

合成生物学的手法を用いた化学品製造微生物の育種

西 達也

近年バイオプロセスを用いた有機化学品製造の研究開発と事業化が世界的に活発になっている。一般有機化学品の多くは元来微生物が生産しない非天然型化学物質であることから、バイオプロセスを用いて安価に製造することは容易ではない。最近注目されている合成生物学的手法は、一般化学品のバイオプロセス製造に大いに活用できるものと思われる。本稿では、化学品のバイオプロセス製造のトレンドと課題について概説するとともに、その課題解決法として合成生物学的手法を用いた微生物の育種が役立つことを筆者らの開発事例も交えて紹介したい。

バイオプロセス技術による有用物質生産の推移

グリーンケミストリーとバイオプロセス 2000年頃までは、微生物や酵素を利用した物質生産の対象は、アミノ酸や抗生物質など生物が元来生産する物質に加えて、医薬合成中間体などの比較的高価な化学品であった。一方、環境問題の解決に関しては、省エネルギーや危険な廃棄物の排出の減少という「グリーンケミストリー」の思想から、微生物やバイオ触媒を用いたバイオプロセス生産や廃棄後土壌中で分解される生分解性プラスチックの開発が主流であった。

バイオマスからの化学品の製造 2000年代に入り、化石資源の枯渇に焦点が向けられ、バイオエタノールなどの「バイオ燃料」の生産すなわちバイオマス資源からのエネルギー生産の研究が盛んになった。また、微生物を利用した物質生産に関しては、「バイオ」という語は、微生物・酵素という意味が込められていたが、バイオマスを意味するようになった。事実、バイオマスから化学的処理によって生産された燃料に関しても「バイオ燃料」と呼んでいる。バイオ燃料の場合、燃料として用いたときに得られるエネルギー量が製造に投入したエネルギー量より少ない場合があり、「バイオ燃料が真に環境にやさしいかどうか」という疑問も出されている。

一方で、近年研究が盛んになってきたバイオマスからの化学品の製造に関しては、得られた製品を「バイオ化学品」と呼ぶことが多い。この語は「バイオ燃料」と同様に、バイオマス資源から生産された化学品を意味している。化学プロセスでもエネルギーを投入して化学品を製造するので、バイオ化学品の製造では、化学品から得られるエネルギー量ではなく、投入エネルギーの減少が

研究課題となっている。有機化学品の製造に関しては、化学品の製造原料は化石資源であり、化石資源が枯渇したら化学品を製造できなくなるという本質的な問題がある。この問題を解決するには、持続可能かつ再生可能な資源であるバイオマスを原料として化学品を生産すればよいので、世界的にバイオ化学品の生産研究が盛んに行われている。

ジナリスの化学品バイオプロセス製造 米国では、大規模な農産物の生産が行われており、バイオマス資源が豊富であることから、バイオマスからの化学品製造の事業化が進んでいる。ところが、日本は国土も狭く、バイオマス資源を安価に大量に得ることは困難である。

一方で、日本は人口過密都市が多く、単位面積当たり廃棄プラスチック（廃プラ）の排出量は大きい。株式会社ジナリス（以下、当社という）では、この点に着目し、持続可能かつ再生可能なバイオプロセス用原料として、バイオマス以外にポリエチレンテレフタレート（PET）の廃棄物を用いることを企画した。バイオマスからの化学品製造においては、脂肪族系のアルコールや有機酸を中心として開発競争が激化している。一方で、バイオプロセスによる芳香族化学品の工業生産は容易でなく、事業化例は皆無である。このような背景から、当社は、オルソ系、テレ系またはイソ系樹脂の解重合により得られるフタル酸類を原料として、比較的価格が高いフェノール系化学品のバイオプロセス製造を目指すことにした。その具体例としては、バイオプロセスによるフタル酸類からのプロトカテク酸（PCA）の生産があげられる（図1）。PCAは高価な化学品ではあるが、その需要量は少ない。一方、PCAから転換できる可能性がある没食子酸（GAL）は、年間8000トンの需要があり、製造研究を優先的に推進してきた。また、PCAを経由して市場規模の大きいカテコールを製造できる。さらに、ナイロンやポリアミド樹脂の原料となるアジピン酸も製造できる点でも、図1に示す化学品製造事業に魅力を感じた。バイオマス由来糖やリグニンからもこれら化学品を製造できるので、原料の多様化も期待できる。

化学品バイオプロセス製造における課題と解決策

バイオプロセスにより一般化学品を製造する場合の主な課題としては、原料の供給と処理、生産菌に対する生産物の毒性、化学品を生産する代謝系の再構築および培

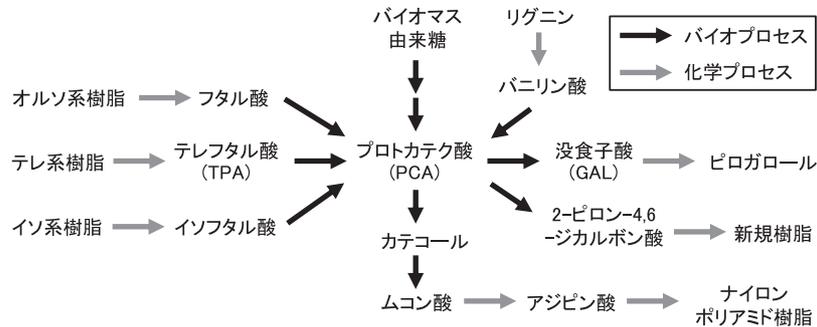


図1. 廃プラ、バイオマスおよびリグニンからの化学品のバイオプロセス製造

養液の排水処理に加えて、事業収益性があげられる。

原料の供給と処理ならびに培養液の排水処理 日本でバイオマス資源を得る際には、各バイオマスの収集・物流コスト、供給安定性および品質の均一性が問題となる。さらに、バイオマスは複雑な組成を有するので、バイオプロセスに利用できる形態の原料(グルコースなど)に加工・精製する工程が必要となる。なお、この工程は「バイオマスリファイナー」と呼ばれる。

これらの問題は廃プラを原料とする際にも解決する必要がある。ただし、日本では、廃棄PETボトルなどのように、廃プラは材質ごとに分類され、収集するシステムが出来上がっているため、バイオマスと比べると解決すべき問題は少ないと思われる。また、バイオマスの場合、生産・供給の季節性や保管中の微生物による分解の防止も問題になることがあるが、廃プラの場合には問題とならない。

逆に、バイオマスにはない廃プラの課題としては、廃プラ分解の際に生じる化学物質の生分解性があげられる。バイオプロセスを用いると、大量の培養液が生じるため、生産物を回収した後の培養排液は通常活性汚泥処理を施している。この排液に含まれる廃プラ由来の化学物質の生分解性が乏しいと、排水処理で支障が生じる場合がある。

生産菌に対する生産物の毒性 フェノール系化学品のように、一般化学品は、生物が作り出す代謝物と異なり、微生物の増殖に対して毒性を示すことも多いことが予想される。したがって、菌株の育種や培養法などで解決すべき課題が多いだろう。

非天然型化学品を生産する代謝系の再構築 バイオプロセス製造では、微生物が原料を取り込み、多段階の酵素反応を経て生産物に変換し、その生産物を細胞外に排出する能力を生産菌に持たせることが課題となる。特に、一般化学品の多くは微生物の代謝産物でないため、目的化合物の合成に必要な新規酵素の取得とその酵素を組み入れた人工的代謝系の再構築が必須となる。

事業収益性 一般化学品の生産では、原料として安価な化石資源が用いられるうえに、既存製造設備が整っているため、製品を安価に製造できる。概して製造コストが高いバイオプロセスが化学プロセスと競合するには、環境価値を提供するだけでなく、経済的合理性も考慮しなければならない。将来石油の価格が現在の2~3倍になれば、安価な化学品の製造でもバイオプロセスが化学プロセスと競合できるようになるであろうが、現時点ではバイオプロセスにとって収益性があるターゲット化学品の選択は容易ではない。このような点から、当社では化学プロセスでは製造コストが高くなる芳香環の水酸化に着目し、フェノール系化学品をターゲット製品として選択した。

バイオプロセス製造における合成生物学的手法の活用

合成生物学とは オミックス研究の発展により、生命を全体論的に理解する「構成的生物学」である systems biology が確立した。さらに、systems biology の研究によって得られた知識や技術をも活用する「工学」としての synthetic biology が誕生した。systems biology と synthetic biology の関係は Lui らの論文²⁾にも的確に述べられている。「合成生物学」という語は、synthetic biology の訳であるが、英語版 Wikipedia には、その定義として“the design and construction of biological devices and systems for useful purpose”と記載されている¹⁾。当社では、この意味の「合成生物学」に関する技術を用いて化学品製造微生物の育種研究を行っている。

わが国では、「合成生物学」を「構成的生物学」すなわち「生命をより全体論的に理解しようとする学問」の意味でも使うこともある。その理由は、以前は、生命を構成する要素に分解して生命現象を解明する「従来の生物学」との対比で、英語圏で「構成的生物学」のことを synthetic biology と呼んでいたからである。

化学品生産菌の育種における合成生物学的手法の利用 バイオプロセス製造における上述の課題を解

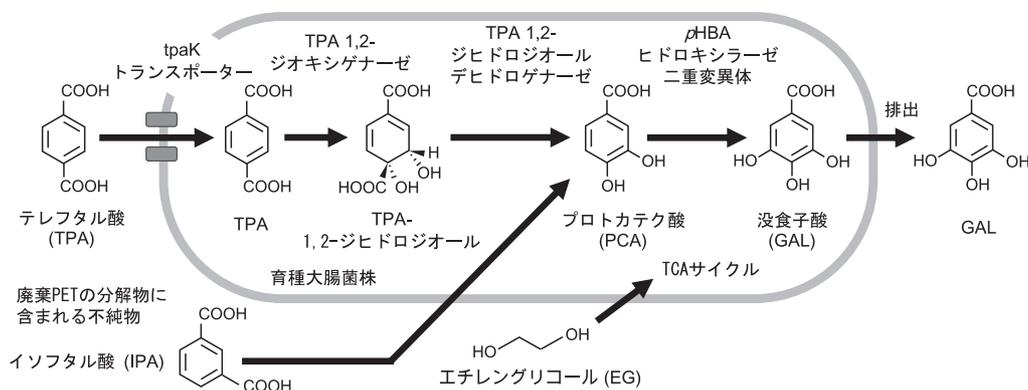


図2. テレフタル酸からのプロトカテク酸と没食子酸のバイオプロセス製造

決するには、廃プラやバイオマスの分解物の利用、微生物による原料となる化学物質の輸送、代謝経路の再構築、生産物毒性の回避、および原料に含まれる不純物の除去を実現するための新機能を化学品生産菌に付与することが求められる。これら多様な機能を宿主微生物に付与し、これら機能の調和をとって発現させるには巧妙な遺伝子発現調節を施す必要がある。したがって、当社では、全体論的な考え方をもち、新しい生命体を創製する「合成生物学的手法」を用いて微生物の育種研究を進めている。

一般に、大腸菌などの宿主微生物は廃プラ由来の炭素源を利用できないので、その利用能を付与する必要がある。さらに、一般化学品を生産するには、合成生物学的手法を用いて宿主微生物を改良し、化学品の合成経路を人工的に構築しなければならない。このためには、目的活性を有する新規酵素を創出することも求められる。

廃プラを原料とするとき、原料に混在するさまざまな不純物を多大なコストをかけて除くことは適切でなく、安価な方法で廃プラからバイオプロセス生産に供する原料を調製すべきである。廃プラ由来の原料には不純物以外に環境汚染物質が混入することもある。よって、大腸菌などの宿主微生物に目的物を生産する代謝経路の付与以外に、不純物を処理する分解経路も付与する必要性も生じる場合がある。

ジナリスでの化学品バイオプロセス製造の実例

GAL生産菌の育種 合成生物学的手法を用いた化学品生産菌の事例として、当社が研究を進めてきた廃棄PETを原料としてGALを製造する大腸菌の育種について概要を述べる(図2参照)。

GAL生成酵素としては、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1の

-ヒドロキシ安息香酸ヒドロキシラーゼ(pHBAヒドロキシラーゼ)の変異体がPCAからGALへの微弱な変換能を有することが知られていた。筆者らは、多種類の細菌の野生型pHBAヒドロキシラーゼを調べたと

ころ、基質をPCAにしたときに弱いGAL活性を有する酵素があることを見いだした。そこで、pHBAヒドロキシラーゼの立体構造モデルをもとに、論理的に変異を導入することにより、PCAを効率よくGALに転換できる酵素を創製することを試みた。数多くの変異酵素を造成し、活性を測定した結果、*P. aeruginosa* PAO1の二重変異体L199V-Y385Fと*C. glutamicum*の二重変異体L200V-Y385FのGAL合成活性がそれぞれ野生型酵素に対して29.7倍、25.0倍向上することをわかった。後者の二重変異体をGAL生産用に選択したが、1か所のみに変異を有する酵素L200VとY385Fはそれぞれ0.7倍、5.0倍しか活性が上昇しなかったことから、GAL生成活性の大幅向上は、2個の変異の相乗効果によることが明らかになった。

このpHBAヒドロキシラーゼ二重変異体の遺伝子を、*Comamonas testosteroni* 72W2から単離したテレフタル酸(TPA)1,2-ジオキシゲナーゼ(3つのコンポーネントから成る酵素)とTPA1,2-ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼの3種類の遺伝子とともに、人工的なオペロンを形成させて、*m*-トルイル酸添加で誘導がかかるPmプロモーターの制御下で誘導的に発現させた。その結果、TPAからのGALの生産が認められたが、その生産量は少量であった。大腸菌がTPAを効率よく取り込まないことが低い生産性の原因と考えられたので、*Rhodococcus jostii* RHA1のTPAトランスポーター遺伝子を上記オペロンに組み込んで共発現させたとこ、効率のよいGAL生産が認められた。この生産菌をジャーファーマンターにより培養することにより、0.3 M TPAを約24時間以内にほぼ全量GALに転換することができた。

廃PET分解物に混入する不純物の分解 廃棄PET樹脂の解重合によりTPAを回収した場合、著量のエチレングリコール(EG)と少量のイソフタル酸(IPA)が不純物として混入することが多い。これらの不純物は精製工程で問題を引き起こし、排水処理でも分解されに

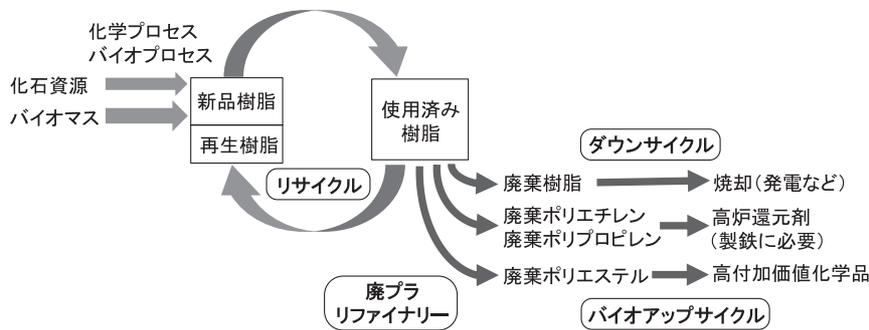


図3. 持続可能かつ再生可能資源からの樹脂製造の将来像

くいリスクがあったので、これら不純物の分解能をGAL生産菌に付与することにした。

上述の*C. testeroni* 72W2からIPA代謝酵素群(IPA-3,4-ジオキシゲナーゼとIPA-3,4-ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ) およびイソフタル酸トランスポーター遺伝子をコードする遺伝子を単離し、大腸菌に発現させたところ、培地中のIPAは完全に消失することがわかった。なお、この大腸菌は単にIPAを分解できるだけでなく、目的物であるGALに転換できる。EGの分解については、大腸菌のラクトアルデヒド・レダクターゼとアルデヒド・デヒドロゲナーゼAを高発現させることにより、培地中のEGを完全に消失させることができた。また、これら酵素の発現量の調節などに着目して育種した大腸菌は、単にEGを分解するだけでなく、EGを唯一炭素源として生育でき、その生育速度もグルコースを炭素源にしたときの約50%に達することも判明した。

バイオプロセス製造用自社プラントの稼働 当社では、これらの成果を事業化するために、廃棄PET樹脂の解重合、微生物によるフタル酸類のフェノール類への転換、ならびに培養液からのフェノール類の精製に分けて、ベンチプラントスケールで化学品を製造する設備を完成させ、この製造設備を今年4月より稼働させている。

化学品製造の将来像

グルタミン酸やリジンを中心とする既存の有機化合物のバイオプロセス生産はせいぜい年間500万トン程度である。今後バイオマスからの化学品製造事業が拡大されたとしても、合計で年間1000万トンの生産量を越えることを容易でないであろう。その理由は、バイオプロセス製造ではBOD値が高い大量の排水が排出され、その処理が容易でないことに加えて、微生物の生育には資源枯渇が懸念されているリン酸を必要とするからである。

一方で、樹脂の需要量は大きく、樹脂材料となるテレフタル酸だけでも年間生産量は5000万トンに近い。し

たがって、樹脂材料の供給はバイオマス経由で増大させることは困難であるので、樹脂のリサイクルや廃棄樹脂を原料とする樹脂材料の生産を拡大していく必要があるだろう。

このような考察から、当社では、オルソ系樹脂や塩化ビニール中の可塑剤から回収できるフタル酸を原料として、バイオプロセスにより多種類のフェノール系化学品を大量生産する技術も確立し³⁾、これまでフタル酸類を原料として大量生産できる化学品は20種類以上を越えた。

以上の議論も踏まえて、樹脂製造の将来像を図3にまとめた。化石資源の枯渇、炭酸ガス放出および廃棄物処理の問題を考えると、樹脂の「リサイクル」自体が重要となる。再資源化が困難な樹脂は焼却により熱エネルギーを得る「ダウンサイクル」を行うのがよい。塩素などのハロゲンの含有量が少ない樹脂（廃棄ポリエチレンやポリプロピレンなど）は製鉄で酸化鉄を還元するのに必要な「高炉還元剤」として利用すれば、石炭の使用量を減少できる。

当社では、リサイクル工程で排出される廃棄物、すなわち廃棄物の廃棄物を極力利用しようと考えている。フタル酸類などをポリエステル樹脂の解重合などにより調製しているが、この工程をバイオマスリファイナリーと対比して、「廃プラリファイナリー」と名付けた。また、廃プラ由来の化合物を原料としてバイオプロセスにより価値が高い化学品を製造する手法を「バイオアップサイクル」と名付けた。今後バイオアップサイクルに基づく化学品製造事業を国外にも広めていく活動を推進していきたい。

文 献

- 1) Wikipedia: http://en.wikipedia.org/wiki/Synthetic_biology
- 2) Lui, D. *et al.*: *Front. Microbiol.*, **4**, 211 (2013).
- 3) 西 達也ら: 化学と生物, **52**, 331 (2014).