

# 非可食資源を利用した化学物質生産に向けて

和田 光史

コーンやサトウキビなどの可食資源から発酵で作られるエタノール生産量は、米国やブラジルを中心に今や世界で年間8000万klを越えるレベルにある。その一方、食糧との競合を避けるために木や草などの非可食資源を利用しようという動きも活発化している。しかし用いるバイオマスを何にするのか、さらにはその収集や、前処理・糖化にかかるコストの削減など、実用化に向けて解決すべき課題は少なくない。

発酵生産されたエタノールは主に自動車用燃料として利用されているが、非可食資源から単に燃料を作るのみならず、さまざまな有用化学製品を生産しようという動きもここ数年飛躍的な広がりを見せている。代表的ものだけでも、コハク酸、アジピン酸、アクリル酸、イタコン酸、ファルネセン、イソブタノール、1,4-ブタンジオールなどがあり、これら非可食資源由来の化学物質を実用化すべく、世界中で鎬が削られている。

三井化学においても、「製品を通じた地球環境への貢献追求」を長期経営目標の一つに掲げ、非可食資源を利用してD-乳酸、イソプロピルアルコール (IPA)、グリコール酸、デオキシシロイノソース (DOI) といった化学物質を生産し、それらを早期に実用化することを目指している (図1)。実用化の鍵となるのは、原料の糖を効率よく目的化学品へと変換する微生物 (生体触媒) である。そこで本稿では、上記化学物質それぞれを効率よく生産する組換え大腸菌について、筆者らがどのような過程を経ながら作出するに至ったかを概説したい。なお紙面の都合上、DOIについては割愛させて頂くことをお許し頂きたい。

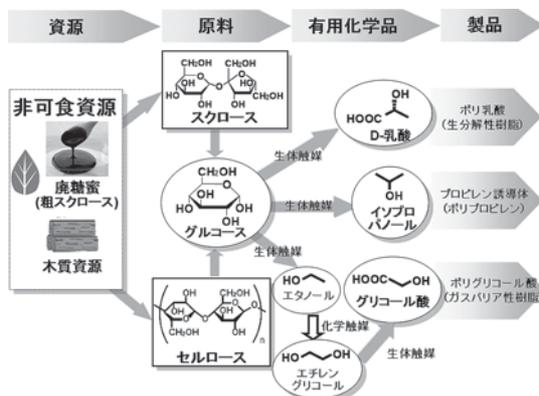


図1. 三井化学の非可食資源を利用した化学物質生産

## D-乳酸

**選択率と蓄積濃度の向上** 現在上市されているポリ乳酸はL-乳酸のポリマーであるが、低融点のために用途が限定的である。D-乳酸はL-乳酸ポリマーの改質剤として注目されており、もし高品質かつ安価なD-乳酸の供給が可能になれば、D-乳酸は勿論、L-乳酸の需要も高まると期待されている。

筆者らは、野生型大腸菌の代謝反応を遺伝子レベルで改変 (代謝工学的改変) することにより、D-乳酸を高選択的に高生産する組換え大腸菌を創出しようと考えた。野生型の大腸菌MG1655はD-乳酸を生産するが、グルコースを原料として24時間培養した時のD-乳酸選択率が僅か60%、蓄積濃度が45 g/lと低かった。そこでまず選択率を上げるために、主たる副生物である酢酸、ギ酸、コハク酸、フマル酸、ピルビン酸の生合成に関わる遺伝子を破壊した。結果的には4種の遺伝子、すなわちピルビン酸ギ酸リアーゼ (pfl)、NAD非依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldd)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (mdh)、アスパラギン酸アンモニアリアーゼ (aspA) の4種の酵素遺伝子を破壊することによって、D-乳酸選択率を99%以上まで高めることができた。また蓄積濃度向上については、グルコースからD-乳酸に至るまでの10工程の代謝反応のうちで、ピルビン酸からD-乳酸への反応を触媒するNADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) が律速酵素であることを突き止め、この遺伝子発現を強化することによって24時間で100 g/lを越える蓄積濃度を達成した<sup>1)</sup>。

**光学純度の向上** 次なる課題として浮上したのが、工業用培地原料として用いるコーンステープリカー (CSL) 中のL-乳酸の存在であった。工業生産において安価原料を使うことは必須であるが、CSLを使うとどうしてもD-乳酸の光学純度が98%ee程度と低くなってしまふ。そこで筆者らは、L-乳酸を特異的にピルビン酸に変換する2種類の酵素、すなわちNAD非依存性L-乳酸デヒドロゲナーゼ (lldD) とエンテロコッカス属細菌由来のL-乳酸オキシダーゼ (lox) の2遺伝子をD-乳酸生産大腸菌に導入することによって、24時間培養後に光学純度99.5%ee以上を達成した<sup>2)</sup>。

**スクロース資化能力の付与** さらなる課題は、野生型大腸菌MG1655がサトウキビや甜菜から得られるスクロースを資化できないことであった。筆者らは、スクロース分解酵素 (cscA) を導入することによって、スクロースも原料として利用可能とした<sup>3)</sup>。参考までにス

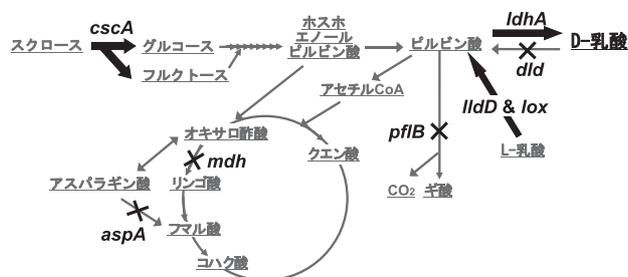


図2. D-乳酸生産大腸菌の代謝反応模式図。×印は遺伝子破壊, 黒色太矢印は遺伝子導入を表す。

クロースからD-乳酸に至る生合成反応経路の概要を図2に示す。

### イソプロピルアルコール (IPA)

**IPA生産大腸菌の構築** 既存プラスチックの原料転換を図る場合、まずターゲットとして魅力あるものはポリエチレン (PE)、ポリプロピレン (PP) といった超汎用プラスチックであろう。PEは世界で約1億トン、PPは約7千万トン生産されており、それらが植物原料から作られた場合のインパクトは絶大である。バイオPEに関しては、プラスチックが、バイオエタノールを原料とした商業生産 (年産20万トン) を2011年に開始した。一方バイオPPについては、いまだ実用化の目処が立っていない状況である。筆者らは、植物からイソプロピルアルコール (IPA) がエタノール並みに生産できれば、IPAの脱水によって安価なバイオプロピレン、さらにはバイオPPが可能となると考え、その第一歩としてIPAを効率よく生産する微生物の構築に着手した。宿主として野生型大腸菌を採用した。自然界に存在する微生物の中でIPAを生産するものはクロストリジウム属細菌であるが、IPA最高生産性が7.2 g/lと低く、また副生物としてブタノールを多量に生産することがIPA生産上の問題となっていた。一方大腸菌は、IPAやブタノールをまったく生産せず、宿主としてのポテンシャルはクロストリジウム属細菌より高いと思われた。そこで筆者らは、アセチルCoAからIPAに至る4工程の反応を触媒する各酵素、すなわちチオラーゼ (atoB)、CoAトランスフェラーゼ (atoDA)、アセト酢酸デカルボキシラーゼ (adc)、IPAデヒドロゲナーゼ (idh) の各遺伝子を野生型大腸菌B株に組み込み、大腸菌によるIPA生産に成功した。しかし蓄積濃度は5.0 g/lと低いものであった<sup>4)</sup>。

**IPA培養システム** 筆者らの最終目標は、IPA生産性をエタノール並みにすることである。大腸菌はIPAによって生育阻害を受けるため、培地中にIPAを高蓄積させることはできない。筆者らは、培地中のIPA濃度を低く維持させながら、高いIPA生産性を実現するためのIPA培養システムを考案した。図3のように、筆者らが考案した培養システムは通気システムを備えた培養装置

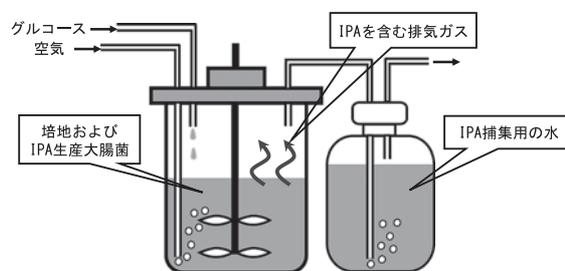


図3. IPA培養システム模式図。発酵槽内で発生した排気ガス (IPAを含む) を捕集用水にバブリングさせ、IPAを捕集する。

を用いることにより、排気ガス中に含まれるIPAを水でトラップするというものである。ちなみに本稿で言うIPA生産性とは、培地およびトラップ水に含まれるIPA量を足し合わせ、初発の培地量で割った値である。

**IPA生産性の向上** IPA生産性を高めるため、まず培地組成を見直した。結果として窒素源を補充することでIPA生産性を28 g/lにまで高めた。さらなる向上を図るため、大腸菌の代謝工学的改変を行った。結果として2通りの改変を行った。1つ目は、グルコースからホスホエノールピルビン酸→オキサロ酢酸→リンゴ酸→ピルビン酸→アセチルCoAを経由してIPAに至るルート<sup>5)</sup> (リンゴ酸合成酵素 maeB がキーとなることから maeB ルートと呼ぶ)、二つ目はグルコースからエントナー・ドウドロフ経路 (ED経路) に入り、ピルビン酸→アセチルCoAを経由してIPAに至るルート<sup>6)</sup> (EDルートと呼ぶ) である。maeB経路を強化したIPA生産大腸菌の代謝反応については図4にまとめた。リンゴ酸→ピルビン酸の反応を触媒するリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (maeB) 活性を増強すると同時に、IPA生成に必要なNADPHを補充するため、NADH→NADPHの反応を触媒するトランスヒドロゲナーゼ (pnt) 活性を増強した。その結果、IPA生産性は48時間培養で113 g/lに達した。なおEDルートについては現在検討中である。

### グリコール酸 (GA)

**GA生産大腸菌の構築** グリコール酸 (GA) の重合によって得られるポリグリコール酸 (PGA) は、その高いガスバリアー性からペットボトル材料として注目されてきた。しかし近年、シェールガス採掘用材料としても脚光を浴びている。筆者らは、野生型大腸菌がエチレングリコールを酸化してGAを生成する能力があることに着目し、その能力を高めることによって効率のよいGA生産大腸菌に生まれ変わると期待して実験に着手した。エチレングリコール→グリコールアルデヒド→GAの反応を触媒する2種類の酵素、ラクトアルデヒドレダクターゼ (fucO) とラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aldA) を大腸菌MG1655にセルフクローニングした。この大腸菌を培養して増殖させ遠心して集めた菌体を、

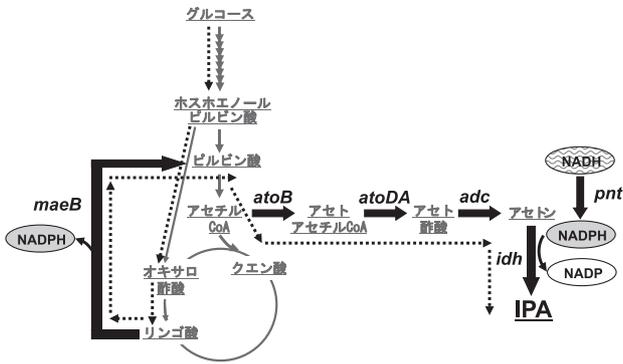


図4. maeBルートを強化したIPA生産大腸菌の代謝反応模式図。黒色太矢印は遺伝子導入を表し、点線矢印はグルコースからIPAへの代謝の流れを示す。

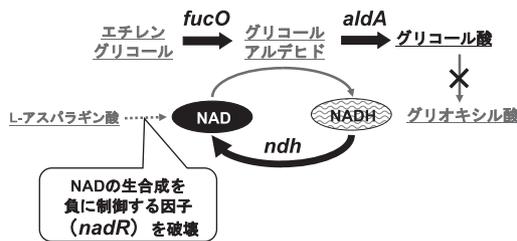


図5. グリコール酸生産大腸菌の代謝反応模式図。×印は遺伝子 (glcDEF) 破壊, 黒色太矢印は遺伝子導入を表す。

エチレングリコール水溶液を満たしたジャーファーマンターに添加して培養した。その結果、野生型大腸菌では44時間でGA蓄積濃度1.8 g/lに対して、構築した株では22時間で110 g/lと劇的な生産性向上を実現した<sup>7)</sup>。

さらに大腸菌に内在するグリコール酸オキシダーゼ (glcDEF) の遺伝子を破壊した(図5)。ちなみにglcDEFはGAからグリオキシル酸への反応を触媒する酵素である。その結果、GA生産性は22時間で120 g/lに達した。

**補酵素再生システムの導入** 上記の試みによって、単位時間当たりのGA蓄積濃度は飛躍的に向上した。しかしながら筆者らのGA生産法は発酵法ではなく、一度集菌した菌体を酵素として用いる酵素法であるため、単位重量当たりのGAを作るのに必要な菌体量(触媒原単位)に留意する必要がある。ご存知の通り酵素法を利用した商業生産においては、触媒原単位を下げると、反応に用いる菌体の調製と廃菌体処理に要するコストが減り、経済的に有利になるからである。ちなみにfucOとaldAを導入し、glcDEFを破壊したGA生産大腸菌は、1 gの乾燥菌体当たり20.2 gのGAを生産した。これをさらに高めるために、補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の合成<sup>8)</sup>と再生<sup>9)</sup>に着目した。エチレングリコールからGAを作る生体反応は酸化反応で

あり、GAを1分子作るのに2分子のNADが消費されて還元型のNADHとなる。大腸菌にGAを大量に作らせるためには、大腸菌内のNAD濃度を高めることが必要と考えた。具体的には、NAD生成反応の負の制御因子であるnadRを破壊し、かつNADH→NADの反応を触媒するNADHデヒドロゲナーゼ(ndh)の遺伝子を導入してその効果を調べた。その結果1 gの乾燥菌体当たり72.5 gのGAを生産し、触媒原単位の72%削減に成功した。

## おわりに

本稿では三井化学の研究テーマの中からD-乳酸、イソプロピルアルコール、グリコール酸を取り上げ、各々を高生産する組換え大腸菌の構築について概説した。野生型大腸菌が持つ代謝反応を遺伝子レベルで改変することによって得られる“オーダーメイド大腸菌触媒”の実用性を感じ取って頂けたら、筆者にとって望外の幸せである。筆者が大腸菌を扱って感じるのは、物質生産ツールとしての大腸菌の潜在能力の高さである。勿論、大腸菌にとって毒性の強いフェノール類などは、依然として大腸菌で生産し難いものである。紙面の都合上、今回は紹介できなかったが、デオキシシロイノソース(DOI)はそれ自体が糖に似た物性を示し、大腸菌で高生産可能であると同時に、シンプルな合成反応でトリヒドロキシベンゼンやヒドロキノンのような多価フェノール類へと変換できる。三井化学は新潟薬科大学、新潟バイオリサーチパーク、東京工業大学の協力のもと、発酵でスクロースからDOIを高生産する大腸菌の創出に成功しており、これを用いれば植物由来の多価フェノール類の商業生産も夢ではない。今回ご紹介した非可食資源由来の化学品群が、一日も早く実用化され、世の中に役立つことを願って止まない。

本技術に関する研究開発は、三井化学株式会社の皆様、さらに共同研究でご指導頂いた大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学の清水浩先生、神戸大学大学院工学研究科応用科学の近藤昭彦先生をはじめとする皆様のご協力によるものです。心より御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 和田光史ら：特許第4473219号
- 2) 和田光史ら：公開国際出願, WO2012/032697
- 3) 森重 敬ら：公開国際出願, WO2012/032698
- 4) 竹林のぞみら：公開国際出願, WO2009/008377
- 5) 松本佳子ら：公開国際出願, WO2011/111638
- 6) 天野 仰ら：公開国際出願, WO2012/020833
- 7) 和田光史ら：特許第4523939号
- 8) 森重 敬ら：公開国際出願, WO2007/129465
- 9) 森重 敬ら：公開国際出願, WO2007/129466