



大阪大学大学院
基礎工学研究科
物質創成専攻・助教
尾島 由紘
共同研究者
Prayoga Suryadarma
松尾 奈保子

2004年3月 大阪大学基礎工学部卒業
2006年3月 大阪大学大学院基礎工学研究科
物質創成専攻博士前期課程修了
2009年3月 大阪大学大学院基礎工学研究科
物質創成専攻博士後期課程修了
2009年4月 大阪大学大学院基礎工学研究科・
助教

細胞内の酸化還元制御による有用物質の好気発酵生産

研究目的

50年以上の歴史をもつ微生物のアミノ酸発酵に関する研究は、従来のスクリーニング手法に加え遺伝子工学や代謝工学の進歩により、現在ではほぼ理論収率を達成している。よって、遺伝子欠損などによる代謝改変を用いた収率の向上というアプローチは、現在のところ技術的に飽和していると言っても過言ではない。一方で、細胞内の NADH と NAD^+ の比によって決定する酸化還元バランスは、大腸菌を含めた多くの微生物の有用物質生産において重要であることが近年報告されている。酸化還元バランスが重要な生産物質例の一つとして、それ自体が食品添加物として有用かつ、様々なアミノ酸や医薬品の前駆体であるピルビン酸が挙げられる。代謝反応の性質上、ピルビン酸の蓄積には細胞内を還元的な状態 ($\text{NADH} > \text{NAD}^+$) に保つことが有効であるが、細胞内還元を作り出すのに有利な培養条件である嫌気・微好気条件では TCA 回路の低活性化により増殖速度が遅く、生産速度が大幅に低下する。この問題に対する解決策として、本研究グループはこれまでの検討で、好気的な培養条件において細胞内の酸化還元状態を制御しピルビン酸を生産することに成功した¹⁾。具体的には、有機酸の一種であるギ酸を CO_2 と H^+ に分解し NAD^+ から NADH への再生を行う *Mycobacterium vaccae* のギ酸脱水素酵素 (mFDH) を大腸菌に組換え、ギ酸を適切なタイミング、濃度で培養液中に直接添加することで細胞内酸化還元制御を可能とする手法である。この手法により、高い酸素環境下において細胞内還元状態を作り出すことで、ピルビン酸生産が可能となった。さらに、ピルビン酸を前駆物質とする有用物質として、アミノ酸の一つであるアラニンモデル生産物とし、ピルビン酸→アラニンの変換酵素を同じ大腸菌に組換えたところ、アラニン収率が2倍以上に増加することを明らかにしている²⁾。

本研究では、ジャーファーマンターを用いてより詳細な培養パラメータを検討することで、ピルビン酸収率の更なる向上を目指した。さらに、ピルビン酸はアミノ酸などに加えて、エタノールや脂肪酸といったバイオエネルギーの前駆体としても重要な中間代謝物である。これらバイオエネルギー生産も強い還元力を必要とするため、その多くが嫌気もしくは好気条件下で行われている。そこで、本研究で提案する手法と、酸素耐性を持つエタノール変換酵素を組み合わせることで、好気的なバイオエタノール生産へと展開した。

遺伝子改変による大腸菌細胞への好気エタノール生産経路の付与

本来大腸菌は、アセチルCoAを前駆体としてエタノールを生成する代謝経路を保持するが、本研究で対象とする好気培養条件下では酸素に対する脆弱性が原因となりほとんど機能しない。そこで、ピルビン酸生産大腸菌に好気エタノール生産経路を付与するために、*Zymomonas mobilis*という微生物から、ピルビン酸をエタノールに変換するための2つの酵素、ピルビン酸脱炭酸酵素(*pdc*)とアルコール脱水素酵素(*adhB*)をプラスミドに組換え、形質転換により、大腸菌に導入した(Fig. 1)。まずは、*adhB*遺伝子の導入を確認するために、Fig. 2に示すようにアルデヒド検出用の培養プレート上で、組換え大腸菌を培養したところ、赤色を示すアルデヒドが検出され、*adhB*遺伝子が大腸菌に導入されたことが確認された。

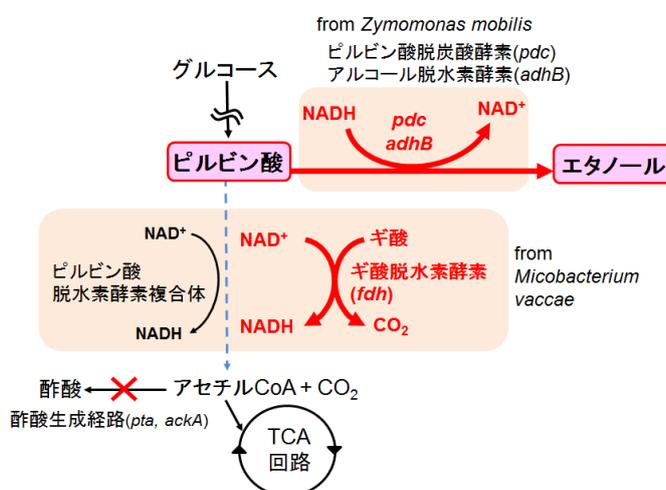


Fig. 1 大腸菌細胞への好気エタノール生産経路の付与

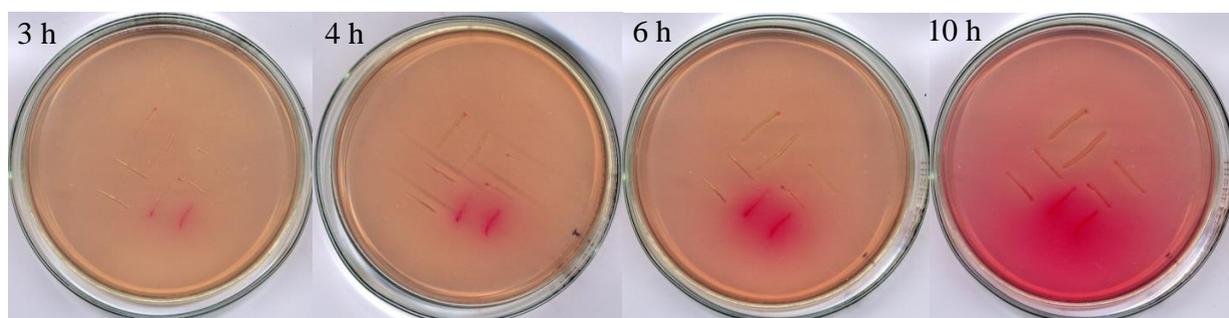


Fig. 2 アルデヒドの検出によるアルコール脱水素酵素(*adhB*)活性の確認。プレート上の赤い部分がアルデヒドの検出を示す。*Zymomonas mobilis*由来の*adhB*が大腸菌に導入されたことが確認された。

さらに、*pdc* と *adhB* の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定した結果を Table 1 に示す。これらの結果から、遺伝子導入を行った大腸菌では、野生株でほとんど検出されなかった *pdc* と *adhB* が高発現していることが確認され、遺伝子導入が成功したことが裏付けられた。

Table 1 大腸菌細胞内の *pdc* と *adhB* 遺伝子の発現量(培養 18 時間後)

大腸菌株	mRNA 発現量 [10^2]	
	<i>pdc</i>	<i>adhB</i>
BW25113 (野生株)	< 1	< 1
BW25113/ pTadhB-pdc	8000	33000

細胞内の酸化還元制御による大腸菌を用いた好気エタノール生産

次に、mFDH と *pdc-adhB* のプラスミドを保持したエタノール生産大腸菌 (BW25113 Δ *pta*/pHfdh/pTadhB-pdc 株) を作成し、好気エタノール生産を試みた。LB 培地に 20 g/l のグルコースを添加し、フラスコ振盪培養を行った。抗生物質としてクロラムフェニコール (34 mg/l) とカルベニシリン (500 mg/l)、組換えタンパク質発現誘導剤として 0.5 mM isopropyl thiogalactoside (IPTG) を添加した。この際に、総括酸素移動容量係数 $K_La = 1.5 \text{ min}^{-1}$ となるように攪拌速度を調整し、好気条件を保った。得られた結果として、Table 2 に示すように、ギ酸を添加していない場合において、エタノール生産大腸菌は $3.5 \pm 0.5 \text{ g/l}$ の濃度でエタノールを生産した。一方で、ギ酸を添加するとエタノール濃度が $4.8 \pm 0.2 \text{ g/l}$ に増加し、アラニン生産と同様に細胞内の酸化還元制御がエタノール生産にもある程度有効であることが示された。これらの結果を、2012 年 11 月にインドネシアで行われた国際学会において発表した (International conference of Biotechnology 2012, E0-06, Bogor, Nov.)。ただし、ギ酸を添加した際に、生産物であるエタノールの他に副生産物である酢酸や乳酸の蓄積が確認された。今後は、これらの副生産物の生成を抑制し、エタノール生産濃度ならびに収率をさらに向上する必要がある。

Table 2 大腸菌 BW25113 Δ *pta*/pHfdh/pTadhB-pdc 株を用いた好気エタノール生産。ギ酸添加の有無の条件下での培養 24 時間後の乾燥菌体重量、ピルビン酸、エタノール、酢酸、乳酸の培地中濃度。

ギ酸添加 [g/l]	乾燥菌体重量 [g/l]	ピルビン酸 [g/l]	エタノール [g/l]	酢酸 [g/l]	乳酸 [g/l]
0	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.3	3.5 ± 0.5	4.6 ± 0.5	0
4	1.5 ± 0.2	N.D.	4.8 ± 0.2	3.0 ± 0.3	4.0 ± 0.3

ジャーファーマンターを用いたピルビン酸生産効率の向上

これまで本研究グループは、ギ酸を用いた新たな細胞内の酸化還元制御に基づくピルビン酸の生産方法を提案してきた¹⁾が、その収率に関しては更なる改善の余地を残していた。そこで、好気エタノール生産への展開と並行して、本反応に重要な因子を導き出し、ピルビン酸収率の更なる向上を達成することを目的とした。そこで、まずは培養パラメータをより詳細に検討することを目的として、ジャーファーマンターを用いた培養を行った。

実験には、ピルビン酸生産大腸菌(BW25113 Δ *pta*/pHfdh 株)を用いた。培養はジャーファーターBMS-03PI (ABLE & Biot 社製)を用いて行い、培養液としてこれまでに報告しているピルビン酸生産用培地を用いた¹⁾。培地組成は、20 g/l グルコース、4 g/l ギ酸、4 g/l ポリペプトン (和光純薬社製)、2.0 g/l NaCl、10 g/l (NH₄)₂SO₄、1 g/l KH₂PO₄、0.5 g/l MgSO₄·7H₂O、14.7 mg/l CaCl₂·2H₂O である。またクロラムフェニコール (34 mg/l) と、IPTG (0.5 mM) を添加した。

培養条件は、過去に報告したフラスコ培養の条件¹⁾に合わせて設定した。具体的には、通気 1 vvm で温度 37°C、pH は 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて制御し、7.0 にセットした。酸素供給条件に関しては、フラスコ培養での $K_{La} = 1.5 \text{ min}^{-1}$ と同じ値になるように攪拌速度 405 rpm に設定した。その後、副生産物である乳酸の生成を防ぐために、溶存酸素濃度が 2.0 ppm 以上となるように攪拌数を自動制御した。

得られた結果を Fig. 3 に示す。細胞増殖は培養 12 時間後付近で停止した。グルコースは増殖開始と共に減り始め、培養 24 時間後には完全に消費されていた。またギ酸に関しても

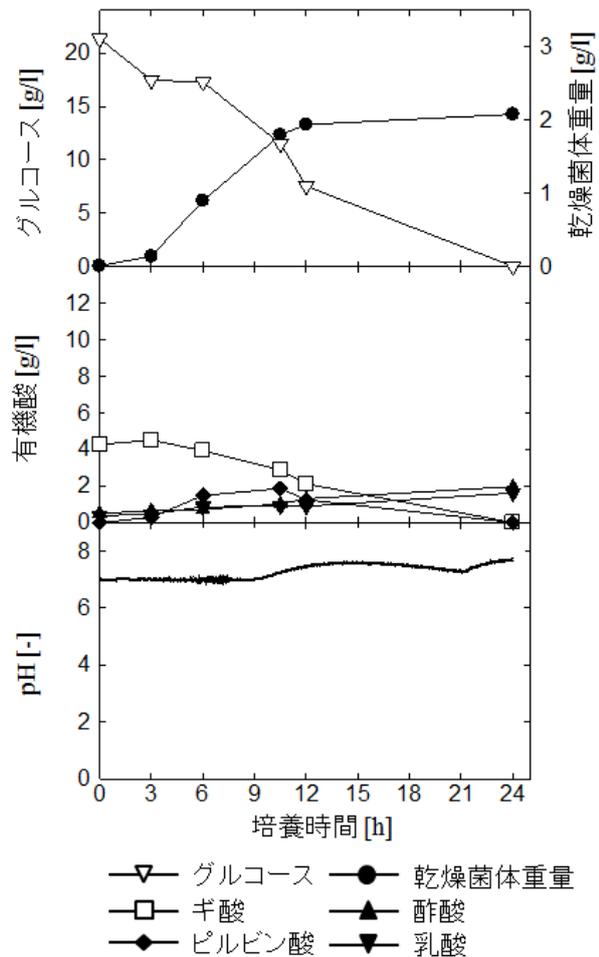


Fig. 3 ジャーファーマンター培養液中の乾燥菌体重量、グルコース、ギ酸、酢酸、ピルビン酸、乳酸の濃度の経時変化。pH 値は 7.0 に設定し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液により自動調整。

同様に培養 24 時間ですべて消費されていることが確認された。ところが、予想外の結果として、目的生産物であるピルビン酸がほとんど生成されなかった。さらに副生産物である酢酸や乳酸などの有機酸の生成も、24 時間後で 2.0 g/l 程度と低い値であった。以上の結果から、フラスコ培養での培養条件を参考にしてジャーファーマンター培養を行うと期待された効果が得られないことが明らかになった。

以上の結果を受け、フラスコとジャーファーマンターの培養条件の違いについて再度考察したところ、pH の制御法としてジャーファーマンターでは 1M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて 7.0 に設定したのに対して、フラスコでは初期 pH を 7.0 に設定した後、pH の低下を抑制するため 20 g/l の炭酸カルシウムを添加している点が挙げられた。さらに、フラスコ培養においては実際の培養液中の pH 変動については確認していなかった。そこで、フラスコ培養と同様に、ジャーファーマンターにおいても初期 pH7.0 で培養を開始し、20 g/l の炭酸カルシウムを添加した条件でピルビン酸生産を行い、培養液中の pH をモニタリングした。結果として、培養中の pH に関しては、初期値 7.0 で培養を開始した後に細胞増殖期で約 6.0 に低下し、その後はおよそ一定に保たれていることが明らかになった(データ省略)。さらに培養 24 時間後にピルビン酸濃度が約 6.0 g/l の濃度で生産されていた。

以上の結果から、培養中の pH 変動がピルビン酸生産に重要であると考え、次に 1M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて、炭酸カルシウム添加時の pH 変動をジャーファーマンターで再現した。結果を Fig. 4 に示す。初期 pH7.0 前後で培養を開始し、6 時間後に約 6.0 まで低下した後は一定に保った。その結果、ピルビン酸

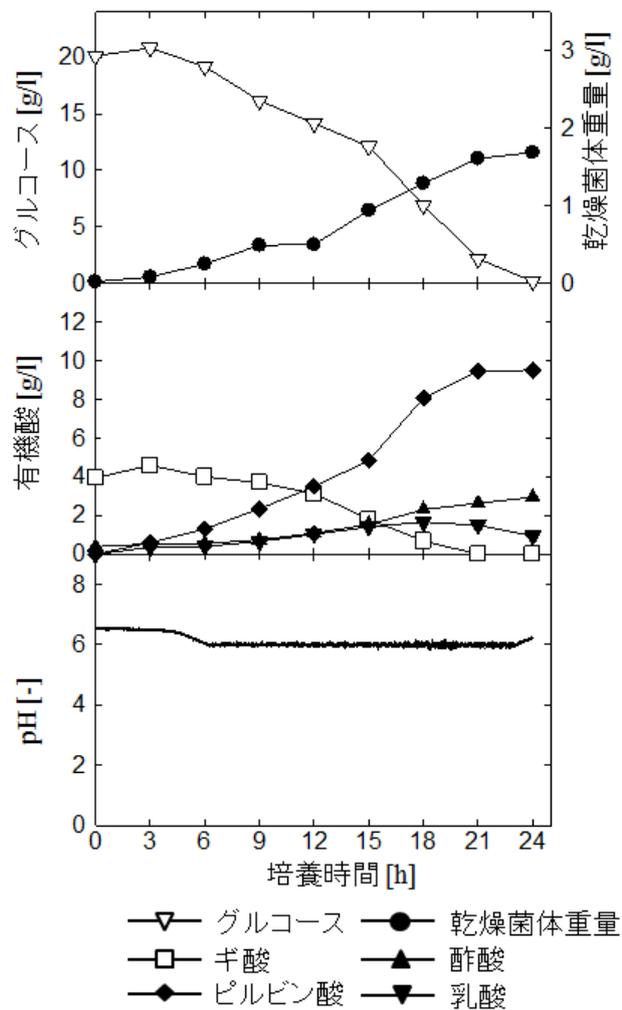


Fig. 4 ジャーファーマンター培養液中の乾燥菌体重量、グルコース、ギ酸、酢酸、ピルビン酸、乳酸の濃度の経時変化。初期 pH 値は 7.0 で培養を開始し、6.0 まで低下した後に、1 M 水酸化ナトリウム水溶液により 6.0 に自動調整。

生産の大幅な増加が確認され、培養 24 時間後で約 9.0 g/l に達した。またその他の有機酸生産濃度は低いレベルに保つことができた。このピルビン酸生産濃度に関しては、過去にフラスコ培養で報告した値よりも高く、ジャーフェンターを用いてパラメータ値を変更することで、より高い生産性を達成することができた。以上の結果は、新規性のある内容として、学会発表(化学工学会第 44 回秋季大会, XA1P12, 宮城, 2012 年 9 月; 化学工学会高松大会, B202, 高松, 2012 年 12 月)を行い、現在学術論文に投稿中である³⁾。

おわりに

本研究では、ギ酸を用いた大腸菌の細胞内酸化還元制御によるピルビン酸生産を好気エタノール生産へと発展させ、またジャーフェンターにおいて培養パラメータを検討することによりピルビン酸生産効率の向上を達成した。エタノール生産に関しては、更なる生産性の向上が必要であるが、ジャーフェンター培養で得られた結果を応用することを予定している。以上の研究成果は、アミノ酸や医薬品などのファインケミカルに加え、バイオエネルギー生産や汚水処理など様々な分野に寄与するものであると期待される。

謝辞

本研究に支援を頂きました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。また、当研究に従事して頂いた研究室の大学院生諸氏に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Yoshihiro Ojima, Prayoga Suryadarma, Kazuki Tsuchida and Masahito Taya: Accumulation of pyruvate by changing the redox status in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.*, Vol.34, No.5, pp.889-893, 2012.
- 2) Prayoga Suryadarma, Yoshihiro Ojima, Kazuki Tsuchida and Masahito Taya: Design of *Escherichia coli* cell culture for regulating alanine production under aerobic conditions, *J Chem Eng Jpn.*, Vol.45, No. 8, pp.604-608, 2012.
- 3) Yoshihiro Ojima, Nahoko Matsuo, Asep Suparman, Prayoga Suryadarma, and Masahito Taya: Altered redox status in *Escherichia coli* cells enhances pyruvate production in pH-adjusting culture with a fermenter, submitted