

主論文の要約

論文題目 高付着性細菌によるモノテルペノイドの生産に関する研究
(Study on the production of monoterpenoid by a highly adhesive bacterium)

氏名 宇佐見 享嗣

論文内容の要約

構造多様性に富むテルペノイドは医薬、機能性食品、香料、工業原料として利用される重要な化合物群であり、イソプレ単位 (C_5H_8) の数に応じて、多数のグループに分類される。イソプレ単位 2 つで構成されるモノテルペノイドはこれまでに植物や微生物などから約 1000 種以上が報告されており、ほとんどのモノテルペノイドは揮発性かつ疎水性である。モノテルペノイドは主に香料原料として工業的に使用されてきたが、近年ではバイオ燃料への潜在的な用途も認められ注目されている。また、その誘導体は生理活性化合物やリード分子として役立つ貴重な可能性を持つことが知られている。

モノテルペノイドは天然素材からの抽出や化学合成、バイオプロダクションによって得られる。天然資源保全の観点から、天然素材からの抽出は一度に大量の天然資源を使用し、抽出量は多くの場合微量であるため望ましくない。また、化学合成では化石燃料を基質に用いることが多く、多段プロセスや多種類の添加剤使用に伴う大量の廃棄物を排出している。その一方で生体触媒を用いたバイオプロダクションは、常温常圧中性付近条件下で高い選択性・反応性を示し、反応に金属触媒や有機溶媒を用いないため、環境への負荷が少ないグリーンプロセスとして期待されている。

生体触媒には微生物自体を触媒として扱う微生物触媒と細胞から単離した精製酵素が含まれ、微生物触媒は精製酵素に比べ費用対効果が高く、安定性にも優れている。さらに、細胞内に多くの酵素を保持することから、複雑な反応プロセスでも one-step 生産することが可能である。モノテルペノイドの微生物触媒による生産は、大きく 2 種類のタイプに分類でき

る。一つはグリセロールなどの単純な炭素源を出発物質とした *de novo* 合成、もう一つは目的物質の前駆体分子を用いた生物変換である。生物変換は *de novo* 合成よりも高収率で生産物が得られることから、リモネンやピネン、ゲラニオールのような安価な化合物が基質として豊富に入手可能な場合、生物変換が *de novo* 合成よりも特に好まれる。

微生物触媒によるバイオプロダクションは主に水溶液に懸濁する液相バイオプロダクションにて実施される。しかしながら、生産物の分離精製が容易ではないことや基質の物質移動律速による低い反応速度などの問題がある。特に、モノテルペノイドのような疎水性や揮発性の高い基質を用いる場合、物質移動律速は深刻な問題である。これらの基質は水とは十分に混ざり合わない為、曝気や攪拌に多大なエネルギーを要する。つまりバイオプロダクションであってもグリーンプロセスとは言えない。その為、この液相バイオプロダクションに代わり疎水性化合物の溶解に有機溶媒を使用する液/液二相系バイオプロセスが開発された。このシステムにより反応速度は向上したが、2種の不混和性液体間の界面を増加させるための激しい攪拌は必要としたままである。疎水性かつ揮発性基質のために、従来のバイオプロダクションにおいて反応場となる水相が存在しない気相での反応が提案されている。この反応は基質を直接気体として供給することで、高い分子拡散による効率的な物質移動やガス状基質の受動的供給が可能となり攪拌などに費やすエネルギーを大幅に削減できる。しかし、気相バイオプロダクションでの目的生産物は低分子かつ低沸点化合物に限られ、モノテルペノイドなどの有用物質生産はなされていない。また、気相バイオプロダクションにおける異なる問題として、気相反応に適した細胞固定化法の欠如が挙げられる。主に微生物触媒に使用されるゲル包括法では、ゲルの水分含有量が高いため、実際の気相反応には提供できない。

Acinetobacter sp. Tol 5 はトルエン資化能を有する微生物として排ガスリアクターより単離されたグラム陰性細菌である。Tol 5 は様々な材料表面に対して高い付着性を示し、その付着性は菌懸濁液とポリウレタン担体を混合したフラスコを数分間振盪するだけで菌懸濁液が透明になるほど、迅速にほぼ全ての菌が担体に固定化される。Tol 5 は細胞表層に接着蛋白質 AtaA を有し、Tol 5 の高い付着性に寄与していることが明らかになっている。また、気相にて担体に固定化した Tol 5 はガス状トルエンの分解が可能であることを示し、AtaA による細胞固定化法は気相での反応に実用的かつ有効な固定化技術として当研究室では確立している。微生物触媒の観点では、トルエンだけでなくベンゼンなどの芳香族炭化水素、エタノールなどの有機溶媒、トリアシルグリセロールなどの油を含む種々の化学物質の代謝および耐性を有することが明らかになっている。

Acinetobacter sp. Tol 5 は担体へ容易に固定化できて気相反応に適用しやすいことに加え、多様な炭素源を利用可能であることに注目し、本論文では Tol 5 による高付加価値モノテルペノイドの生産に関する研究を行った。第 1 章では、上記のような背景を詳述した。第 2 章では、安価で工業的に重要なモノテルペノイドであるシトラールを基質として使い、Tol 5

の生物変換能および代謝経路を特定した研究について記した。第3章では、(E)-ゲラン酸生産の気相バイオプロダクションをバッチ反応系で検討した結果について記した。第4章では、連続反応系の構築に向けた繰り返し生産について記した。最後に第5章では総括を行なった。以下に具体的な内容を述べる。

第2章では、安価で工業的に重要なモノテルペノイドである幾何異性体シトラール（ゲラニールおよびネラール）を基質に用いて、Tol5を用いた液相バイオプロダクションにて有用物質生産能の検討を目的とし、液相反応にてTol5がゲラニールから高付加価値モノテルペノイドを含む2種の生物変換生成物を生産することを明らかにした。まず、Tol5野生株によるシトラールの生物変換を実施し、生物変換生成物と自然酸化生成物を確認した。次に、Tol5ヘゲラニオールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 *geoA* を異種発現させ各シトラール前駆体（ゲラニオールおよびネロール）を基質に生物変換を行うことで生物変換生成物への代謝経路を特定した。その結果、Tol5は液相反応にてシトラールのうちゲラニールから (1R, 3R, 4R)-1-メチル-4-(1-メチルエテニル)-1,3-シクロヘキサンジオールおよび (E)-ゲラン酸に特異的に生成することを明らかにした。本章の成果は、Tol5を生体触媒に用いたモノテルペノイドの気相バイオプロダクションが実現可能であることを示唆した。

第3章では、第2章で得られた変換生成物のうち高付加価値モノテルペノイドである (E)-ゲラン酸 (GA) の気相バイオプロダクションを目的とし、代謝改変した Tol5 変異体を作製後、Tol5 が有する *AtaA* による担体固定化法を用いてバッチ式反応にて実証した。まず、(E)-GA の液相バイオプロダクションにおける継時追跡により、Tol5 の (E)-GA 分解に関与する内在的な代謝が明らかになった。そこで、(E)-GA 分解に関わる酵素をコードする *fadD4*-オルソログ遺伝子を破壊し、(E)-GA 蓄積株である Tol5 Δ *fadD4* (pGeoA) を作製した。この Tol5 Δ *fadD4* (pGeoA) をポリウレタン (PU) 担体に固定化し、バッチ式反応にてガス状ゲラニオールの受動的供給から (E)-GA の生産を可能にした。生産した (E)-GA のほとんどはPU担体に吸着したが、PU担体から固定化菌体を剥離後、環境への影響が低い溶媒であるエタノールを用いることで容易に抽出が可能となった。また、気相での最大生産速度はゲラニオール濃度に依存して増加し、本章でのバッチ式における飽和濃度よりも高い濃度である 200 $\mu\text{mol/vial}$ を添加した場合、最大生産速度は 1.4 $\mu\text{mol}/(\text{mL-reaction volume}\cdot\text{h})$ であり、液相反応での最大生産速度 70 $\text{nmol}/(\text{mL-liquid}\cdot\text{h})$ よりも約 20 倍高かった。より効率的な生産物回収プロセス構築のため固定化微生物の剥離を要さず生産物の回収が可能な溶媒組成を見出し、生産物回収プロセスの簡略化および効率的な繰り返し生産を達成した。本章は、生体触媒に Tol5 を用いたことで、高付加価値モノテルペノイドの気相バイオプロダクションを実証した最初の例となることから、Tol5 が気相バイオプロダクションにおける非常に有望なプラットフォーム株であること、気相において揮発性化合物のより環境に優しい生産が可能となることが示唆された。

第4章では、本論文全体の結論と今後の展望について述べた。

本論文では、第 2 章にて高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 によるモノテルペノイドの有用物質生産能を液相反応におけるシトラール¹の生物変換にて検討した。第 3 章では、Tol 5 の代謝を改変することで高付加価値モノテルペノイドである (*E*)-ゲラン酸蓄積株を作製し、Tol 5 が有する接着蛋白質 AtaA による担体固定化法を併用することで気相バイオプロダクションをバッチ式にて実証した。今後、気相バイオプロセスがモノテルペノイドをはじめとした様々な高付加価値揮発性化合物生産に応用され、新たな有用物質生産プロセスとなること、*Acinetobacter* sp. Tol 5 がより環境に優しく揮発性化合物の効率的生産を達成し得るプラットフォーム株になることを期待している。