

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 17 年度 博士課程 進学
氏名 塚 繁嗣
指導教員 五十嵐 泰夫

論文題目

パームオイル由来グリセロールの炭酸固定発酵に関する研究

グリセロールはバイオディーゼル産業において副生物として生産される安価で大量に存在するバイオマスのひとつであり、高付加価値を有する化合物への変換が囑望されている。化合物の還元性の指標である **degree of reduction per carbon** : κ についてグルコース($C_6H_{12}O_6$: $\kappa=4$) やキシロース($C_5H_{10}O_5$: $\kappa=4$) に対しグリセロールは非常に高い値($C_3H_8O_3$: $\kappa=4.67$) を示す。この高い還元性ゆえにグリセロールは優れた発酵原料となりうるのである。

コハク酸は生分解性プラスチックの原料をはじめ様々な用途を持つ化学物質である。コハク酸の生物的生産例としてグルコースを原料とした研究が多く報告されているが、グリセロールを炭素源としたものとしてはプロピオン酸細菌あるいは *Anaerobiospirillum succiniciproducens* といった限られた例のみが知られている。ここで物質を発酵変換する上で最も重要となるのは発酵経路全体で酸化還元バランスを合わせることである。グルコースからコハク酸を生産する場合、グルコース 1/2 分子から PEP までに生ずる 2[H] の還元当量では PEP をコハク酸に還元するために必要な 4[H] の還元当量をまかなえない。従ってグルコース 1/2 分子からコハク酸 1 分子を生産することは困難である。一方、グリセロールから PEP までには 4[H] の還元当量が生じ、コハク酸への還元には 4[H] 消費する。すなわち炭酸固定を伴う発酵によりコハク酸を生産する一連の反応は酸化還元バランスを保ったまま成立する。グリセロールを発酵しうる微生物は少なくないが、病原性、嫌気環境の要求性、栄養要求性、遺伝子改変技術の有無等を考慮すると大腸菌は

物質生産のモデルとして適したものである。

本研究は大腸菌をモデル生物としてメタボリックエンジニアリングを行い、C3化合物であるグリセロールから C4 化合物であるコハク酸を生産する炭酸固定発酵について提唱するものである。

1. 嫌気栄養培地でのグリセロール発酵特性

大腸菌の野生株として K-12 MG1655 株を用い、栄養培地(LB と同等の有機窒素源を含む)、100%炭酸ガスバブリング条件(0.1vol/min)でのグリセロール発酵特性について解析をおこなった。本条件ではエタノール、ギ酸、酢酸が主生成物であり、グリセロールに対する酸化還元バランスを欠いたものであった。大腸菌の発酵経路についてグリセロールからの酸化還元バランスを満たす発酵産物はエタノールとコハク酸に限られているため、エタノール生産能を欠失させることでコハク酸の生産性を改善できると予想した。しかしエタノール生産能を欠失した $\Delta adhE$ 株では酢酸とギ酸が主生成物となり、野生株と比べグリセロール消費速度は半減した。以上の結果をもとに、酢酸、エタノール、ギ酸への分岐経路を総合的に欠失させることを検討した。ピルビン酸をアセチル CoA とギ酸に分解する反応を触媒する pyruvate-formate lyase をコードする遺伝子を欠失した $\Delta pflB$ 株について同様に解析した。結果、乳酸が主生成物であったが、 $\Delta pflB$ 株は野生株及び $\Delta adhE$ 株と比べて高濃度のコハク酸を蓄積した。

次に $\Delta pflB$ 株を元に乳酸生産能を欠失した二重欠失株 $\Delta pflB \Delta ldhA$ 株を作成した。本株ではコハク酸が主生成物であり、培養開始 218 時間後の蓄積濃度は 79mM、対糖収率は約 0.59mol/mol glycerol であった。また酢酸 15mM 及びエタノール 29mM を副生した。

2. 微好気無機塩培地でのグリセロール発酵特性

Stoichiometry 解析の点で、また工業的視点においても高価な有機窒素源の使用は好ましいものではない。そこで無機塩最小培地を基本とし、有機窒素源の代替について検討した。有機窒素源非添加条件では嫌気条件での生育が阻害されるため、気相をガス置換せず air のままにした閉鎖培養系を採用した。pyruvate-formate lyase の破壊株はグルコースを炭素源とした発酵条件で酢酸要求性を示すことが知られているため酢酸ナトリウムの添加(10、30、100mM)を検討した。また TCA 回路の酸化ブランチを介して合成されるアミノ酸の不足を考慮しグルタミン酸ナトリウムの添加(10mM)を検討した。

結果として酢酸ナトリウム 100mM 添加時に栄養培地を用いた場合と同等以上のコハク酸生産が確認され、グルタミン酸ナトリウムは特に酢酸ナトリウム 30mM 添加時に促進効果を示した[Tab.1]。酢酸はアセチル CoA の欠乏を補うために代謝されていると考えた。本条件では添加した酢酸の一部のみが消費されており、消費濃度に比べ高い初期濃度を要求するのは、嫌気酢酸変換に関わる acetate kinase の酢酸に対する親和性が低いことによると考えられた。なお無機塩酢酸培地は微好気閉鎖培養系では有効であったが、炭酸ガスをバブリングした嫌気条件ではコハク酸生成が確認されなかった。

Table 1. Dependency on Acetate and Glutamate

media	Glutamate added [mM]	Acetate added [mM]	Acetate consumed [mM]	Glycerol consumed [mM]	Succinate produced [mM]
minimal salts	0	0	0.0	12.2	2.1
	0	10	0.5	13.4	2.2
	0	30	5.2	29.8	13.5
	0	100	19.8	85.3	55.2
	10	0	0.0	13.0	2.0
	10	10	0.0	14.2	3.3
	10	30	6.9	47.3	27.5
	10	100	19.7	90.0	59.0
LB	-	-	-	68.6	40.0

3. 三重欠失株の発酵特性

$\Delta pflB \Delta ldhA$ 株をもとにさらに *glpR*、*adhE*、*pta-ackA* 遺伝子を欠失させた $\Delta pflB \Delta ldhA \Delta glpR$ 株、 $\Delta pflB \Delta ldhA \Delta adhE$ 株、 $\Delta pflB \Delta ldhA \Delta pta-ackA$ 株を構築した。*GlpR* はグリセロール代謝系の共通リプレッサであり、当該遺伝子の欠失はグリセロール代謝速度の向上を目的としておこなった。また *adhE*、*pta-ackA* の欠失はそれぞれ副産物であるエタノール、及び酢酸の低減を目的としておこなった。

$\Delta pflB \Delta ldhA \Delta glpR$ の発酵特性は親株である $\Delta pflB \Delta ldhA$ 株とほぼ同一であった。本株をもとに微好気条件での発酵プロセスの詳細な解析をおこなった。菌体の増殖は 16 時間程度で完了し、コハク酸の蓄積が開始する。また 20 時間程度で酸素は消費され系は完全嫌気状態となった。144 時間後のコハク酸濃度は 64.4mM であり対糖収率はプロセス全体で 0.59mol/mol glycerol、増殖が完了する 16 時間以降で 0.74mol/mol glycerol であった。

$\Delta pflB \Delta ldhA \Delta pta-ackA$ 株は栄養培地で親株の約 1/5 濃度のコハク酸を蓄積した。 $\Delta pflB \Delta ldhA \Delta adhE$ 株は無機塩酢酸培地でコハク酸の蓄積が見られなかった。

4. Acetyl-CoA synthetaseによる高親和性酢酸代謝系の導入

酢酸の消費濃度は 20mM 程度であるが、初期酢酸濃度が 30mM では発酵促進効果がほとんど見られない[Tab.1]。これは嫌気条件で働く *pta-ackA* 経路の酢酸に対する親和性の低さであると考え、 $\Delta pflB \Delta ldhA$ 株、 $\Delta pflB \Delta ldhA \Delta pta-ackA$ 株それぞれに親和性の高い acetyl-CoA synthetase をコードする *acs* 遺伝子を導入し発酵特性を解析した。結果として 10mM、30mM の酢酸添加時に *acs* 遺伝子を導入しない場合と比較し高濃度のコハク酸が蓄積したが、100mM の酢酸添加時には及ばないものであった。

5. 炭酸固定酵素の大量発現

通常 ATP を生成しないグリセロールからのコハク酸生産において ATP 生成プロセスの確立は必須である。そこで PEP carboxykinase または malic enzyme による ATP 生産型コハク酸生成の可能性を検討し、合わせて PEP carboxylase の大量発現によるコハク酸生成能の増強について検討した。強力なコハク酸生産菌である *Anaerobiospirillum succiniciproducens* の①PEP

carboxykinase、*Actinobacillus succinogenes* の②PEP carboxykinase 及び③NADP 型 malic enzyme の大量発現用プラスミドを構築した。また大腸菌由来の④NAD 型 malic enzyme、⑤ PEP carboxylase の大量発現用プラスミドを準備した。 $\Delta pflB \Delta ldhA \Delta glpR$ 株を宿主として③④⑤の発現を検討したところ、改善効果は確認されず、⑤の発現は逆に発酵の阻害を引き起こした。

また異種 PEP carboxykinase による効果的な炭酸固定を目的とし、内生の PEP carboxylase 活性を欠失した $\Delta pflB \Delta ldhA \Delta ppc$ 株を構築した。本株を宿主とし①②③④の発現を検討したが、改善効果は確認されていない。

6. ^{13}C 安定同位体を用いたStoichiometry解析

発酵産物であるコハク酸及びエタノールの由来を明らかとするため、無機塩酢酸培地を用い ^{13}C グリセロール、 ^{13}C 炭酸水素カリウム、 ^{13}C 酢酸ナトリウムをそれぞれ添加した発酵試験をおこなった。発酵後の培養液を GC/MS で分析し、同位体分布から各基質の寄与率を推定した。

その結果、コハク酸の約 97%がグリセロール由来であると明らかになった。またコハク酸の約 85%が添加した炭酸塩由来の二酸化炭素を固定していた。残りの 15%にはグリセロールまたは酢酸から生じる二酸化炭素を固定したものが含まれると考えられ、炭酸塩非添加条件でも炭酸塩添加時の 20%程度のコハク酸が生成しうる点を考慮すると妥当なものであった。またグリオキシル酸経路を介したコハク酸の生成については否定された。

エタノールの約 92%が酢酸、約 5%がグリセロール由来であった。消費された酢酸に対し、エタノールが 90~100%程度生成することを考慮すると、酢酸の 80~90%程度はエタノールに変換されたこととなり、当初予測していたアセチル CoA の補充以外の目的で消費されていた。本来グリセロールからのコハク酸生成は酸化還元バランスを満たしたプロセスである。しかしながら PEP までに生ずる還元当量はその先のプロセスで初めて消費される。還元当量の余りやすい嫌気条件において初発の NAD^+ を供給する反応として不可欠な役割を担っている可能性が示唆された。

まとめ

大腸菌をモデルとしてメタボリックエンジニアリングをおこない、グリセロールからのコハク酸生産を可能とした。合わせて酢酸を添加することにより栄養培地を用いないコハク酸生産プロセスを確立した。本条件において菌体増殖終了後の対糖収率は約 $0.74\text{mol/mol glycerol}$ であり、理論値の 74%と高いものであった。また ^{13}C 安定同位体を用いた解析により、グリセロールが炭酸固定によりコハク酸へと変換されていることを証明した。PEP carboxykinase あるいは malic enzyme による ATP 生産型炭酸固定系の確立によりさらなる改善が期待される。