

未来社会創造事業 探索加速型
「地球規模課題である低炭素社会の実現」領域
終了報告書(探索研究)

令和3年度
研究開発終了報告書

平成29年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名：柘植 丈治]

[東京工業大学物質理工学院・准教授]

[研究開発課題名：中分子膜輸送強化による発酵技術改革]

実施期間：平成29年11月1日～令和4年3月31日

§ 1. 研究実施体制

(1)「柘植」グループ(東京工業大学)

① 研究開発代表者:柘植 丈治 (東京工業大学物質理工学院、准教授)

② 研究項目

- ・中分子分泌強化系の開発(実用的な原料探索)
- ・中分子取り込み強化系の開発(中分子量化促進)
- ・中分子活用のプロトタイピング(高分子量合成)

(2)「廣江」グループ(東京農業大学)

① 主たる共同研究者:廣江 (東京農業大学生命科学部、助教)

② 研究項目

- ・中分子高分泌系の開発

(3)「麻生」グループ(京都工芸繊維大学)

① 主たる共同研究者:麻生 祐司 (京都工芸繊維大学繊維学系、教授)

② 研究項目

- ・中分子量化促進系の開発

§ 2. 研究実施の概要

本研究では、植物バイオマス由来の原料から中分子量体オリゴエステルを菌体外に分泌生産する新しい発酵法の開発を行った。オリゴエステルは、マクロモノマーや分散剤などとして利用することができ、何よりも効率的な分泌生産法が確立できれば、他の発酵法と比較して生産物の精製プロセスを簡素化できる利点がある。本研究の目的は、中分子の膜輸送強化などの要素技術の開発を行うことで発酵技術改革を推進し、それによって達成される低炭素化効果を検証することにある。

まず、中分子オリゴエステル生産の増強を目的に、大腸菌BW25113株を宿主に用い、培養条件の最適化による生産収量の増大を試みた。培養条件の最適化前ではオリゴエステルが少量しか分泌されなかったが、最適化を行うことで大幅に分泌量が増え、ジエチレングリコールを連鎖移動剤として培地に添加した際に35 g/Lまで分泌量が増加した。分泌されたオリゴエステルは3~7量体であり、カルボキシ末端側にジエチレングリコールが付加したジオール構造を有していた。さらに、このオリゴエステルとジイソシアネートを用いて重付加を行い、高分子量体(分子量2万程度)のポリウレタンが合成可能であることを確認した。得られたポリウレタンは非晶性で、ガラス転移温度が40℃付近に観察された。また、1,3-プロパンジオールおよび1,2-プロパンジオールを用いて分泌生産したオリゴエステルでは、重付加でポリウレタンにした場合に、ジエチレングリコールの場合よりもガラス転移温度が10~20℃ほど高い重合物が得られた。

分泌強化株の育種では、オリゴエステルの膜輸送機構について網羅的な調査を行い、特定の遺伝子の欠損がオリゴエステルの分泌を促進する現象を発見した。また、オリゴエステルの高生産化を目的とし、重合酵素の可溶化技術についての検討も行った。

さらには、ジエチレングリコールなどのジオールを添加せずとも分泌生産が可能な宿主の開発を目指して、大腸菌BW25113株を代謝改変し、連鎖移動剤として機能する1,3-プロパンジオールおよび1,2-プロパンジオール生産株の育種を行った。

培養液中に分泌生産されたオリゴエステルは、有機溶媒を用いた液液抽出や逆相カラムを用いた固相抽出により容易に精製することができ、低分子化合物を発酵産物とする場合と比較して精製プロセスを省エネルギー化することが期待できる。

主要な成果

Hiroe, A., Sakurai, T., Mizuno, S., Miyahara, Y., Goto, S., Yamada, M., Tsuge, T. & Taguchi, S. (2021). Microbial oversecretion of (*R*)-3-hydroxybutyrate oligomer with diethylene glycol terminal as a macromonomer for polyurethane synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1290-1296.

Sato, R., Tanaka, T., Ohara, H., & Aso, Y. (2021). Disruption of *glpF* gene encoding the glycerol facilitator improves 1,3-propanediol production from glucose via glycerol in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 72(1), 68-73.

Sakurai, T., Mizuno, S., Miyahara, Y., Hiroe, A., Taguchi, S., & Tsuge, T. (2022). Optimization of culture conditions for secretory production of 3-hydroxybutyrate oligomers using recombinant *Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 829134.