

Anaerobic Bioprocessing のためのプラットフォーム微生物の開発とバイオ燃料生産への応用

岡野 憲司
大阪大学大学院 工学研究科

研究成果

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子欠失体である $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株の作成に成功した。本株にエタノール生産能を付与した結果、150 g/L のグルコースから 100 h で 56.7 g/L のエタノールを生産できた。 $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株は、酵母や大腸菌等の既往の代謝工学微生物と異なり、通気・攪拌を必要とせず省力的な物質生産が可能であり、多様な物質生産への応用が期待できる。

研究の目的

低炭素社会の構築に向けて、カーボンニュートラル特性を有するバイオマス資源からの物質生産が活況を呈している。代謝工学は目的物質の生産性の最大化や、非天然物質の生産における強力な手法であり、大腸菌や酵母、コリネ型細菌などの微生物を中心に研究が展開されている。これらの工業微生物は総じて好気的環境で増殖する微生物であり、微生物の増殖工程において（目的物質によっては物質生産工程においても）、十分な通気と攪拌が必要となる。しかしながら、付加価値の低いバルク品の工業生産において、通気・攪拌によるコストは大きな負担となる。また、培養のスケールアップ時においても、酸素供給の最適化はしばしば問題の種となる。そこで本研究では、(1)通気・攪拌を必要とせず、(2)スケールアップが容易であり、(3)既往微生物と同等の増殖速度・物質生産速度を達成しうる Anaerobic Bioprocessing (ABP) のためのプラットフォーム微生物を開発することを研究目的とする。

方法

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* は嫌気条件下でも好気条件下と同等の増殖速度を示し、通気・攪拌を必要としない増殖連動型の乳酸生産が可能であり、ABP に適した宿主生物として適している。一方、*L. plantarum* は消費糖の大半を乳酸に変換するため、乳酸の生成を抑制することが多様な物質生産のためのプラットフォーム微生物を構築する上で重要であると考えられる。そこで、まず乳酸の生成を抑制するため D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ldhD*)、および L-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ldhL1*) の二重欠失体である $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株の作成を行った。続いてリグノセロース系バイオマスの利用に重要なペントースの利用能の向上を図るべく、ペントースからピルビン酸と酢酸を等モルで生成するホスホケトラーゼ経路の鍵酵素となる、ホスホケトラーゼ遺伝子 (*xpk1*) の破壊を行った (図 1)。更に、破壊した *xpk1* 遺伝

子座に *Lactococcus lactis* 由来のトランスケトラーゼ遺伝子 (*tkt*) を挿入することで、ペントースよりピルビン酸のみを生産可能なペントースリン酸経路の導入を行った。得られた乳酸非生産株にエタノール生産能を付与すべく、本株で機能的に作用するピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDC)、およびアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) の探索を行うべく、種々の微生物より酵素遺伝子を取得し、共発現株の作成を行った。フラスコ培養にてエタノール高生産株の選抜を行った後、1 L のジャーフェーマンターを用いた、グルコースからエタノールの発酵試験を実施した。

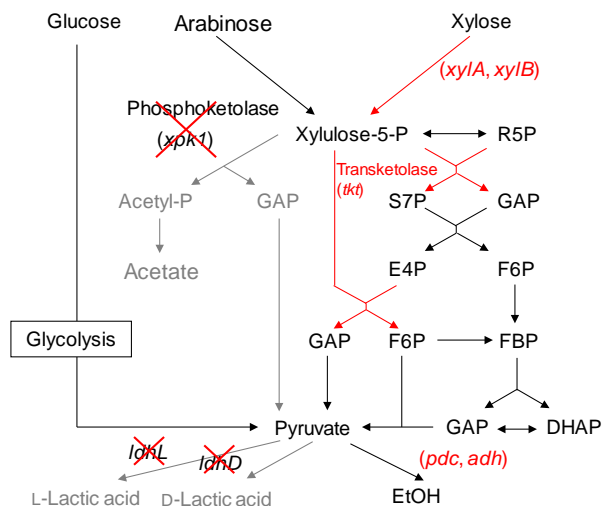


図 1 ABP 微生物によるエタノール生産経路

結果

まず *L. plantarum* において *ldhD* 欠損させた結果、D-乳酸の生産が抑制され、高光学純度の L-乳酸生産株が得られた¹。次に $\Delta ldhD$ 株の *ldhL1* を破壊することで、乳酸生産が抑制された $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株の取得に成功した。興味深いことに、本株は解糖系で生じた NADH の酸化能を失っているため嫌気的な増殖能を失い、好気条件下でのみ生育可能であった。続いて、 $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株の *xpk1* を破壊することで、ペントース利用能を失ったが、同遺伝子座に *tkt* を導入することでペントース利用能が回復した。*L. plantarum* は元来アラビノース利用能を有するがキシロース利用能を持たないため、現在はキシロース資化能の付与を行っているところである。

得られた $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株の ABP のためのプラットフォーム微生物としての有効性を示すために、PDC および ADH 遺伝子の導入を行うことで、エタノール資化能の付与を試みた。PDC については *Acetobacter pasteurianus* (ApPDC)、*Zymomonas mobilis* (ZmPDC)、*Lactobacillus florum* (LfPDC) より、ADH については *Oenococcus oeni* (OoADH)、*Z. mobilis* (ZmADH) より取得した。各形質転換体を用いて 100 g/L グルコースからのエタノール発酵を行ったところ、ADH のみを導入した株ではエタノールの生成が確認できなかった (図 2)。一方、PDC は ApPDC と ZmPDC を導入した株において嫌気的な生育能が回復し、エタノール生成が確認できた。従って、ADH については内在性の ADH のみでも、ある程度機能することがわかった。ApPDC や ZmPDC の発現株では、OoADH や ZmADH を共発現することで、更にエタノール生産が向上し、ApPDC と OoADH の共発現株で最も高いエタノール濃度である 33.0 g/L を達成した。同株によりジャーフェーマンターを用いた 150 g/L のグルコースからの

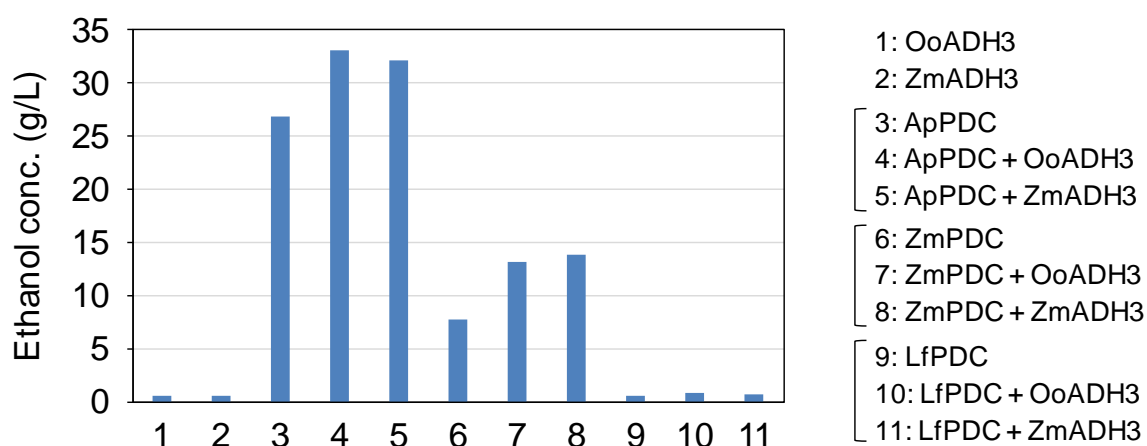


図2 $\Delta dhL1 \Delta dhD$ 株形質転換体によるエタノール生産. 100 g/L グルコースと 15 g/L CaCO_3 を含む改変 MRS 培地 (全量 30 mL) にて、37°C で 48 h 培養.

エタノール発酵試験を行った結果、100 h で 56.7 g/L のエタノールを生産することに成功した (図3)。消費糖あたりの収率は 0.40 となり理論収率である 0.51 を下回った。本試験においてはエタノール以外においても乳酸や酢酸の生産が確認されており、乳酸の生産が完全に抑制されていないことや、副産物の生成が認められた。今後はこれらの経路を遮断し、更なる改善を試みる。

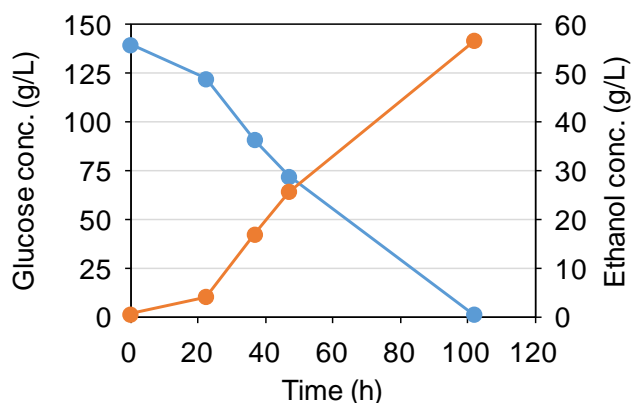


図3 ApPDC, OoADH 共発現株によるエタノール生産. 1 L ジャーファーメンターにて、37°C、pH 6.0 に制御して培養.

結論

L. plantarum の乳酸生産能欠失株をプラットフォーム株としたエタノール生産を実証することで、本株が通気や攪拌を必要としない ABP の構築に有用であることが示された。今後、エタノール以外の物質生産への展開が期待でき、既存の代謝工学微生物を用いたバイオプロセスに対して省力的な物質生産が期待できる。

文献

- 1) Okano, K., Uematsu, G., Hama, S., Tanaka, T., Noda, H., Kondo, A., and Honda, K. (2018) Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for direct L-lactic acid production from raw corn starch. *Biotechnol. J.* **13**: 1700517.