

3-ヒドロキシプロピオン酸, 1,3-プロパンジオールの併産

向山 正治*・堀川 洋

近年再生可能資源からの化学品合成の研究が欧米を中心に進められてきており、移動体燃料としてのエタノールに加えてプラスチック原料モノマーとしてのコハク酸や1,3-プロパンジオール(1,3-PD)の発酵生産が実用化されている。しかしながら日本においてはようやく研究が盛んになってきたところである。

弊社では植物油脂を原料としたバイオディーゼル燃料(BDF)製造のための無機固体触媒の開発、およびこれを利用したBDF製造プロセスの開発を行っており¹⁾このプロセスから排出される高純度グリセリンを利用し、微生物の発酵によって有用物質へ変換する研究に取り組んでいる。

嫌気性菌によるグリセリン利用システム

グリセリンは大腸菌など大部分の微生物を好気的な条件で培養する際にはグルコースに次ぐ良好な炭素源となるが嫌気的な条件下ではグルコースに比べて還元度が一段高いためグルコースと同様の発酵を行うことができない²⁾。グリセリンを炭素源に用いた場合には炭素3個あたりのユニットで見るとグルコースよりもNADH換算で1分子分還元度が高くなっており、乳酸やエタノールへの代謝のみではグリセリン1モルからの代謝で生成したNADHが1モル残存してしまうため細胞内にNADHが蓄積しNADが足りなくなることによって代謝が停止してしまうなどの影響が生じるため、表面的にはグリセリンで嫌気的に生育しないなどの現象が観察される²⁾。

グリセリンを嫌気条件下で発酵する微生物としては *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus reuteri* などが知られている。これらの微生物は pdu オペロンと呼ばれるプロパンジオール利用オペロンをゲノム上に持っており、グリセリンは脱水素されてジヒドロキシアセトン(DHA)となる。この際に1分子のNADHが生成する。これと並行してもう一分子のグリセリンがグリセロールデヒドラターゼ(GD), あるいはジオールデヒドラターゼ(DD)と呼ばれるグリセリン脱水活性を持った酵素によって3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(3-HPA)となった後、アルデヒドがNADHで還元されて1,3-PDとなる。このグリセリン2分子から誘導されるDHAと1,3-PDまでの過程では反応に関与するNADHとNAD

の量が一致しているため、細胞内の酸化還元バランスがとれていることになる。DHAはその後、リン酸化、異性化を経て解糖系へと入っていく。この過程でグリセロールアルデヒド-3-リン酸を脱水素する際にNADHが1分子生成するがこれはピルビン酸を乳酸に還元する反応、あるいは脱炭酸を経た後エタノールに還元する反応に消費することで細胞内NADHバランスが保たれるようになっている。このような発酵形式のため、通常、グリセリン嫌気利用の系では有価物として回収できるのは1,3-PDのみとなり、原料であるグリセリンからの収率は50%程度となる³⁾。このような細胞内のNADHのバランス(酸化還元バランス)を保った条件設定の下でグリセリンを原料とした生成物すべてを有価物として回収できる新しいタイプの発酵を構築できないかと考えた。

1,3-プロパンジオールと 3-ヒドロキシプロピオン酸(3-HPAc)

1,3-PDはデュポン社が組み換え大腸菌を用いた発酵法を開発しており、ポリエステルやポリウレタン原料として有用である。特に、炭素鎖3つ(C3)のユニットを持つ、ポリトリメチレンテレフタレートは、繊維に加工したときの柔らかさや、還元性など、C4のポリエステルとは異なる物理的性質を有しているため、高級織物、耐久性繊維などの分野での利用が広まってきている⁴⁾。

一方、3-HPAcは乳酸の異性体にあたり生分解性ポリエステルモノマーの一つであるとともに、クエン酸やリンゴ酸のカルシウム塩より溶解度が優れていることから、生分解性スケール防止剤や生分解性スケール除去剤用途にも使用の可能性が模索されている。また3-HPAcのエステルは乳酸と同様に溶媒あるいは界面活性剤としての用途も期待されている。さらに、3-HPAcを脱水するとアクリル酸が得られる⁵⁾。アクリル酸は、現在プロピレンの酸化によって生産されており、高吸水性樹脂や分散剤などの水処理剤、洗剤添加剤、塗料などの原料として、世界で400万トンの需要がある。また、3-HPAcを化学的に還元すると1,3-PDへと変換することができ、1,3-PDの片末端を酸化してカルボン酸にすればすべてを3-HPAc、そしてアクリル酸にすることもできる(図1)。

グリセリンの酸化還元不均化 *K. pneumoniae* や *L.*

*著者紹介 株式会社日本触媒 GSC 触媒技術研究所 (主任研究員) E-mail: masaharu_mukoyama@shokubai.co.jp

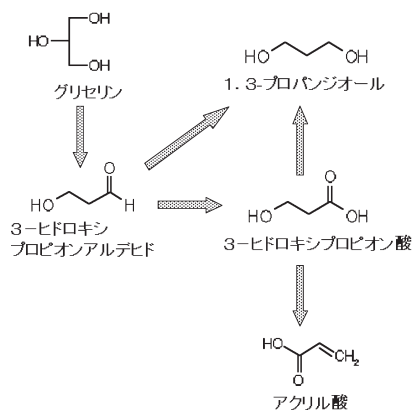


図1. グリセリンからの化学品変換ルート

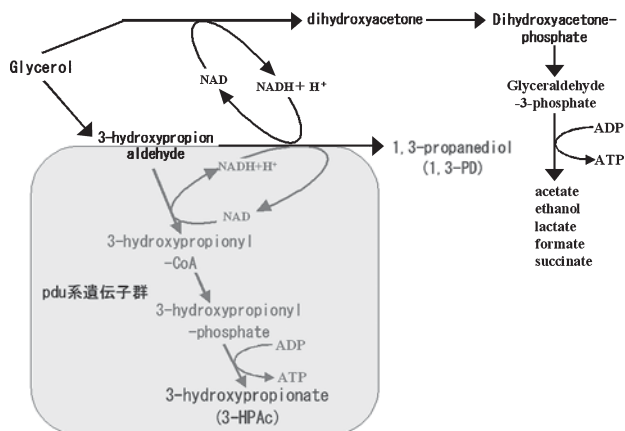


図2. 嫌気条件下でのグリセリン代謝と不均化反応

*reuteri*がグリセリンを利用するために行うグリセリンの脱水反応では3-HPAが生成する。通常、アルデヒドは酸化するとカルボン酸に、還元するとアルコールとなるが、2分子のアルデヒドを酸化還元不均化するするとグリセリンから1,3-PDと3-HPAcを等モル生成させることができる。微生物が嫌気条件下で有機化合物を代謝して特定の化合物に変換する際にATPを生成して生命活動のエネルギーとして利用するとともに代謝中間体から生体成分を合成して自立的に増殖する現象を発酵と解釈するとこの脱水・酸化還元不均化反応のみではATPの生成がないため生命活動を営むには不十分である。

嫌気条件下で1,2-プロパンジオール (1,2-PD) を炭素源として利用する系 (pduオペロン) では1,2-PDを脱水して生成するプロピオンアルデヒドの1分子をプロパノールに還元するとともにもう1分子のプロピオンアルデヒドをCoA依存型のデヒドロゲナーゼで脱水素するとともにキナーゼの作用によってプロピオン酸とATPを生成することが示されている³⁾。この系を利用すればグリセリンを基質とした場合にも同様の代謝を受けると期待され、生命活動のためのATPも供給できる可能性が考えられた。

酸化還元不均化反応に用いる酵素 グリセリンを脱水する酵素はGDとDDの2種類が存在するが、両酵素ともにサブユニット3個からなっており、活性型のビタミンB12であるアデノシルコバラミン (Ado-cbl) を補因子として要求する。また、Ado-cblが結合したホロ酵素はある割合でグリセリンの脱水反応の際に不可逆的に不活性化するが、再活性化因子と呼ばれるATP依存のシャペロン様タンパクの作用によって不活性化型になったコバラミン部分のみを交換することによって活性型のホロ酵素に再活性化することができる。この再活性化因子

はグリセロールデヒドラターゼに特有のもの (GDR) とジオールデヒドラターゼに特有のもの (DDR) が存在し、ともにサブユニット2つからなっている³⁾。

これらの酵素の作用によって生成した3-HPAから1,3-PD、3-HPAcへの酸化還元不均化反応において3-HPAcへの酸化反応にCoA依存型のデヒドロゲナーゼによる3-ヒドロキシプロピオンil CoA、3-ヒドロキシプロピオンilリン酸を経たATPと3-HPAcが生成する系を機能させることができればATPが供給できるようになるため、生物として生きていくためのエネルギーを供給しながら反応が行える可能性が出てくる。このような考えに基づいて*K. pneumoniae*、*L. reuteri*を利用した併産方法の開発を進めた (図2)。

pduオペロンとポリヘデラルボディー グリセリンを脱水する酵素系GDとGDRは*K. pneumoniae*のdhaレギュロンにコードされている。一方DDとDDRは*K. pneumoniae*、*L. reuteri*ともにpduオペロンにコードされており、*K. pneumoniae*は両方の系を持っている。

*K. pneumoniae*のdhaレギュロンについては虎谷らによって詳細に解析され³⁾また*K. pneumoniae* ATCC25955株についてはワシントン大学でゲノム解析が行われた⁶⁾。

L. reuteri JCM1112株では麻布大学の森田らによってゲノム解析が行われた⁷⁾。

グリセリンから1,3-PDと3-HPAcの生成の経路においてグリセリンの脱水反応で生成する3-HPAは、一般のアルデヒド化合物と同様に生物に対する毒性を有している。現在知られている1,3-PDの発酵微生物の多くは、この3-HPAの毒性から生体システムを守るためと考えられるポリヘデラルボディーというタンパク質からなる構造体を有している。グリセリン脱水酵素ほかの酵素がポリヘデラルボディーに存在していると考えられており、

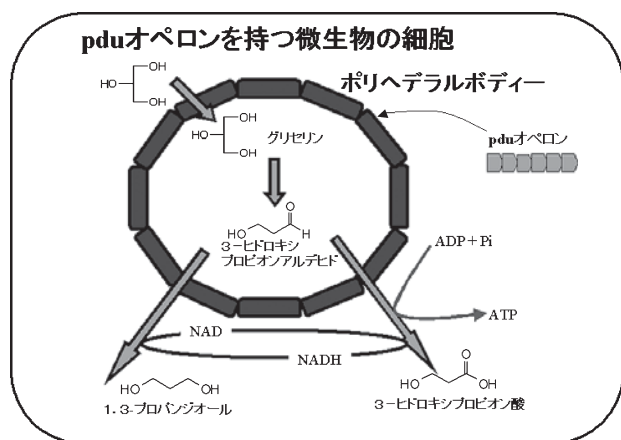


図3. ポリヘデラルボディーの構造と機能のイメージ

脱水反応で生成したアルデヒドはポリヘデラルボディー内で次の反応へと進められることで毒性の低いアルコールとカルボン酸に変換されていると思われる⁸⁾。ポリヘデラルボディーの構成タンパク質およびグリセリンの代謝関連の酵素遺伝子の大部分はpduオペロンに存在している³⁾ (図3)。

*K. pneumoniae*はクラス2に分類される病原性菌であるが*L. reuteri* JCM1112株は食品生産にも使用されている安全な微生物であり、Ado-bclの生合成系も持っているため、この株を宿主とした検討を進めた。

L. reuteri JCM1112株の培養解析 *L. reuteri* JCM1112野生株をグリセリンを含んだMRS培地で培養した菌体を用いてマイクロアレイとリアルタイムPCRを用いて遺伝子発現レベルを解析をした^{9,10)}。その結果、*L. reuteri*のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(*pduP*)の発現を高めることによって1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼとプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼの間で酸化還元バランスがとれ、1,3-PDと3-HPAcの併産が可能になると予測された。そこで、グリセリンの添加によって発現上昇した遺伝子、定常的に高発現している遺伝子を検索し、そのプロモーターを*pduP*のプロモーターとして導入し、グリセリンのみを炭素源とした培地での発現上昇を検討したが、プロモーターを交換した*pduP*を導入した株で*pduP*遺伝子発現レベルが低下する結果となった。炭素源としてグリセリンのみ、あるいはグリセリンにグルコースを併用した培養試験、発現解析の結果から*pduP*はグルコースとグリセリンが共存していないと転写誘導を受けないことが明らかとなった。

L. reuteri JCM1112株での1,3-PDと3-HPAc併産培養 *pduP*遺伝子の発現にグルコースの添加が必須で

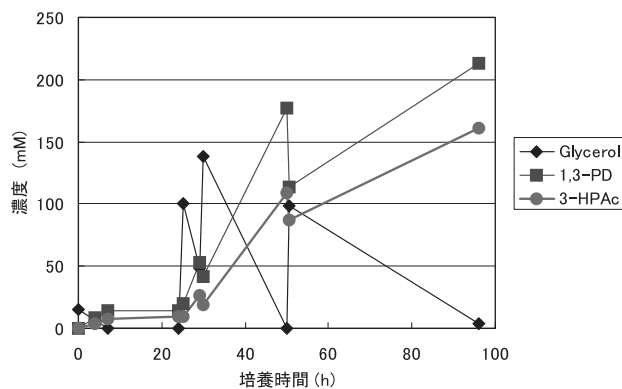


図4. グリセリン・グルコース逐次添加培養での1,3-PD, 3-HPAc生成

あったことから、グリセリンとグルコースを炭素源とした培養条件の検討を行った^{9,10)}。0.2Mグリセリン+0.1Mグルコースを炭素源としたMRS培地で培養を行うと消費したグリセリンの75%が1,3-PDに、4.5%が3-HPAcに変換された。

培養系のpHを7.0に維持して培養したところグリセリンからの3-HPAc収率が13%にアップし、グリセリンの転化率は100%となった。この結果を踏まえて0.6 Mグリセリンと0.4 Mグルコースを含むMRS培地を逐次添加したところ、グリセリンの消費と1,3-PDの生成、3-HPAcの生成が継続し、特に3-HPAc収率が30-40%にアップした(図4)。グリセリン添加のインターバルを短くした場合、グリセリンの消費速度、1,3-PD、3-HPAcの生成速度が大きくなるとともに、菌体生育が停止してからも変換反応が継続するようになった。この結果から1,3-PDと3-HPAcの生成系は増殖と連動しなくても機能すると考えられ、反応を継続させるためにはグルコースの供給による菌体の活性維持が重要であると考えられた。センサーでモニタリングしながら培養系内のグリセリンの濃度を50 mMにコントロールしながらグリセリンとグルコースをフィードする方法で培養したところ、消費されたグリセリンは脱水反応後ほぼ定量的に1,3-PDと3-HPAcに不均化され、グリセリンから1,3-PDと3-HPAcへの酸化還元バランス不均化反応を行うことができるようになった(図5)。

今後の方向

現在までの検討でグリセリンから1,3-PDと3-HPAcへの酸化還元不均化反応を行うことができるようになったが、現状ではこの反応にグルコースの添加が必須である。*L. reuteri* JCM1112株はヘテロ発酵型の乳酸菌であ

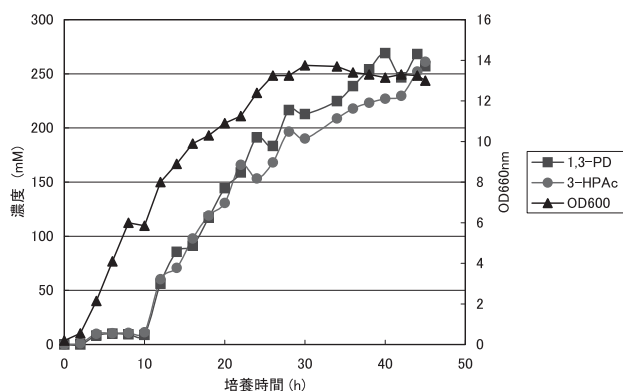


図5. グリセリン・グルコースを連続フィードした培養での1,3-PD, 3-HPAc生成

るためグルコースが代謝されて生成する乳酸と酢酸，エタノールが副生する。特に乳酸は3-HPAcの異性体であるので分離精製の工程ではほぼ同じ挙動を示す。使用原料や分離精製の面からもグリセリンの脱水反応，酸化還元不均化反応がグルコース非存在下でも機能するように菌株を改良していくことが今後の課題である。

おわりに

バイオマス資源から化学品を製造する目的でバイオ技術が利用された歴史は非常に古い。しかし石油化学の時代になって安全性，コスト面に対抗できない用途以外では石油化学の方法に置き換わり，当時の実際の技術を知る人も少なくなっているのも現実である。近年の石油高騰・枯渇，地球温暖化抑制の観点から，旧来の発酵

にくわえて最新の微生物改良技術，培養技術を駆使して再生可能資源であるバイオマスを利用した化学品製造の研究が盛んになってきている。

これら発酵のための微生物触媒の開発もさることながら，生成物を培養の媒体である水溶液から効率よく分離する方法も非常に重要であり，この分野の今後の広がり の鍵を握っているといても過言ではない。物理化学的な過程・平衡をうまく利用した分離技術の発展にも期待したい。

最後に，本研究の一部は岡山大学工学部虎谷哲夫教授，麻布大学獣医学科森田英利准教授との共同研究で行われました。本研究の推進にあたって多大なご指導ご鞭撻をいただきましたことに深謝申し上げます。

本研究の一部はNEDOバイオプロセス実用化プロジェクトの一環として行われました。

文 献

- 1) 奥智 治：触媒，**50**, 397 (2008).
- 2) Sprenger, G. A. *et al.*: *Gen. Microbiol.*, **135**, 1255 (1989).
- 3) Toraya, T.: *Chem. Rev.*, **103**, 2095 (2003).
- 4) イー・アイ・デュボン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー：特表2007-501324
- 5) カーギル インコーポレイテッド：特表2004-532855
- 6) Gene Bank accession: No. CP000647
- 7) Morita, H. *et al.*: *DNA Res.*, **15**, 151 (2008).
- 8) Havemann, G. D. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **185**, 5086 (2003).
- 9) 安田信三ら：特開2005-278414
- 10) 安田信三ら：特開2005-304362