



Direct isopropanol production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* using a synthetic pathway and a cell surface display system

合成代謝経路と細胞表面工学を利用した
組換え大腸菌によるセロビオースからのイソプロパノール生産

(JBB, Vol. 114, No. 1, 80–85, 2012)

相馬 悠希¹・猪熊健太郎^{1a}・田中 勉²・荻野 千秋²・
近藤 昭彦²・岡本 正宏¹・花井 泰三^{1*}

バイオリファイナリーは、バイオマスを原料にさまざまな有用化合物を生産する技術であり、石油代替資源としてのバイオマス利用の中核としてその実現が期待されている。特に近年では、異種生物由来の遺伝子を組み合わせ人工的に構築した“合成代謝経路”を用いることで、生産可能な有用化合物の種類が急速に拡大している。筆者らは、次世代バイオアルコールとしてイソプロパノールに着目し、大腸菌におけるイソプロパノール生産経路の開発とその生産性向上に取り組み、グルコースを基質とした流加培養において工業生産水準に堪える生産量を達成し、これを2010年にJBBに報告した^{1,2)}。

しかし、バイオリファイナリーの真の実現に向けては、その要となるバイオマスの糖化プロセスと微生物を利用した発酵プロセスにおけるコスト削減、省エネルギー化が不可欠である。これまで、京都大学大学院農学研究科・植田充美教授、神戸大学自然科学系先端融合研究環・近藤昭彦教授らの研究グループは、バイオマス糖化プロセスとそれに続く発酵プロセスの統合による一貫したプロセス効率化を目指して、発酵プロセスを担う多様な工業用微生物におけるタンパク質細胞表面提示系の開発を行ってきた。この技術は、細胞壁に共有結合するアンカータンパク質と任意のタンパク質を遺伝子工学的に融合することで、生きた微生物の細胞表面にタンパク質を提示するものである。これを利用して多糖類分解酵素群を細胞表面に提示することで、微生物が本来は資化することのできない多糖類やオリゴ糖からの直接発酵が可能となる。実際に同グループは、セルラーゼ表面提示酵母を用いてセルロースからのエタノール直接発酵を実現している³⁾。

本研究では、近年急速に開発が進む合成代謝経路と細胞表面提示系の融合を目指し、大腸菌におけるβ-グルコシダーゼ (BGL) 表面提示によるセロビオースからの直接的なイソプロパノール生産を試みた。セロビオースは、セルロース分解産物として得られるもっとも単純なオリゴ糖である。一方、BGLは、セロビオース分子内のβ1,4結合を切断し、2分子のグルコースまで分解するために必要な加水分解酵素であり、セルロース直接利用の最終ステップを担う重要な酵素である。これまでに

多くの合成代謝経路が構築されている大腸菌において、セロビオースからの直接的な目的物質生産が可能となれば、バイオマス分解物の有効利用に大きなインパクトを与えると考えられる。

大腸菌におけるBGL表面提示系を確立するため、さまざまな生物種由来のBGLと大腸菌由来のアンカータンパク質の融合タンパク質を構築し、大腸菌細胞表面でのBGL活性を評価した結果、*Thermobifida fusca*由来のBGLを大腸菌由来の外膜リポタンパク質であるBlcをアンカータンパク質として用いた場合に細胞表面で高い活性を示すことが明らかになった⁴⁾。

このBGL表面提示系をイソプロパノール生産大腸菌に導入し、グルコースを基質としてイソプロパノール生産実験を行ったところ、BGL表面提示大腸菌は通常のイソプロパノール生産大腸菌と同等の菌体増殖、グルコース資化性、イソプロパノール生産性を示した。次に、セロビオースを基質としてイソプロパノール生産実験を行った結果、BGL表面提示系を導入したイソプロパノール生産株は、139 mM (50 g/L) のセロビオースを基質として直接的に資化し、21 hに69 mMのイソプロパノールを生産した。この際、セロビオース分解産物であるグルコースが培地中から検出されることはなく、生成したグルコースは直ちに大腸菌によって資化されたものと考えられる。大腸菌においてセルロース由来のオリゴ糖を直接発酵し、イソプロパノールの生産に成功したのは本研究が初めてである。本研究によって、タンパク質細胞表面提示系と合成代謝経路を用いた一貫バイオプロセスの実現に向け、新たな可能性が示された。今後は、BGLのみならずセルロース直接資化に必要な酵素群の複合表面提示系が、さまざまな合成代謝経路構築がなされている微生物において確立され、バイオリファイナリー実現に寄与することを期待したい。

- 1) Hanai, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 7814 (2007).
- 2) Inokuma, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 696 (2010).
- 3) Yanase, S. *et al.*: *Biotechnol. J.*, **5**, 449 (2010).
- 4) Tanaka, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6265 (2011).

* 著者紹介 ¹九州大学大学院農学研究科生物機能科学部門 (准教授) E-mail: taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

²神戸大学工学部, ^{1a}現高機能遺伝子デザイン技術研究組合