

図3. IPA 培養システム模式図. 発酵槽内で発生した排気ガス (IPA を含む) を捕集用水にバブリングさせ、IPA を捕集する。

気システムを備えた培養装置を用いることにより、排気ガスに含まれるIPAを水でトラップするというものである。ちなみに本稿で言うIPA生産性とは、培地およびトラップ水に含まれるIPA量を足し合わせ、初発の培地量で割った値である。

合成生物学を活用したIPA生産性の向上 IPA生産性を高めるため、まず培地組成を見直した。種々の検討を行った結果、窒素源を補充すると生産性が劇的に向上することを突き止めた。具体的には、アンモニアを中和剤として用いることにより、IPA生産性を28 g/L (培養48 h後) にまで高めることができた。

さらなる向上を図るため、我々は合成生物学を活用した。我々はIPA生産性が伸びない原因が、大腸菌体内のNADPHの欠乏に起因するという仮説を設定し、その検証を行った。大腸菌の中でグルコースからIPAに至る反応中、アセトンからIPAの反応で1分子のNADPHが消費されるが、現行の代謝ルートだとNADPHを生成する反応が含まれない。そこでNADPHの供給を可能とするため、2通りの代謝ルート変更を行った。

1つ目は、グルコースからエントナー・ドウドロフ経路 (ED経路) に入り、ピルビン酸→アセチルCoAを経由してIPAに至るルート²⁾である (図4)。

図のように、強制的にED経路を経由させるために *pgi* (グルコース6-リン酸イソメラーゼ遺伝子) と *gnd* (6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子) を破壊した。さらに *zwf* (グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子) を強化し、*gntR* (*edd* と *eda* のリプレッサー) を破壊することで、IPA生産性は48 hで80 g/Lへ向上した。

NADPHを供給するもう一つの代謝ルートは、グルコースからホスホエノールピルビン酸→オキサロ酢酸→リンゴ酸→ピルビン酸→アセチルCoAを経由してIPAに至るルート³⁾である (図5)。

maeB (リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子) を強化すると同時に、NADH→NADPHの反応を促進するため、*pnt* (ホスホトランスフェラーゼ遺伝子) を強化した。さらに代謝中間体の解析結果からアセチルCoAの蓄積が見られたことから *atoB* を強化した。その結果、IPA

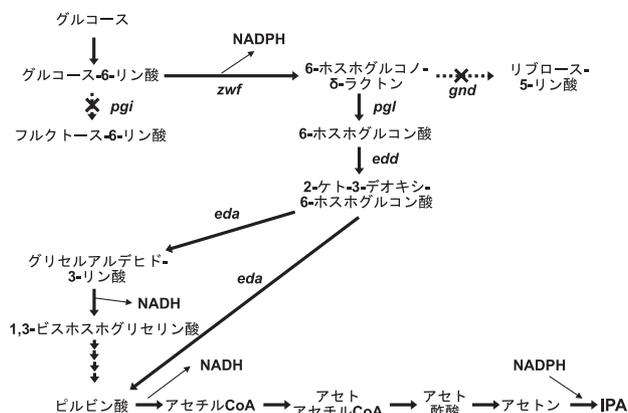


図4. ED経路を経由したIPA生産ルート

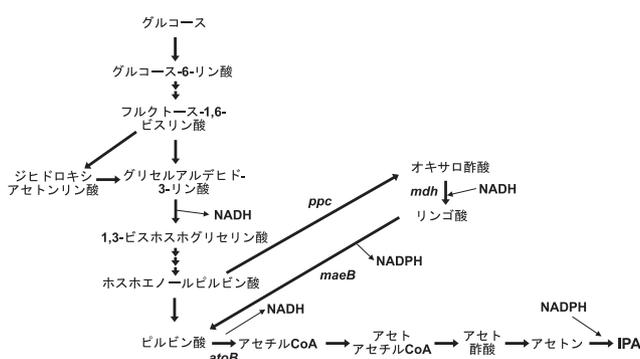


図5. リンゴ酸経路を経由したIPA生産ルート

生産性は48時間培養で113 g/Lに達した。

スクロース原料からのIPA生産 これまでグルコースを原料としたIPA生産について述べてきたが、安価な糖原料として忘れてはならないのが、サトウキビに含まれているスクロースである。一方、筆者らが宿主として選択した大腸菌B株はスクロースを資化できない。グルコースのみならず、スクロースからでも効率的にIPAを生産可能とするため、筆者らはスクロースを分解する酵素の遺伝子 *cscA* をIPA生産大腸菌に導入し、さらにフルクトース代謝を促進するために *fruK* (1-ホスホフルクトキナーゼ遺伝子) を強化するなどの工夫により、スクロースからでもIPAが高生産できるようにした⁴⁾。

合成生物学を活用した対糖収率の向上 前述したようにIPA生産性を高めることはできたが、製造コストをさらに下げるためには別の課題がある。それは対糖収率である。筆者らのIPA生産大腸菌では、1分子のグルコース (分子量180) から1分子のIPA (分子量60) が生成するので、理論上の対糖収率は33%である。これをエタノール並みの50%へ向上させるために、筆者らは炭素固定による対糖収率向上を試みた。そもそも大腸菌B株は、ホスホエノールピルビン酸→オキサロ酢酸の反応において炭素固定を行っているため、これを活用す

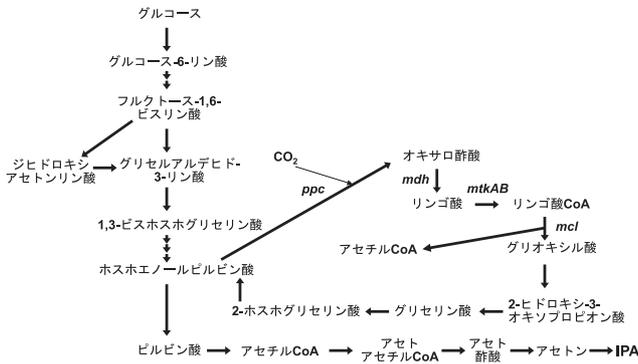


図6. 炭素固定による対糖収率向上を目指したIPA生産ルート

ることを考えた. *mtkAB*(リンゴ酸CoAリガーゼ遺伝子)と*mcl*(リンゴ酸CoAリアーゼ遺伝子)の2種類の遺伝子をメタン資化性菌から単離し, これらをIPA生産大腸菌に導入した. これによって, 図6に示したような人工的な回路が出来上がる. この回路が一周するごとに1分子のアセチルCoAが生成する. 実際にこの回路が機能し, 収率が向上することを実験で確認している⁵⁾. 今後はさらにこの回路の回転を速めることによって, 更なる対糖収率の向上を目指したいと考えている.

デオキシシロイノース (DOI)

DOI生産大腸菌の構築 DOIは種々の有用化学品へ誘導可能な化合物である(図7). これまで有機合成が困難とされてきた1,2,4-トリヒドロキシベンゼンが, DOIから容易に合成できるのは特筆すべき点であろう⁶⁾.

そもそもDOIは, 微生物*Bacillus circulans*が抗生物質ブチロシンを生産するための中間体として見いだされた. 東工大の柿沼らが, グルコース-6-リン酸→DOIの反応を触媒する酵素の遺伝子*btrC*を単離し⁷⁾, 新潟薬科大学の高木, 高久らが*btrC*を大腸菌3重破壊株(Δ *pgi* Δ *zwf* Δ *pgm*)に導入することによってグルコースとマンニトールからDOIを高効率で生産する大腸菌を創出した⁸⁾. この大腸菌はグルコースをすべてDOIに変換するように代謝ルートが改変されているため, 大腸菌の栄養源としてグルコースとは別の糖源が必要となる(図8). 高久らは好適な糖源としてマンニトールを選択したが, 筆者らはさらに安価な糖源としてスクロースが利用できるよう, スクロース分解酵素遺伝子*cscA*の導入による改良を行った⁹⁾. 紙面の都合で技術の詳細説明は割愛するが, この技術を確認することによってDOI生産コストを劇的に削減することができた.

現在, 三井化学はDOI誘導体の産業化を目指して, 平成25年度からスタートしたNEDO所管の国家プロジェクト「非可食性植物由来化学品製造プロセス技術開発」に参画し, 木材チップを原料としたDOIの生産技

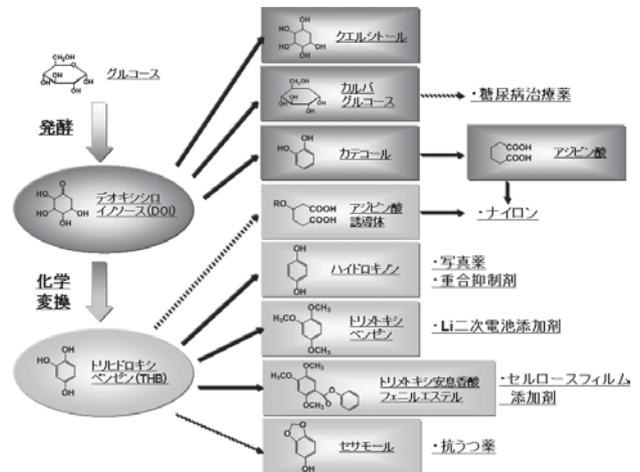


図7. DOIから誘導可能な種々の化学品例

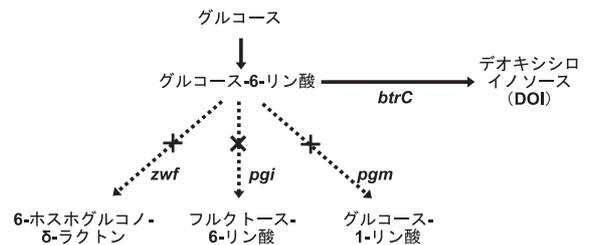


図8. DOI生産大腸菌の代謝ルート

術と用途開発の研究開発を行っている. 木材チップの糖化, DOI発酵生産, 発酵液からのDOI精製, DOIの誘導化, 得られた誘導体の用途開発, およびこれら技術を統合したプロセスの開発を, 5企業1大学と連携しながら進めている. 木材チップを原料とした化学品の産業化が1日でも早く実現できるよう, これからも日々努力を重ねていきたい.

本技術に関する研究開発は, ご指導賜りました清水浩先生(大阪大学), 近藤昭彦先生(神戸大学), 池川信夫先生(新潟バイオリサーチパーク株式会社), 高久洋暁先生(新潟薬科大学)をはじめとする諸先生方, さらに三井化学株式会社の共同研究者の皆様のご協力によるものです. 心より御礼申し上げます.

文 献

- 1) 特許第5156017号
- 2) 特許第5674789号
- 3) 特許第5628288号
- 4) 特許第5568562号
- 5) 国際出願, WO2013/018734
- 6) 特許第5373066号
- 7) 特許第3122762号
- 8) 特許第4598826号
- 9) 特許第5254353号