



D-Lactic Acid Production by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*

遺伝子組換え酵母によるD-乳酸生産

(JBB, Vol. 101, No. 2, 172-177, 2006)

石田 亘広*・鈴木登美子・徳弘 健郎・長森 英二
大西 徹・齋藤 聡志・北本勝ひこ・高橋 治雄

石油資源の枯渇対策や地球温暖化問題、さらに廃棄物処理における難分解性物質などの環境問題により、化石燃料に依存したCO₂排出型社会からCO₂循環型社会(カーボンニュートラル)への転換が21世紀の重要課題として取り上げられている。中でも、ポリ乳酸をはじめとする植物由来プラスチックが注目されており、農業用シートや家電材料の一部として実用化されているほか、自動車用材料としても、スペアタイヤカバーやフロアマットなどに利用され始めている。しかしながら、ポリ乳酸を汎用性プラスチック並みに展開するためには、物性の向上(耐熱性や耐衝撃性など)と、発酵生産から精製、重合に至るまでのコスト低減という二つの大きな課題が指摘されている。

ポリ乳酸は、他の植物由来プラスチックに比べ透明性が高く、高い融点(約170°C)とガラス転移点(約56°C)を有するにも関わらず、実用上の耐熱性はきわめて低いという課題を抱えている。耐熱性を高めるために、層状ケイ酸塩とのナノコンポジット化やケナフ繊維添加による方法が報告されているが、一方で、L-乳酸の光学異性体として知られるD-乳酸のポリマー(PDLA)をL-乳酸ポリマー(PLLA)と混合させると、ポリ乳酸の耐熱性が向上することが報告されている¹⁾。PLLA, PDLAの作るらせん構造は互に対称であり、両者を混合するとステレオコンプレックスが形成され(図1)、ホモポリマーとは異なる結晶を形成する。この結晶の融点はPLLAに比べ約50°C上昇するため、ステレオコンプレックス化ポリ乳酸は、耐熱性を高める手段として大きく期待されている。しかしながら、L-乳酸を高生産する微生物の報告例と比べると、D-乳酸を効率よく生産できる微生物の報告は少なく、さらにステレオコンプレックスの形成には、高光学純度のD-乳酸でなければならない。一般に光学異性体を分離する技術として、光学分割カラムによる方法が知られるが、異性体分割用担体が高価であるため、高い光学純度を維持したD-乳酸の新しい生産技術が必要とされていた。

我々はこれまでに、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中にL-乳酸脱水素酵素遺伝子(L-LDH)を導入し、高効率かつ、高純度なL-乳酸生産系について報告している²⁾。本手法は、エタノール生産に関与するピルビン酸脱炭酸

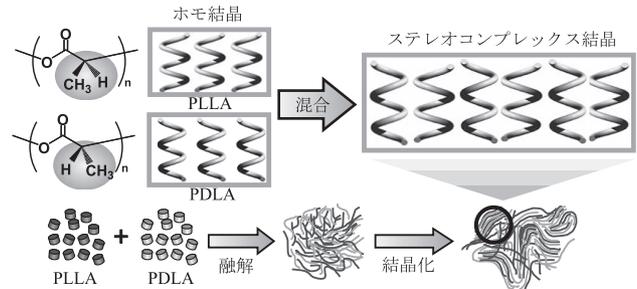


図1. ポリ乳酸のステレオコンプレックス化

酵素遺伝子(PDC)に注目し、*S. cerevisiae*染色体上のPDC1を破壊しつつ、本プロモーターのすぐ下流にL-LDHを導入し、内在性のPDC1プロモーター制御下でL-LDHが発現することを特徴としている。

そこで本論文では、上記技術を応用して、遺伝子組換え酵母による高光学純度D-乳酸の生産系を試みた。D-乳酸を生産する乳酸菌(*Leuconostoc mesenteroides*)よりD-LDH遺伝子を新たに取得し、これを上述と同様の手法で、高いアルコール発酵能をもちホモタリク株であるワイン酵母OC-2株の染色体中に導入した遺伝子組換え酵母を作製した。グルコース濃度100 g/lのYPD培養液において、炭酸カルシウムにて中和しながら発酵試験を試みた結果、光学純度99.9%以上の高純度D-乳酸塩を61.5 g/l生産できることを確認した。さらに酵母は、バクテリアと比較して酸耐性能が高いことから、脱塩を必要としないフリーのD-乳酸生産も期待できる。そこで、本組換え酵母を非中和条件下で試験した結果、最大で54.2 g/lのフリーD-乳酸を生産することができた。

今後、L-乳酸生産酵母での検討^{3,4)}と同じように、D-LDH遺伝子の複数コピー導入や、酵母における代謝経路の制御を展開することで、D-乳酸生産能をさら高めた組換え酵母の改良も可能であると考えている。

- 1) Tsuji, H. et al.: *Macromolecules*, **24**, 5651 (1991).
- 2) Ishida, N. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1964 (2005).
- 3) Saitoh, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2789 (2005).
- 4) Ishida, N. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 1148 (2006).

* 著者紹介 (株)豊田中央研究所 材料分野バイオ研究室(研究員) E-mail: e1168@mosk.tytlabs.co.jp