

研究題目 スーパーエンブラ芳香族モノマーのバイオ生産技術の開発

神戸大学大学院工学研究科 田中 勉

背景

バイオエコノミー社会の実現を目標としているバイオ戦略 2020 では、バイオプラスチックが市場領域の一つに位置付けられている。レジ袋やストローの規制など、バイオプラスチックは日常生活で身近な製品である。我が国でもプラスチック資源循環戦略として 2030 年までにバイオマスプラスチックを 200 万トン導入するというマイルストーンが掲げられている。アメリカやヨーロッパでは、一定量のバイオプラスチック利用が製品として義務付けられつつある。微生物を用いたバイオ生産は、この問題を解決する有効な手段の 1 つである。しかし、プラスチック原料となるような芳香族化合物の生産量はまだまだ低い。すなわち、バイオマスから芳香族化合物を直接生産できる微生物の開発が求められている。

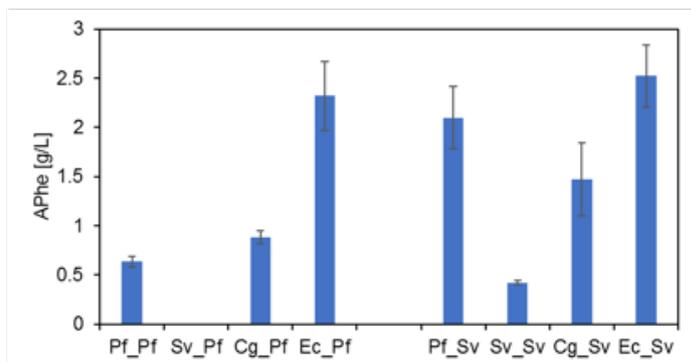
目的

本研究では、バイオプラスチック原料の前駆体となりうるアミノフェニルアラニン生産技術を開発することを目的として研究を進めた。

結果

アミノフェニルアラニンは、papA, papB, papC の 3 つの遺伝子を発現させることで微生物生産が可能となる。そこで、アミノフェニルアラニン合成における PapA、PapB、PapC の様々な組み合わせを系統的に評価した。PapA が葉酸合成において PabAB と類似の機能を共有していることから、大腸菌とグルタミン酸菌由来の PabAB を候補として選んだ。4 種類の PapA 変異体と 2 種類の PapBC を調べた。papABC 遺伝子の各セットを pNE12-Ptrc ベクターに挿入し、そのプラスミドを改変大腸菌株に導入して評価した。Ec_PabAB と Pf_PapBC、または Ec_PabAB と Sv_PapBC を発現する株は、96 時間の培養後、それぞれ 2.32 g/L と 2.52 g/L の生産量を達成した。一方、Pf_Pf (P. fluorescens 由来 PapABC) と Sv_Sv (S. venezuelae 由来 PapABC) の組み合わせでは、それぞれ 0.64 g/L と 0.42 g/L の生産量しか得られなかった。興味深いことに、Pf_Sv (P. fluorescens 由来の PapA と S. venezuelae 由来の PapC) を発現する株は、2.10 g/L という優れた APhe 収率を

示し、元の遺伝子の組み合わせを上回った。本研究では、大腸菌由来の PabAB は他の生物由来の PapA よりも効果的であり、アミノフェニルアラニンの高い生産量を可能にした。これらの知見は、APhe 生産を最適化する上で、papABC 遺伝子の複合作用が重要であることを示している。



	papA	papBC
Pf_Pf	Pf_papA	
Sv_Pf	Sv_papA	Pf_papBC
Cg_Pf	Cg_pabAB	
Ec_Pf	Ec_pabAB	
Pf_Sv	Pf_papA	
Sv_Sv	Sv_papA	Sv_papBC
Cg_Sv	Cg_pabAB	
Ec_Sv	Ec_pabAB	

続いて、プラスミドコピー数と APhe 生産効率との相関を評価した。異なる複製起点を持つプラスミド群を用い、高コピー数のプラスミド pNE12-Ptrc (ColE1 起点)、中間のコピー数のプラスミド pNCD-Ptrc (CDF 起点)、中程度の発現レベルのプラスミド pNA23-Ptrc (p15A 起点)、低コピーのプラスミド pSAK-Ptrc (SC101 起点) を用い、2つの異なる PapABC 酵素ペアの発現を行った。予想通り、プラスミドコピー数の減少に伴うアミノフェニルアラニン産生の顕著な減少が観察された。興味深いことに、プラスミド pSAK-Ptrc のコピー数が低いにもかかわらず、結果として得られた APhe 産生量は、コピー数が中程度のプラスミドによる生産量を上回った。このメカニズムを解明するため、qRT-PCR を用いて、様々な株における Ec_pabB 遺伝子の mRNA 転写レベルを定量した。pSAK-Ptrc プラスミドを保有する株における Ec_pabB 遺伝子の転写活性は、pNCD-Ptrc および pNA23-Ptrc プラスミドを保有する株で観察された活性を上回っていた。この転写活性の向上が、低コピー数のプラスミド発現系で観察されたアミノフェニルアラニン合成の促進に寄与していると考えられる。

