コリノイドの生合成を容易に促進するものと考えられた。

回分培養試験によるスクリーニング試験では、10 mM のグルタミン酸添加によって菌体外コリノイド濃度は無添加系の 1.6 倍高い値を示したが、グルタミン酸はメタン生成細菌の菌体内でアミノ酸合成や菌体合成にも関与しているため、どの程度コリノイド合成促進に寄与しているのかは明確ではない。そこで、その促進機構を解明するため 10 mM のグルタミン酸を添加した基本培地で 6 世代継代培養した *Methanosarcina* sp. CHTI55 の GOT 活性と ALA 生成量を測定することにより、C-5 経路の一連の酵素反応促進へのグルタミン酸の寄与の度合いを調べた。グルタミン酸添加培地で継代培養した本菌の GOT 活性は、基本培地のみで同世代継代培養したものよりも 6.8 倍高い値を示した。これは、C-5 経路の第一反応であるグルタミン酸-オキサロ酢酸アミノ基転移反応が、グルタミン酸添加によって活性化されていることを示している。また、グルタミン酸添加培地で培養した本菌の ALA 生成量が、基本培地で培養したものよりも 3 倍から 5.4 倍高いことから、グルタミン酸添加によって C-5 経路中のグルタミン酸からケトグルタル酸、ケトグルタル酸から ALA という一連の酵素反応が活性化されていることが推定された。

実容積 0.6 l のバイオリクターを用いた連続生産実験では、グルタミン酸と ALA をコリノイドの配位金属である Co^{2+} とともに同時添加した培地を用いて、各生産促進物質の菌体外コリノイド生産促進効果が確認された。連続生産実験では、同一メタノール消費量における菌体外総コリノイド生産量は、基本培地単独よりも 40 μM の Co^{2+} 添加培地を用いたほうが高く、また 40 μM の Co^{2+} に 10 mM のグルタミン酸、0.1 mM の ALA を同時添加したほうがより高い結果となった。特に、40 μM の Co^{2+} と 10 μM のグルタミン酸を添加した培地を用いて得られた菌体外コリノイド生産性 69 $\mu\text{mol}/\text{l}/\text{日}$ と、40 μM の Co^{2+} と 0.1 mM の ALA を添加した培地を用いて得られた菌体外コリノイド生産性 82 $\mu\text{mol}/\text{l}/\text{日}$ は、シアノコバラミンに換算すると約 93 mg/l/日および 111 mg/l/日となり、メタン生成細菌を用いた菌体外コリノイド生産でこれまでに報告されている生産量の中で最大の値となった。

メタノール資化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 の生産した菌体外コリノイド中のビタミン B_{12} 活性保有画分の割合をビタミン B_{12} 要求性大腸菌変異株 *E. coli* 215 を用いて評価したところ、その値は培養条件によって多少異なるものの、菌体外総コリノ

イド生産量のおよそ 23~68% に当たるコリノイド画分がビタミン B_{12} 活性を有していた。広島大学の永井らは、メタノール資化性中温メタン生成細菌 *Methanosarcina barkeri* が生産した菌体外コリノイド 6.8 mg/l 中には 4 mg/l のビタミン B_{12} 活性保有画分が存在したと報告している⁷⁾。つまり、生産された菌体外コリノイドの 59% に当たるコリノイド画分がビタミン B_{12} 活性を有していたことになる。高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 を用いて得られた菌体外コリノイドのビタミン B_{12} 活性保有画分の割合と、中温メタン生成細菌 *Methanosarcina barkeri* の生産した菌体外コリノイドのビタミン B_{12} 活性保有画分の割合が異なる原因として考えられるのは、*Methanosarcina* sp. CHTI55 の生産する菌体外ファクターⅢ生産量が中温菌と比較して低いことや、不完全型コリノイドと呼ばれる下方配位子が欠落したコリノイド、特にコビンアミドと呼ばれる不完全型コリノイドの生産量の違いによるものと思われた⁷⁾。

§ 5. 結論

メタノール資化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 を用いたビタミン B_{12} 類縁体（コリノイド）の高効率生産の研究について要約すると、以下のとおりである。

(1)メタノール資化性高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 は、菌体外にビタミン B_{12} 類縁体であるコリノイドを生産した。また、その生産にはメタノールが増殖基質として最適であった。

(2) Co^{2+} 、グルタミン酸、5-アミノレブリン酸 (ALA) は、メタノール資化性高温メタン生成細菌による菌体外コリノイド生産を促進する効果があることを確認した。また、 Co^{2+} とグルタミン酸、 Co^{2+} と ALA の同時添加は、各物質の単独添加時よりも高い菌体外コリノイド生産促進性を示した。

(3)バイオリクターを用いた連続生産においても、スクリーニングされた物質の菌体外コリノイド生産促進効果が確認され、コリノイド生産促進物質を添加した培地を用いて最大 82 $\mu\text{mol}/\text{l}/\text{日}$ という高い菌体外コリノイド生産性が得られた。

(4)メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. CHTI55 が生産した菌体外コリノイドの約 23~68% にビタミン B_{12} としての活性が存在することが確認された。

本研究の今後の課題としては、メタン生成細菌の生産する菌体外コリノイドのビタミン B_{12} としての生理活性

をさらに向上させることが重要である。現在、我が国ではビタミン B₁₂ 原体の製造メーカーはなく全量を輸入に依存しており、その国産化技術が望まれている。また、現在工業生産に利用されているビタミン B₁₂ 生産菌は生産物阻害の存在、高価な培養基質、B₁₂ 抽出工程の煩雑さなどの欠点があり、依然その生産は回分培養法によっ

ているのが現状である。メタン生成細菌によるビタミン B₁₂ の高効率な連続生産法が確立されれば、メタン生成細菌の新規な微生物機能を利用した発酵生産技術の開発につながるものと考えられ、メタン生成細菌のコリノイド合成経路の解明を含めて、今後の研究の進展が期待される。

<参考文献>

- 1) 相田浩：“応用微生物学” 同文書院（1967年）pp.189~190
- 2) J. Krzycki & J. G. Zeikus：“Quantification of Corrinoids in Methanogenic Bacteria” *Current Microbiology*, Vol. 3 (1980) pp. 243~245
- 3) P. E. Rouviere & R. S. Wolfe：“Novel Biochemistry of Methanogenesis” *J. of Biological Chemistry*, Vol. 263 (1988) pp. 7913~7916
- 4) P. Van der Meijden, H. J. Heythuysen, A. Pouwels, F. Houwels, C. Van der Drift & G. D. Vogels：“Methyltransferases Involved in Methanol Conversion by *Methanosarcina barkeri*” *Archives of Microbiology*, Vol. 134 (1983) pp. 238~242
- 5) U. E. Krone & R. K. Thauer：“Reductive Dehalogenation of Chlorinated C₁-hydrocarbons Mediated by Corrinoids” *Biochemistry*, Vol. 28 (1989) pp. 4908~4914
- 6) 永井史郎, 西尾尚道：“メタン生成細菌による有用物質生産” *バイオインダストリー* Vol. 5 (1988年) pp. 190~200
- 7) T. K. Mazumder, N. Nishio, S. Fukuzaki & S. Nagai：“Production of Extracellular Vitamin B-12 Compounds from Methanol by *Methanosarcina barkeri*” *Applied Microbiology & Biotechnology*, Vol. 26 (1987) pp. 511~516
- 8) J. P. Touzel, D. Petroff & G. Albagnac：“Isolation and Characterization of a New Thermophilic *Methanosarcina*, the Strain CHTI55” *Systematic & Applied Microbiology*, Vol. 6 (1985) pp. 66~71
- 9) P. Scherer., V. Hollriegel., C. Krug, M. Bokel & P. Renz：“On the Biosynthesis of 5-hydroxybenzimidazolylcobamide (Vitamin B₁₂-Factor III) in *Methanosarcina barkeri*” *Archives of Microbiology*, Vol. 138 (1984) pp. 354~359
- 10) 福井三郎, 山田良平, 上久保正, 林光則, 清水祥一, 佐藤一精, 鈴木不二男, 奥田邦雄, 内山幸信：“ビタミンと補酵素(下) (生化学実験講座)” 東京化学同人 (1975年) pp. 426~479
- 11) 佐藤一精：“ビタミン B₁₂ の定量法” *ビタミン* Vol. 57 (1983年) pp. 609~616
- 12) C. Gianotti：“Electronic Spectra of B12 and Related Systems” *Wiley* (1982) pp. 393~400
- 13) G. Szepesi & J. Molnar：“Improved Quantitative Thin-layer Chromatographic Method for the Seraration of Cobalamin Derivatives” *Chromatographia*, Vol. 14 (1981) pp. 709~711
- 14) H. Gilles & R. K. Thauer：“Uroporphyrinogen III, an Intermediate in the Biosynthesis of the Nickel-containing Factor F₄₃₀ in *Methanobacterium thermoautotrophium*” *European J. of Biochemistry*, Vol. 135 (1983) pp. 109~112
- 15) M. Yamaguchi, J. Hake, Y. Tanimoto, T. Naritomi, K. Okamura & K. Minami：“Enzyme Activity for Monitoring the Stability in a Thermophilic Anaerobic Digestion of Wastewater Containing Methanol” *J. of Fermentation & Bioengineering*, Vol. 71 (1991) pp. 264~269
- 16) D. Mauzerall & S. Granick：“The Occurrence and Determination of β -aminolevulinic Acid and Porphobilinogen in Urine” *J. of Biological Chemistry*, Vol. 219 (1956) pp. 435~446