

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	松原 充
学位授与の日付	平成30年3月31日	
論文名	Fermentative production of 1-propanol from biomass using recombinant <i>Escherichia coli</i> （組換え大腸菌を用いたバイオマスからの1-プロパノール発酵生産に関する研究）	
論文審査委員	主査	片岡 道彦
	副査	笠井 尚哉
	副査	川口 剛司

論文要旨

緒論

化石資源の枯渇やCO₂などの温室効果ガス排出量の増加は、地球温暖化の観点から解決すべき喫緊の課題となっている。化石資源を燃料として利用すればCO₂が排出されるが、このCO₂を再び燃料に戻すことができれば、理論的には大気中のCO₂は増加しない。これが「カーボンニュートラル」の考え方であり、これを達成するためには、植物の光合成によって大気中のCO₂を糖類（バイオマス）として固定し、さらに糖類から燃料へと効率的に変換（還元）する必要がある。

また化石資源は燃料としての利用のほかに、化学品やポリマーの原料としても利用される。そのため、バイオマスからの燃料生産だけでなく、化学品やポリマーの生産技術の開発も求められている。バイオマスを燃料として利用する場合、固定されたCO₂は燃焼によってすぐ大気中に放出されるが、化学品やポリマーとして利用する場合は最終的に燃焼・廃棄されるまで長期的にCO₂を固定できる。

このような観点から、これまで化石資源から得られてきたポリマーをバイオマスから生産する研究開発が近年盛んに行われている。プロピレンは代表的な化石資源由来ポリマーの1つであるポリプロピレンのモノマー原料であり、現在は化石資源のみから得られている。バイオマスからプロピレンを生産する試みはいくつか検討されているが、主なものとしてはバイオマスから微生物を用いて発酵生産したエタ

ノールあるいはプロパノール（1-プロパノール，イソプロパノール）を出発原料として，化学的にプロピレンに変換するものである．既にエタノールやイソプロパノールの効率的な発酵生産は可能となっているが，1-プロパノールに関してはそのような生産プロセスの開発には至っていない．しかし，発酵過程で CO_2 の放出を伴うエタノールやイソプロパノール生産に対し，1-プロパノールの発酵生産では CO_2 の放出を伴わないため，バイオマスからのプロピレン生産全体を考えた場合の炭素収率の向上が期待できる．

以上のような背景から本研究では， CO_2 を効率的に燃料・化学品・ポリマーに変換するための基盤技術の開発の一環として，1-プロパノールを経由したバイオマスからのプロピレン製造に着目した．そして，新規の 1-プロパノール人工合成経路を構築し，それを導入した組換え大腸菌 *Escherichia coli* を用いることで，バイオマスからの 1-プロパノール発酵生産について検討を試みた．

第 1 章 1-プロパノール生産大腸菌の分子育種

本章ではバイオマスとして 3 種類の出発原料（グルコース，ラムノース，グリセロール）からの新規の 1-プロパノール人工合成経路を設計し，それを導入した 1-プロパノール生産大腸菌の分子育種を行った．まず，人工合成経路の主要中間体である 1,2-プロパンジオール（1,2-PD）の合成に着目し，解糖系中のジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）から 3 段階の変換反応によって 1,2-PD へ至る合成経路の構築を試みた．各変換反応を触媒する酵素遺伝子の最適な組み合わせを検討するため，9 種類の 1,2-PD 生産プラスミドを構築し，野生型 *E. coli* BW38029 に導入した．その結果，*E. coli* 由来の *mgsA*，*dkgB*，*gldA* 遺伝子を導入した pKK_mde を最適な 1,2-PD 生産プラスミドとして選択した．次に，1,2-PD から 1-プロパノールへ至る合成経路の構築のため，*Klebsiella pneumoniae* 由来のジオール脱水酵素遺伝子，プロパノール脱水素酵素遺伝子，補酵素アデノシルコバラミン（AdoCbl）再生系遺伝子群を含む *pdu* レギュロンの一部をクローニングして 1-プロパノール生産プラスミド pRSF_pduCDEGHOQS を構築した．これら 2 つのプラスミドを導入した組換え *E. coli* BW38209 [pKK_mde, pRSF_pduCDEGHOQS] は，嫌気条件下でグルコースから 0.36 mol/mol の対糖収率で 16.1 mM (= 0.97 g/l) の 1-プロパノールを生産した．

また，*E. coli* は内在性ラムノース資化経路によってラムノースから 1,2-PD を合成できるため，ラムノースを出発原料とする場合は，1,2-PD から 1-プロパノールへ至る合成経路のみを導入した組換え *E. coli* BW38029 [pRSF_pduCDEGHOQS] を用いることとした．この株は嫌気条件下でラムノースから 0.81 mol/mol の対糖収率で 1-プロパノールを生産し，グルコースを利用した場合よりも効率的であった．さらにグリセロールを出発原料とする場合，グルコースからの 1-プロパノール生産菌に対して，*Shimwellia blattae* 由来 ATP 依存性ジヒドロキシアセトンリン酸化酵素遺伝子の追加導入を行った．この株を用いて嫌氣的に培養を行った結果，従来の報告よりも高い 0.27 mol/mol の対グリセロール収率での 1-プロパノールの生産に成功した．

第 2 章 1-プロパノール生産の最適化

グルコースからの1-プロパノール生産の効率化を図るため、本章では宿主 *E. coli* の代謝改変および培養条件の検討を試みた。まず、1-プロパノール収率・収量の低下を招くと考えられる *E. coli* 内在性酵素遺伝子に着目し、それらの遺伝子破壊株を宿主として用いることを検討した。7種類の遺伝子破壊株には、それぞれ pKK_mde を導入し、グルコースから主要中間体である 1,2-PD の収率・収量を指標として、遺伝子破壊株の選抜を行った。その結果、4種類の酵素遺伝子 (*ldhA*, *gloA*, *aldA*, *tpiA*) を破壊した PR07 [pKK_mde] において、最も高い 1,2-PD の収量・収率が得られた。そこで、この株に対して pRSF_pduCDEGHOQS を導入し、得られた PR07 [pKK_mde, pRSF_pduCDEGHOQS] を用いて嫌気条件下で培養を行った。その結果、野生型 *E. coli* BW38029 を用いた場合よりも高い対糖収率 (0.57 mol/mol) での1-プロパノールの生産に成功したが、一方で収量は 12.2 mM (= 0.73 g/l) に低下し、また 1,2-PD とその前駆体であるヒドロキシアセトン (HA) が経路中間体として蓄積していた。

そこで収量を改善させるため、これまでの試験管培養による検討に代わって、pH や培地への通気量が制御可能なジャーファーメンターによる培養を行った。出発原料となるグルコースの添加量を増加させ、通気条件を培養初期は好氣的、培養開始 24 時間以降は微好氣的な条件に切り替えることで、0.48 mol/mol の対糖収率で 87.5 mM (= 5.26 g/l) の1-プロパノールの生産に成功し、収量が大幅に改善した。しかし試験管による検討同様、中間体 (HA, 1,2-PD) の著量な蓄積が観察された。

HA および 1,2-PD は NADH 依存性カルボニル還元反応によって1-プロパノールに変換されるため、中間体の蓄積は NADH 供給量の不足が原因であると推測された。そこで TCA 回路における NADH 生成反応の抑制因子である *arcA* を破壊することで NADH 供給量の増加を試みた。PR07 の *arcA* を追加破壊した PR08 に1-プロパノール生産能を賦与したところ、どの通気条件下においても中間体の蓄積が減少し、1-プロパノールの対糖収率が増加した。しかし微好気・嫌気条件下では中間体の蓄積は完全に解消されたが、好気条件下では依然としてその蓄積が見られた。

そこでさらなるアプローチとして、1-プロパノール生産能を賦与した PR07 に対し、*E. coli* 内在性 NAD⁺合成経路の律速段階である *pncB* 遺伝子の導入あるいは NAD⁺と NADPH から NADH と NADP⁺への合成反応を触媒する *pntAB* 遺伝子の導入を試みた。その結果、*pncB* を導入すると、対糖収率には顕著な改善は見られなかったものの、いずれの通気条件下においても中間体の蓄積が完全に解消された。一方、*pntAB* を導入した場合、好気条件下において中間体の蓄積を完全に解消することはできなかったが、嫌気条件下において中間体の蓄積を伴わずに 0.88 mol/mol という高い対糖収率での1-プロパノール生産に成功した。以上より、微生物の還元的代謝を利用した発酵生産では、細胞内 NADH 量の制御が重要であることが示唆された。

第3章 1-プロパノール生産のための酵素遺伝子発現系の改良

本章ではより安定した1-プロパノール生産を行うため、新しい酵素遺伝子発現系の構築を試みた。第1章で構築した pRSF_pduCDEGHOQS を *E. coli* BW38029 に導

入した場合、大部分のクローンは1-プロパノール生産能力を持たず、能力を有するクローンは僅かであった。そこで1-プロパノール生産能力を持たないクローンからプラスミドを抽出し、シーケンス解析等を行ったところ、1-プロパノール生産に関わる酵素遺伝子あるいはその発現プロモーター配列中に *E. coli* の F 因子に由来するトランスポゾン *Tn1000* の転移が見つかり、遺伝子あるいはプロモーター配列が破壊されていることが分かった。pRSF_pduCDEGHOQS は発現強度の高い *tac* プロモーターを持つ高コピー数プラスミドであり、酵素遺伝子が構成的かつ強力に発現している。したがって過剰な酵素合成による宿主の代謝負担を回避するため、遺伝子あるいはプロモーター配列を破壊して酵素合成を妨げたと推定された。

そこで1-プロパノール生産能力を持つクローンを安定的に得るため、厳密な発現制御ならびに発現レベルの最適化に焦点を当てた新しい酵素遺伝子発現系の構築を試みた。その結果、新しい1-プロパノール生産プラスミドとして、発現抑制を担う *Lac* リプレッサーをコードする *lacI* 遺伝子と発現強度の低い *A1lacO-1* プロモーターを保持する低コピー数の pALA1_pduCDEGHOQS を作製した。また、これと並行して、pKK_mde に対して *lacI* 遺伝子を追加導入した新しい1,2-PD 生産プラスミド pKL_mde を作製した。新たに構築した pALA1_pduCDEGHOQS を *E. coli* BW38029 に導入したところ、pRSF_pduCDEGHOQS を導入した場合と比較して、1-プロパノール生産能力を持つクローンの取得率が飛躍的に増加した。さらに、PR07 に対して pKL_mde, pALA1_pduCDEGHOQS を導入したところ、嫌気条件下において中間体の蓄積を伴わずに 0.93 mol/mol の対糖収率で1-プロパノールを生産することに成功した。この対糖収率は従来のグルコースからの1-プロパノール生産に関する報告の中で最も高いものであった。

本論文で得た成果や知見は、汎用ポリマー原料であるプロピレンのバイオマスからの生産を見据えた基盤的技術となるだけでなく、バイオマスからの様々な燃料・化成品・ポリマーの生産に関わる当該研究分野の進展に寄与できると考えられる。

審査結果の要旨

化石資源の枯渇や CO₂ 排出量の削減は、地球規模で解決すべき喫緊の課題となっている。その解決手段のひとつとして、大気中の CO₂ を光合成によって固定したバイオマス（糖類）を原料として燃料や化学品を発酵生産する試みが盛んに行われている。糖類をより酸化度の低い燃料や化学品に変換する場合、糖類がその出発原料となるだけでなく、糖類の持つエネルギーの一部を還元力として利用することとなる。そのため、還元エネルギー源として消費される量と、目的化合物の原料となる量をうまくバランスさせることで、対糖収率の高い生産プロセスに近づけること

ができる。

1-プロパノールは、汎用ポリマーであるポリプロピレンに化学的に変換できる化合物であることから、バイオマスからの生産が期待されている。しかし、糖類から1-プロパノールの効率的発酵生産を行う微生物は知られていない。そこで本研究では、糖類からのバイオポリマー生産の開発を目的として、1-プロパノール人工生合成経路を設計・構築し、大腸菌に導入することでバイオマスからの効率的な1-プロパノール発酵生産を目指した。1-プロパノールの収量だけでなく、高い対糖収率を達成するための検討を進めている。

第1章では、種々の出発原料からの新規1-プロパノール人工生合成経路を設計し、それを導入した1-プロパノール生産大腸菌の分子育種を行った。設計した新規1-プロパノール人工生合成経路にはCO₂放出反応が含まれないため、対糖収率において大きな利点がある。まず、生合成経路中の各変換反応を触媒する酵素遺伝子を含む2種類のプラスミド (pKK_mde, pRSF_pduCDEGHOQS) を作製して大腸菌に導入し、グルコースから1-プロパノールが生産できることを明らかにした (対糖収率 0.36 mol/mol)。本経路中には補酵素アデノシルコバラミン (AdoCbl) を要求する反応が存在するため、生産培養時に AdoCbl の添加が必要であるが、AdoCbl 再生系遺伝子群を同時に導入することで少ない AdoCbl 添加量 (1.3 μM) での生産を可能にした。また、ラムノースおよびグリセロールからも酵素遺伝子の追加導入等により1-プロパノールが生産できることを証明した。

第2章ではグルコースからの1-プロパノール生産の効率化を図るため、宿主大腸菌の代謝改変および培養条件の検討を試みた。まず、4種類の酵素遺伝子 (*ldhA*, *gloA*, *aldA*, *tpiA*) を破壊した大腸菌 PR07 株に対して1-プロパノール生合成遺伝子を導入したところ、1-プロパノール生産における対糖収率の大幅な改善が見られた (0.57 mol/mol)。さらなる対糖収率向上のため、細胞内の酸化還元バランスを司る補酵素 NADH に着目した。1-プロパノール生合成遺伝子を導入した PR07 株に対して、NAD⁺生合成に関わる *pncB* 遺伝子を追加導入した場合、NADH/NAD⁺総補酵素量が増加し、1-プロパノールの対糖収率が 0.77 mol/mol に上昇した。一方、NADPH から NAD⁺に電子を受け渡す *pntAB* 遺伝子を追加導入した場合は NADH/NAD⁺比率が上昇し、1-プロパノールの対糖収率が 0.88 mol/mol に上昇した。これらの結果から、還元反応を含む発酵生産の効率化のためには、NADH/NAD⁺総補酵素量あるいは NADH/NAD⁺比率の制御が重要であることを示した。また、ジャーファーメンターを用いた培養では、培養途中で通気条件を好気 (酸化) 的条件から微好気 (還元) 的条件に切り替えることで、最大収量 (87.5 mM) の1-プロパノール生産を達成した。

第3章では大腸菌細胞内でのプラスミド機能の安定保持のため、酵素遺伝子発現系の改良を試みた。第1章で作製した pRSF_pduCDEGHOQS は、その高い発現量と

構成的発現のために大腸菌細胞内で機能的に不安定であることが示唆された。そこで、発現量の最適化と厳密な発現制御に焦点を当てた酵素遺伝子発現系の改良を行い、2つのプラスミド (pKL_mde, pALA1_pduCDEGHOQS) を新たに作製した。まず、pALA1_pduCDEGHOQS を大腸菌に導入し、細胞内で安定的に機能することを確認した。次に、PR07 株に対して新しい2つのプラスミドを導入して生産培養を行ったところ、これまでで最も高い対糖収率 (0.93 mol/mol) での1-プロパノール生産に成功した。この結果より、酸化還元バランスの制御だけでなく、発現系の調節・適正化も発酵生産の効率化に寄与することを示した。

本論文で得た成果や知見は、バイオマスからのポリプロピレン生産の基盤技術としてだけでなく、バイオマスからの様々な燃料・化学品の発酵生産に関わる発酵学・代謝工学等の研究分野の進展に寄与できると考えられる。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。