

## ホモブタノール発酵への挑戦

中山 俊一

*Clostridium* 属細菌によって生産されるブタノールは、ガソリンと性質が類似しており石油代替バイオ燃料として注目されている。また、各種化成品の出発原料でもあることからブタノールの生産は循環型社会の形成に大きく貢献すると期待される。*Clostridium* 属細菌によるブタノール生産は回分培養で最大 15 g/l 程度であり、その際副産物としてアセトンやエタノールを生産する（このためアセトン・ブタノール発酵と称される）。この生成比はブタノール：アセトン：エタノール = 6：3：1 程度であり、現行の菌株ではアセトンやエタノールなどの副産物とブタノールを分離する際コストがかかるため、副産物を生産しない菌株の開発が求められている。

副産物であるアセトン生産量を低減するために、ブタノール生産性 *Clostridium acetobutylicum* においてアセトン生成に関与する acetoacetate decarboxylase (*adc*) の遺伝子破壊株が取得された<sup>2)</sup>。この破壊株ではアセトン生産量が 0.1 g/l まで低減し全溶剤に占めるブタノール比が 15% 増加したものの、エタノールや酢酸の生産量が増加した（特に酢酸は親株の 7 倍以上増加）。この酢酸増加の原因は、細胞内の還元力のバランスを整えるためだと考えられる。1 分子のブタノール生成には還元力として 4 分子の NADH が必要であるが、解糖系とピルビン酸酸化で生じる NADH はおよそ 3 分子であるため（通常 4 分子の NADH が生成されるが 1 分子分は水素として廃棄される）、1 分子のグルコースから 1 分子のブタノールを生成するには還元力が不足する。このため、*Clostridium* 属細菌は還元力を必要としないアセトンを生成することで、還元力不足のためブタノールへと変換できない炭素をアセトンとして処理している。つまり、アセトン生合成遺伝子が破壊されたことにより、余剰炭素が行き場を失い、結果として酢酸生産量が増加したと考えられた。

ブタノール生産の駆動力の一つである還元力は、異種菌株を用いたブタノール生産の場合でも同様に重要な因子である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でブタノール生合成遺伝子群を発現した場合、最終的なブタノール生産量は 2.5 mg/l であり<sup>3)</sup>、乳酸菌 *Lactobacillus brevis* を用いた場合でも 0.3 g/l 程度と *Clostridium* 属細菌に及ばなかった<sup>4)</sup>。このように、ブタノール生合成遺伝子を導入するだけでは高いブタノール生産は期待できない。

一方、大腸菌において電子バランスを変えるなど大幅に代謝改変することで *Clostridium* 属細菌と同程度の生

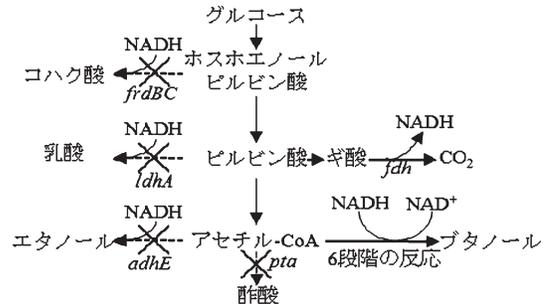


図1. 大腸菌における高ブタノール生産戦略

産性を示す菌株が育種された（育種戦略の概略を図1に示す<sup>5)</sup>。前述の通り、ブタノール生産には還元力として NADH が必要となる。そのため、NADH を消費する fumarate reductase (*frdBC*), lactate dehydrogenase (*ldhA*), aldehyde dehydrogenase (*adhE*) 遺伝子を破壊した。さらに、phosphotransacetylase (*pta*) 遺伝子を破壊しアセチル-CoA からの酢酸生成を遮断した。これを宿主に、NADH を生成する formate dehydrogenase (*fdh*) 遺伝子、アセチル-CoA からブタノールを合成する遺伝子群を発現させた。この育種株は回分培養で 15 g/l のブタノールを生産し、野生株のブタノール生産菌とほぼ同等の生産量を示した。さらに、培養液からブタノールを分離回収できるガスストリッピング法を組み合わせ、ブタノール毒性を回避することで最大 30 g/l のブタノールを生産した（収率は最大 70%）。

このように、ブタノール生成の駆動力である NADH を確保しブタノール生成のみに反応を向かわせる代謝経路を設計することができれば、異種菌株でも副産物を低減したブタノール生産が期待される。ブタノール生産のもう一つの課題はブタノールの毒性による生育阻害であるが、ブタノール耐性能の高い菌株を用い、これらの知見を基に改変すれば *Clostridium* 属細菌よりも高い収率・収量でのブタノール生産が可能となるかもしれない。

- 1) 左右田ら：発酵ハンドブック，共立出版（2001）。
- 2) Jiang, Y. et al.: *Metab. Eng.*, **11**, 284 (2009).
- 3) Steen, E. J. et al.: *Microb. Cell Fact.*, **7**, 36 (2008).
- 4) Berezina, O. V. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 635 (2010).
- 5) Shen, C. R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 2905 (2011).