

論文の内容の要旨

論文題目 微生物変換によるキシリトール新製法開発に関する研究

氏名 杉山 雅一

(1) 本研究の背景と目的

キシリトールは天然に存在する炭素数5の糖アルコールである。ショ糖に匹敵する甘味を呈し、虫歯の原因菌である *Streptococcus mutans* を減少させる抗う蝕性を有している。これらの特徴により、甘味料やオーラルケア製品、輸液などの食品・医薬用途で日本を含む世界各国で認可を受けており、その市場は拡大を続けている。現在のキシリトールの工業的製法は、木材のチップやとうもろこしの芯などの植物体を加水分解して得られるD-キシロースを化学的に接触水素化する方法である。しかし現行製法は、原料が農産廃物であるためD-キシロースの供給が不安定である点、増産に向けた設備の新設・増設のためにはD-キシロースの化学的還元工程の設備投資が大きい点において、拡大するキシリトール市場に対応する際の課題を有していた。

本研究の目的は、安価で安定供給可能な炭素源であるグルコースを出発原料とした微生物変換（発酵法・酵素法）によるキシリトール新製法の開発である。我々は、キシリトールの2'-エピマーであるD-アラビトールをグルコースから効率的に発酵生産可能な酵母を採取している。従って、D-アラビトールをキシリトールに高収率でエピメリ化することが出来れば、グルコースからキシリトールが生産可能になると考えられた。即ち、本研究の課題は微生物変換によるD-アラビトールのキシリトールへのエピメリ化工程の開発である。

(2) *G. oxydans* AJ 2847 によるD-アラビトールからのキシリトール変換

まず菌体粗抽出液を酵素源としてD-アラビトールをキシリトールへ変換する活性を有する微生物を探索したところ、NAD 添加条件下で細菌 2 3 株においてキシリトール生成活性を見出した。これらの菌株による変換反応の中間体はD-キシルロースであった。1つの微生物を作用させることによるD-アラビトールからのキシリトール生産としては、今回の結果が初めての例であった。さらに、休止菌体反応による変換活性菌を探索したところ、*Gluconobacter oxydans* AJ 2847 株などの酢酸菌 3 株において、キシリトール生成活性を見出した。*G. oxydans* では高活性の膜結合型アラビトールデヒドロゲナーゼ(AraDH)によりD-アラビトールが不可逆的にD-キシルロースに酸化され、さらにNADH依存型可溶性キシリトールデヒドロゲナーゼ(XDH)により、D-キシルロースがキシリトールへと還元されていた(Fig. 1)。一方で酢酸菌以外の細菌ではAraDHがNAD依存型の可溶性酵素であり、その反応平衡はD-アラビトール側に向いていた。即ち、酢酸菌以外の菌株では、D-アラビトールからのキシリトール収率は最大で50%程度であり、AraDHが膜結合型酵素で反応が不可逆に進捗する酢酸菌型の方が有利であると考えられた。

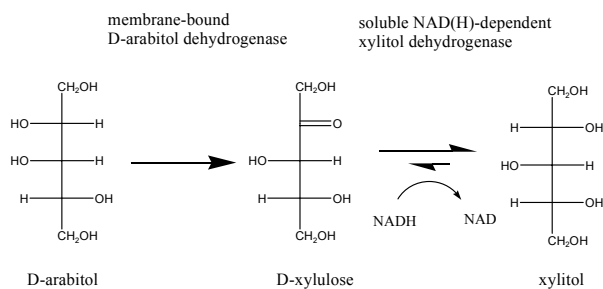


Fig. 1 *G. oxydans* AJ 2847 による
D-アラビトールからのキシリトール生産

次に、菌体反応でのキシリトール収率が高かった *G. oxydans* AJ 2847 を選抜して反応条件を検討した。10% (w/v) の洗浄菌体を用いることにより、52.4 g/l のD-アラビトールは6時間以内に速やかにD-キシルロースへと変換された後、29.2 g/l のキシリトールが生成した(収率56%)。D-アラビトールの酸化は膜結合型AraDHにより高収率で進行するが、これは酢酸菌特有の酸化発酵と呼ばれる反応である。一方でD-キシルロースが反応液に残存し、キシリトール収率向上のためにはXDHによるD-キシルロースのキシリトールへの還元反応へのNADHの供給が必要であると考えられた。そこで還元力NADHを供給するために種々炭素源の添加効果を検索したところ、エタノールとグルコースの添加が効果的であることを見出した。還元力源として、5 g/l のグルコースと5% (w/v) のエタノールを追加したところ、反応27時間後のD-アラビトールからのキシリトールの生成量は51.4 g/l (収率98%) に達した。変換反応条件を整えて *G. oxydans* を作用させることにより、高収率でD-アラビトールからキシリトールが生産可能であることが明らかとなった。

さらに、キシリトール生成量向上に最も効果のあったエタノールからのNADH再生経路について検討した。酢酸菌におけるエタノール代謝酵素としては、膜結合型アルコールデヒドロゲナーゼ(mADH)とNAD依存型可溶性アルコールデヒドロゲナーゼ(sADH)が存在する。キシリトール生産におけるNADH供給経路を明らかにするためにmADHの破壊株を作製した。

その結果、mADH 破壊株においてもエタノール添加によるキシリトール生成量の増加が認められ、エタノールからの還元力の大部分は NAD 依存型 sADH によって供給されていることが強く示唆された。

(3) *G. oxydans* のキシリトールデヒドロゲナーゼ高発現株の構築と生産性の向上

G. oxydans によるキシリトール変換反応の実用化に向けて D-キシリロースのキシリトールへの還元反応の収率、生産性を上げることが望まれた。そこで遺伝子組み換えによる菌株育種を行い、キシリトール収率・生産性の向上を試みた。

まず *G. oxydans* での形質転換系を開発した。近縁種であるセルロース生産性酢酸菌 (*Acetobacter xylinum*) のベクター pSA19 の導入を試み、*G. oxydans* AJ2847 に適応可能であることを見出した。また、パブリックアクセプタンスの観点から、セルフクロニングベクターとして利用可能なプラスミドを検索し、*G. oxydans* AJ 2851 株に約 5.5kb のプラスミド pAG5 を見出し、セルフベクター構築の可能性を見出した。

次に、D-キシリロースをキシリトールへと還元する酵素である XDH を *G. oxydans* AJ 2847 株より精製し、その諸性質を明らかにした。XDH はキシリトールと D-ソルビトールに対して基質特異性を示し、NAD(H) のみを補酵素とした。精製した XDH に充分量の NADH を供給した条件での平衡点はキシリトール生成側に寄っていることを確認した。また、XDH による D-キシリロース還元反応の至適 pH は pH5~6 であり、AraDH による D-アラビトール酸化反応の至適 pH とほぼ同じ範囲であった。

決定した N 末アミノ酸配列に基づき *xdh* 遺伝子をクローニングし、プラスミド上で *xdh* 遺伝子を *G. oxydans* に導入することにより、XDH 活性を親株の 11 倍に増強した菌株を造成することに成功した。次に作製した XDH 高発現株での D-アラビトール→キシリトール変換反応を検討した。S 型ジャーで低通気条件 (3/4vvm, 400rpm) に制御して休止菌体 1% (w/v) を添加して変換させたところ、225 g/1D-アラビトールからの生成キシリトール量がコントロール株の 20 g/1 に対して XDH 高発現株では 33 g/1 に向上した。さらに、還元力 (NADH) 源としてエタノール添加条件で変換させたところ、コントロール株の 27 g/1 に対して導入株で 57 g/1 のキシリトールが生成した。以上の結果より、XDH 高発現によるキシリトール生産性が向上した菌株の造成に成功した。

(4) *G. oxydans* における還元力 NADH 生成経路の解明

工業化菌株育種への残る課題は還元力 NADH 供給能の向上であると考えられた。一般的には NAD からの NADH の再生は解糖系と TCA 回路で行われる。しかし *G. oxydans* においてはこれらの経路は共に不完全であると報告されており、*G. oxydans* での NADH 再生系路については不明であった。そこで更なる菌株育種に向けて酢酸菌の NADH 再生経路の解明を行った。

まず、*G. oxydans* の膜画分と可溶性画分からなるD-アラビトールからのキシリトール変換反応系を構築した。本アッセイ系を用いて、キシリトール生成量増加因子としてペントースリン酸回路の酵素である transaldolase/glucose-6-phosphate isomerase bifunctional enzyme (TAL-PGI) と ribulokinase を単離・同定した。TAL と PGI が一つのポリペプチドとして活性発現している例は報告がなく、ペントースリン酸回路 (PPP) が主要な糖代謝系路である酢酸菌に特有の性質であると考えられた。

次に、PPP の強化により NADH 供給能が強化された可能性が考えられたことから、酸化的 PPP の鍵酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase (ZWF) と 6-phosphogluconate dehydrogenase (GND) をそれぞれクローニングして解析した。結果、これらの酵素の両方が NADP のみでなく NAD も補酵素として反応することを明らかにした。一般的にはこれらの酵素は NADP に特異的であるが、本研究の結果から、*G. oxydans* では一般的な生物とは異なり、ペントースリン酸回路で NADH の生成が可能であることが強く示唆された。さらに *tal-pgi*, *zwf* および *gnd* 遺伝子を *G. oxydans* に導入し、これら酵素の発現強化によって若干ではあるがキシリトール生成量が増加することを確認した。*Gluconobacter* においては菌体内代謝の主要ルートであるペントースリン酸回路において NADPH のみでなく NADH も生成可能であることが明らかになったが、この知見は、*G. oxydans* によるキシリトール生産菌の更なる育種も含めて、工業的に重要な微生物である酢酸菌を用いた微生物変換の開発において有用な知見として利用されることが期待された。