

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292042

研究課題名(和文) 基幹C4化合物の発酵生産プロセス開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Microbial production of the useful C4 key compound

研究代表者

片岡 道彦 (KATAOKA, Michihiko)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：90252494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では組換え微生物を用い、グルコース等の糖源を出発原料とする基幹C4化合物の発酵生産プロセスの開発を行った。そのために基幹C4化合物の新規合成経路を設計し、経路内の各反応を司る酵素遺伝子の探索とそれらを集約した微生物の創出、宿主菌株の代謝改変、メタボローム解析等による人工合成経路の最適化、生産条件の最適化を行った結果、基幹C4化合物生産に向けた成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Using recombinant Escherichia coli, the fermentative production of the useful C4 key compound was examined. For this purpose, a novel biosynthetic pathway of the useful C4 key compound was designed, and then the enzymes catalyzing each reaction step were introduced into same E. coli cells. Furthermore, the gene disruption of the host E. coli cells and the optimization of fermentation were also examined.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物酵素

1. 研究開始当初の背景

近年、石油枯渇問題や石油価格の高騰、環境中の温室効果ガスの増加などが世界的な規模で問題となっており、特にエネルギーやポリマー生産の分野において、石油などの化石資源に過度に依存しない環境に配慮した物質生産法の開発が求められている。そして、再生可能な資源である植物バイオマスを出発原料とし、環境負荷の小さい微生物発酵技術を用いた各種物質の生産法が大きな注目を集めている。実際に燃料としてのエタノールをはじめとしてプラスチック原料モノマーとしてのコハク酸や乳酸、1,3-プロパンジオールの微生物を用いたバイオマス資源からの発酵生産については実用レベルにあり、今後もその種類や生産量は増加していくものと考えられる。

本研究で対象とする「基幹 C4 化合物」は、ポリエステル、ポリエーテル、ポリウレタン等の高機能性ポリマーの原料として使用されている C4 骨格を有する基幹ジオール化合物であり、その世界市場規模は 150-200 万トン/年に達し、今後もその需要は増加すると考えられている。基幹 C4 化合物は現在、その大部分が石油化学由来の原料より製造されており、バイオマス資源からの基幹 C4 化合物製造に関しては、バイオマス資源由来コハク酸の変換により製造されている例はあるもののその規模は小さく、バイオマス資源を原料とする効率的な基幹 C4 化合物発酵生産プロセスの開発は喫緊の課題である。これまでのバイオエタノールを中心とした燃料生産のためのバイオマス利用だけでなくポリマー原料としてのバイオマス利用が可能になれば、燃料と比べてより長期間の CO₂ 固定という面においても大きな効果が期待できる。

2. 研究の目的

このような情勢のもと、本研究では組換え微生物を用い、グルコース等の糖源を出発原料とする基幹 C4 化合物の発酵生産プロセスの開発を目指す。これまで自然界には基幹 C4 化合物を生成する微生物はおろか、基幹 C4 化合物をその中間体として含む代謝経路さえも見つかっていない。そのため、基幹 C4 化合物の発酵生産には、基幹 C4 化合物生合成経路を外部より導入するなどして生成能を付与した菌体の育種が必要となる。本研究では基幹 C4 化合物の新規生合成経路を設計し、経路内の各反応を司る酵素遺伝子の探索とそれらを集約した微生物の創出、基幹 C4 化合物生産のための宿主菌株の代謝改変、メタボローム解析とバイオインフォマティクスによる人工生合成経路の最適化、基幹 C4 化合物生産条件の最適化、といった検討を進めることにより、新しい基幹 C4 化合物発酵生産プロセスの構築を目指す。

現在、石油化学により生産されている化成品はその種類、使用用途ともに非常に多岐に

わたっており、そのすべてをバイオマス資源より発酵法によって製造するには、自然界から目的の物質を生産することができる微生物を探索し利用するだけでは、その量、質ともに不十分である。そのため、化石資源に依存した産業構造を再生可能なバイオマス資源を利用する産業構造へ変換するためには、自然界に存在する微生物では生産することのできない、あるいは生産量が非常に少ない物質を選択的にかつ効率的に生産することのできる微生物を取得・創出することが成功の鍵となる。こうした観点から、本研究のように目的物質を生合成するための人工的に設計した生合成経路を外部より導入した微生物を用いて有用物質を生産することが今後ますます重要になってくる。本研究と同様に人工的に設計した新たな生合成系を付与した組換え微生物による物質生産に関する研究開発も近年盛んに行われており、中でも米国 DuPont 社で開発された 1,3-プロパンジオールの発酵生産技術 (Nakamura, CE. & Whited, GM., *Curr. Opin. Biotech.*, 14:454-459 (2003)) は世界的な衝撃を与え、この分野の研究を加速させる結果となっている。

3. 研究の方法

本研究では、基幹 C4 化合物の人工生合成経路を組み込んだ遺伝子組換え微生物を分子育種し、それを用いた基幹 C4 化合物の効率的な発酵生産プロセスの構築を目指す。この目的において、これまでの検討で明らかとなった諸問題を解決するため、以下の項目の検討を進めた。

(1) 基幹 C4 化合物生産に向けた NADH 要求型アルデヒド還元酵素の探索・創出

基幹 C4 化合物生産のために設計した生合成経路の中で鍵となる反応を触媒する NADH 要求型アルデヒド脱水酵素に関して、高活性型の変異酵素を探索・創出することを試みた。大腸菌に対して遺伝子破壊を行い、NADH 消費が抑制され細胞内の酸化還元バランスが崩れることで、生育抑制が見られる変異株を取得した。この変異株を宿主として、基幹 C4 化合物生合成経路を司る酵素遺伝子 (アルデヒド脱水酵素遺伝子を除く) を導入するとともに、ランダム変異処理を行ったアルデヒド脱水酵素遺伝子を導入することで、NADH 消費が上昇し生育が回復した株を探索した。

(2) 基幹 C4 化合物人工生合成酵素系の最適化

本研究で想定している基幹 C4 化合物人工生合成経路内酵素反応の中でも、中間生成物を異性化・水和する反応を触媒する *Clostridium* 属細菌由来の脱水酵素は、酸素存在下で最大活性を示すものの、同時に酸素存在下で非可逆的に不活性化する性質を有している。一方、一部のアーキアが有していることが報告されている脱水酵素は

Clostridium 属細菌由来のものに比べて酸素感受性が低いことが報告されており、本研究で想定している微好氣的培養条件でも活性を有することが期待できる。そこで、アーキア由来の脱水酵素の基幹 C4 化合物生合成経路への適用を図る。

また、各酵素が触媒する反応ステップに関しても、本反応に適した性質を有する酵素の探索と適用を適宜試して評価していく。特に各酵素遺伝子の宿主菌への導入方法（プラスミドコピー数やゲノムへの組み込み）や使用するプロモーターの検討などを通して各酵素反応の力価調節を行い、基幹 C4 化合物生合成経路の最適化を試みる。

(3) 宿主菌株の代謝改変による副産物の生成抑制

これまでの検討で基幹 C4 化合物生合成経路を導入した組換え大腸菌の培養上清には、非導入株では確認できない副産物の著量蓄積が見られた。これは本経路の中間代謝産物が宿主菌株内在性の酸化還元酵素の機能により変換され生じていると推測される。そこで宿主大腸菌において本副産物生成反応に関与すると考えられる酵素遺伝子の破壊を試みる。また、乳酸、酢酸、エタノール、コハク酸などの有機酸の蓄積が見られた。そこで宿主菌株におけるこれらの物質を合成する酵素系遺伝子を破壊することで、菌体内における基幹 C4 化合物へ流れる炭素の流れを強化するとともに、それら有機酸の生成のために消費されていた還元力（還元型 NADH）の基幹 C4 化合物経路への供給強化が期待できる。

(4) 基幹 C4 化合物生産条件の最適化

基幹 C4 化合物人工生合成経路を付与した組換え大腸菌を用いて、基幹 C4 化合物生産量改善にむけた培養条件の検討を行う。出発基質であるグルコースの添加方法（添加濃度、流加培養等）、培養温度、pH 等に関して検討を加える。菌体の生育や反応のためのエネルギー獲得をより効率的に行うためには好氣的な培養が必要であるが、一方、基幹 C4 化合物生合成方向への代謝を強めるためには酸化的代謝ではなく還元的代謝が必要となる。したがって、これらの代謝（酸化還元）バランスを取るためには、酸素の供給条件が重要な役割を果たすと考えられる。酸素供給量とその他の培養条件を組み合わせる検討し、基幹 C4 化合物の生産性を向上させる培養条件の設定を行う。

4. 研究成果

(1) 基幹 C4 化合物生産に向けた NADH 要求型アルデヒド還元酵素の探索・創出

基幹 C4 化合物生産のために設計した生合成経路の中で鍵となる反応を触媒する NADH 要求型アルデヒド脱水酵素に関して、新たなスクリーニング方法を用いて高活性型の変異酵素を探索した。また、文献情報や既存データベースから同様の活性を示す候補酵

素遺伝子をクローニングし、スクリーニングを行った。その結果、高活性型の変異アルデヒド脱水酵素活性を示すいくつかの有望株が見出され、有意な活性上昇が認められた変異酵素を得ることができた。得られた変異酵素の解析を行い、基質特異性の高い酵素の創出を試みた。さらに、選別した酵素を親酵素として進化分子工学的手法やタンパク質工学的手法を用いた改良を繰り返して、高機能型酵素の創出へ向けた検討を進めた。

(2) 基幹 C4 化合物人工生合成酵素系の最適化

アーキア由来の脱水酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現系を構築した。本酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いて、基幹 C4 化合物生合成経路の強化を図った。

また、基幹 C4 化合物生合成経路上の酵素について、大腸菌内での異種発現効率を高め酵素活性を強めるために、導入する 3 種の酵素遺伝子の使用コドンで大腸菌の発現系に最適化した。さらに、大腸菌内での異種発現効率を高め酵素活性を強めるために、各酵素遺伝子の宿主菌株への導入方法やプロモーターの検討を行い、基幹 C4 化合物生合成経路の最適化を行った。

(3) 宿主菌株の代謝改変による副産物の生成抑制

宿主菌として想定している大腸菌において、基幹 C4 化合物の生合成経路内中間生成物の分解・代謝に関与するおそれのある酵素がいくつか存在している。これらの酵素遺伝子を単独または複数破壊した株を作成した。これに、基幹 C4 化合物生合成経路の導入を行った。具体的には、乳酸脱水酵素遺伝子 (*ldhA*)、酢酸キナーゼ、アセチルトランスフェラーゼ遺伝子オペロン (*ackApta*)、アルコール酸化還元酵素遺伝子 (*adhE*) 等の破壊による基幹 C4 化合物生産改善を検討し、いくつかの遺伝子破壊が基幹 C4 化合物の生産性向上に効果があることを示した。

(4) 基幹 C4 化合物生産条件の最適化

基幹 C4 化合物生合成経路を付与した組換え大腸菌株を用いて、基幹 C4 化合物生産量改善にむけた培養条件の検討を行った。培養温度、pH 等の培養条件に関する検討を行うとともに、菌体内の酸化還元バランスの調節するために、特に酸素供給量とその他の培養条件を組み合わせる検討し、基幹 C4 化合物の生産性を向上させる培養条件の検討を行った。その結果、酸素供給量が基幹 C4 化合物の生産性に大きく影響することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. Matsubara, N. Urano, S. Yamada, A. Narutaki, M. Fujii, M. Kataoka : Fermentative production of 1-propanol from D-glucose, L-rhamnose and glycerol

using recombinant *Escherichia coli*、
Journal of Bioscience and Bioengineering、
査読有、122, 2016, 421-426
DOI : 10.1016/j.jbiosc.2016.03.011

〔学会発表〕(計6件)

M. Kataoka, M. Matsubara :
Fermentative production of 1-propanol by
metabolically engineered *Escherichia coli*、
The 14th China-Japan-Korea Joint
Symposium on Enzyme Engineering, 2016
年11月16日～18日、南寧(中国)

松原充、浦野信行、鳴滝藍、山田尚平、
片岡道彦：代組換え大腸菌を用いたラムノー
スを出発基質とする1-プロパノール発酵生
産、第68回日本生物工学会大会、2016年9
月28日～30日、富山国際会議場(富山県・
富山市)

山田尚平、松原充、浦野信行、片岡道彦：
代謝改変した組換え大腸菌による1-プロパ
ノール発酵生産、日本農芸化学会関西支部第
495回講演会、2016年7月9日、大阪府立
大学(大阪府堺市)

M. Kataoka, M. Matsubara, N. Urano,
M. Fujii : Fermentative production of
1-propanol from glycerol using
metabolically engineered *Escherichia coli*、
Enzyme Engineering XXIII, 2015年9月6
日～11日、St. Petersburg, Florida (米国)

N. Urano, M. Matsubara, S. Yamada, M.
Kataoka : Fermentative production of
1-propanol using metabolically engineered
Escherichia coli、KMB2015、2015年6月
24日～26日、慶州(韓国)

M. Matsubara, N. Urano, M. Fujii, M.
Kataoka : Metabolic engineering of
Escherichia coli for fermentative
production of 1-propanol from glycerol、
Active Enzyme Molecule 2014、2014年12
月17日～19日、富山国際会議場(富山県・
富山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡道彦(KATAOKA Michihiko)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：90252494