

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 堀 繁嗣

近年、化石燃料代替エネルギーが注目を集めしており、バイオディーゼル燃料はそのひとつである。バイオディーゼルはパームオイルを代表とする油脂原料とアルコールから生成され、副産物としてグリセロールを生成する。バイオディーゼル産業の成長によりグリセロールは安価な未利用資源となり、その有効利用プロセスの構築が図りされている。生物的物質生産は主に発酵条件でおこなわれるが、その際 Redox Balance が満たされる必要があり、グリセロールから Redox Balance を満たしつつ生成可能な化合物にコハク酸がある。

コハク酸は生分解性プラスチックの原料等さまざまな用途を有する産業的利用価値の高い化合物である。コハク酸の生物的生産は主にグルコースから炭酸固定をともなっておこなわれるが、グルコースは還元等量の不足によりその最大理論収率は C3 当たり 86%程度にとどまる。一方グリセロールはその高い還元的性質ゆえに C3 当たり 100%の理論収率を示す。したがって本研究は、*E.coli*をモデルとした代謝工学により、未利用資源の有効利用法としてグリセロールを原料とした炭酸固定によるコハク酸の生産プロセスを構築し、プロセス全体で高度に炭酸固定型となる新しい発酵の形として炭酸固定発酵を提唱するものである。

本論文は全 6 章で構成される。

第 1 章では有機窒素源を低減した培地を用い、嫌気条件でグリセロールの変換を試みた。結果として *E.coli* の野生株である MG1655 株はグリセロールに対する Redox Balance を概ね充足しエタノールを主要発酵産物として生成した。一方エタノール生産能の欠失株はグリセロールの代謝と生育がほぼ不可能であった。

第 2 章ではいわゆる栄養培地を用い、嫌気条件でグリセロールの変換を試みた。結果として MG1655 株はエタノール及び酢酸を主要発酵産物として生成し、Redox Balance は充足されなかった。そこでエタノール、酢酸の生成経路である PFL (pyruvate-formate lyase) をコードする遺伝子 *pflB* の欠失株 ($\Delta pflB$ 株) を用いたところ、コハク酸収率は MG1655 株に比較し 13%から 28%へと 2 倍以上に改善された。また乳酸が新たに主要代謝産物として検出されたため、さらに乳酸生成に関わる *ldhA* を欠失させた二重破壊株 $\Delta pflB\Delta ldhA$ 株を構築したところ、本株のコハク酸収率は 28%から 58%へと 2 倍以上に改善され、コハク酸最終濃度 79 mM、生産速度 0.36 mM/hr を達成した。

第 3 章では無機塩培地の導入を試みた。無機塩培地の導入に当たり、想定される課題として①PFL 欠失による酢酸要求性、②ATP 欠乏による生育阻害が挙げられ、解決法として

①酢酸塩の添加、②生育サポートのための微妙気条件を検討した。結果として酢酸ナトリウムの 100 mM 添加時に栄養培地を用いた際と同等以上のコハク酸生産が認められた。一方、酢酸は消費濃度よりも高い初期濃度を要求し、嫌気条件での酢酸代謝に関わる Pta-Ack 経路の酢酸に対する親和性の低さが原因であると考えられた。当該無機塩酢酸培地・微妙気条件でジャー培養をおこない、コハク酸最終濃度 113.7 mM (13.4 g/L)、生産速度 0.43 mM/hr を達成した。またバイオディーゼル生産の副産物である粗グリセロールを用いても同等のコハク酸生産が認められた。

第 4 章では無機塩酢酸培地・微妙気条件でのコハク酸生成プロセスを解析した。グリセロール、酢酸塩、炭酸塩をそれぞれ ^{13}C 安定同位体でラベルし、発酵液を GC/MS で測定したところ、グリセロールからの炭酸固定によるコハク酸の生産が証明され、また酢酸は主にエタノールに代謝されることで NADH の再酸化に寄与すると示唆された。

第 5 章では第 4 章の結果をもとに微妙気条件での嫌気部分の代謝フローを算出した。グリセロールは収率 72%でコハク酸へと変換され 17%がピルビン酸として蓄積していた。その際の Redox Balance の充足率は 56.9%であるが、酢酸による NADH 再酸化を考慮すると 99.9%とほぼ理論値に達した。すなわち酢酸は NADH を再酸化し、ピルビン酸の蓄積に影響を受けた Redox Balance の正常化に寄与すると示された。

第 6 章では酢酸代謝経路の増強、及び炭酸固定経路の増強を試みた。酢酸に親和性の高い Acs 経路の導入は特に低濃度の酢酸添加時に有効であった。一方、炭酸固定酵素群の大発現はグルコースを原料とした報告と異なり、コハク酸生産に有効な結果を示さなかつた。

以上、本研究では栄養培地、無機塩培地双方でのグリセロールからの炭酸固定によるコハク酸生産を達成した。また粗グリセロールからのコハク酸生産にも成功し、バイオディーゼル産業に応用可能であると期待される。また無機塩酢酸培地におけるコハク酸生成プロセスをカーボン及び Redox Balance の両面から明らかとした。これらの知見は、学術上また応用上寄与するところが多い。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位にふさわしいと認めるものである。