

研究課題 (テーマ)		有機溶媒耐性菌 <i>Kocuria rhizophila</i> の代謝工学的改変による分子育種及び医薬品中間体生産	
研究者	所属学科等	職	氏名
代表者	生物工学科	講師	戸田 弘
分担者			
研究結果の概要			
<p>近年の SDGs への関心の高まりから、化石資源依存のものづくりから再生可能バイオマスを原料とするものづくりへのシフトが課題となっている。富山県の主幹産業である医薬品産業においても、その原材料の大部分は化石資源に由来するものであり、今後これらを植物由来原料へと置き換えていくことが大きな命題となると考えられる。これらの課題解決のために、植物由来バイオマスを微生物発酵により様々な化合物へと変換する「バイオリファイナリー」と呼ばれる技術が多く研究者により進められている。バイオリファイナリーで用いられる微生物としては、大腸菌が主要な宿主であるが、医薬品中間体や機能性高分子材料となる化合物の多く、特に芳香族化合物や炭化水素系化合物は概して疎水性が高く、かつ細胞毒性が強いものが多い。これらの化合物を微生物菌体により生産する場合、宿主菌体自体が生産物の毒性によりダメージを受け、酵素の失活や菌体の死滅により生産性が向上しないという問題がある。そこで近年では、こうした化合物に高い耐性を示す有機溶媒耐性菌を宿主として利用し、これら難水溶性化合物の生産に利用することが検討されている。</p> <p>我々が研究対象とするグラム陽性菌 <i>K. rhizophila</i> DC2201 は高い有機溶媒耐性を示すことが知られ、これまでに各種キラルエポキシ化合物の生産などについて報告してきた。また、<i>K. rhizophila</i> DC2201 の代謝系を改変することで、糖からの様々な化合物の生産を試みている。本研究ではそのモデル化合物として、芳香族化合物であるスチレンの生産を試みた。データベースよりフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子および桂皮酸脱炭酸酵素(FDC, PAD)をそれぞれ取得し、それら遺伝子の合成を行った。合成した遺伝子を <i>Kocuria</i> 用発現ベクター pKITE101P および pKITE303P へそれぞれクローニングし、<i>K. rhizophila</i> DC2201 野生株および TyrA 破壊株、TrpE 破壊株、TyrA-TrpE 二重破壊株へ導入した。PAL, FDC, PAD 導入株を用いてグルコースを炭素源として培養を行った結果、培養上清中に約 0.01 mM のスチレンの蓄積を確認した。また、各破壊株を宿主として同様に培養した結果、二重破壊株において 0.15 mM のスチレン生産が認められ、生産性の向上が確認された。また、生産株の培養時に培地に各種有機溶媒を添加し二相系培養を行った結果、n-オクタンを添加した場合にオクタン層に 0.5 mM のスチレンの蓄積が認められ、生産量の向上が確認された。</p>			
今後の展開			
<p>二相系培養によりスチレンが有機溶媒層に移行することで細胞への毒性が低下し、生産性が向上することが推測された。遺伝子破壊や過剰発現により、糖消費速度の向上や有機溶媒耐性の向上を行うことで、さらにスチレン生産量の向上が期待される。また、他の化合物についても順次代謝系の構築を行い、様々な化合物生産に対応できるバイオプロセス構築を試みる予定である。</p>			