

VII-33 発泡スチロールバイオリサイクル法構築のための溶解剤リモネン生産大腸菌の作製

東北学院大学大学院 ○学生員 鈴木 祐介 前澤工業株式会社 正会員 及川 栄作
東北学院大学大学院 LINN KHIN THIDA (株) 創造的生物工学研究所 及川 胤昭
東北学院大学工学部 正会員 石橋 良信

1. 始めに

最近、都市の生活ゴミや産業廃棄物処理は、環境や生態系を考慮する傾向にあり、回収およびリサイクルは各自治体で活発に行われている。しかし、発泡ポリスチレン（発泡スチロール）のリサイクル率は半数に過ぎない。回収が促進されない理由は、重さのわりに体積がかさばることから、収集・運送の回数が多くなり、コストが割高になる点にある。また、熱を加えて体積を縮小する技術もあるが、熱はポリスチレンの化学構造を破壊し、再生品の質を極端に落す結果になる。そのような背景の中、容器包装リサイクル法によって2000年から発泡スチロールも再利用が義務づけられた。

一方、発泡スチロールはレモンなど柑橘系果物の表皮に多く含まれるリモネンという物質で溶解することが知られているが、これまで工業化されているリモネンは果物汁から精製されたものが用いられているおり、季節や天候の影響を受けるなど実際の利用には制限がある。

本研究では、研究室内でクローニングしたリモネン合成遺伝子を大腸菌で発現させることで、外部環境に影響されることなく短期間でリモネンをつくりだすことを可能としている。

本研究では、リモネンの基質となる物質を生体内で合成するために必要な遺伝子をリモネン合成遺伝子とともに大腸菌内で共発現させることでリモネン生産の効率化を図り、その生産効率をガスクロマトグラフ分析計を用いて定量した。

2. 実験原理

本研究では、リモネン生産に必要な遺伝子群を大腸菌に高発現させる方法により改良を試みた。原理的には、リモネン合成に必須の基質であるゲラニルニリン酸(GPP)を合成する遺伝子、その前駆物質であるイソペンテニルニリン酸 (IPP) の合成に必要な遺伝子をリモネン合成遺伝子と大腸菌内でコピー数の高いプラスミドを用いて共発現させ、リモネンを短期間で大量に生産する大腸菌を作製することを目的としている。

具体的には、非メバロン酸経路の最終段階の生成物質でリモネン合成遺伝子の基質となるイソペンテニルニリン酸(IPP)をリン酸化し、IPPを合成する遺伝子イソペンテニルニリン酸キナーゼ(IP kinase)と、中程度高熱菌由来のファルネシルニリン酸合成遺伝子に部位特異的変異導入法によって、GPPを合成するように改変した変異体 GPP 合成遺伝子^①をプラスミドにクローニングしたものを大腸菌に導入した。

さらに本研究では、ペパーミントからクローニングした
(一) リモネン合成遺伝子を同時に大腸菌に導入した。

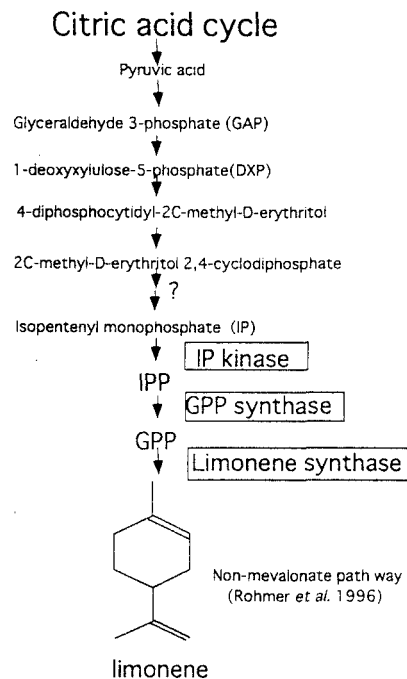


図-1 非メバロン酸経路によるリモネン生合成の流れ

3. 実験方法

(-)Limonene synthase 合成遺伝子はペパーミントから RT-PCR クローニングし、IP kinase 合成遺伝子は大腸菌の染色体から PCR クローニングした。GPP synthase 合成遺伝子は生産効率を増加させた変異体を用いた。それぞれの遺伝子断片は大腸菌発現用のベクターに組み込み、大腸菌に導入した。作成した大腸菌を 20℃、28℃、37℃の異なる温度条件下で M9 最小培地を用いて培養し、増殖速度(OD₆₀₀)を測定すると同時に、培養液からリモネンをヘキサンで抽出した。抽出物はガスクロマトグラフ分析計を用いてリモネンの生産量の測定をおこなった。

実際のリモネンの生産量は、リモネンの標準液をヘキサンで 1/2000 および 1/4000 に希釈した検体のピークエリアと比較し、リモネンの生産を確認、生産量を算出した。

4. 実験結果および考察

ガスクロマトグラフ分析計での測定結果を図-2に示す。これより、Limonene synthase と IP kinase を共発現させた大腸菌では、24 時間後を最大としたピークエリアが確認でき、その後は減少傾向にあった。大腸菌の増殖度とリモネン生産量の関係は、大腸菌の対数増殖期に最大の生産量が示された。

Limonene synthase のみと GPP synthase、IP kinase のそれぞれを Limonene synthase と共発現させた大腸菌について、最大生産量の測定結果を図-3 に示す。結果より、Limonene synthase のみを挿入した大腸菌では生産は確認されなかった。GPP synthase、IP Kinase のそれぞれを Limonene synthase と共発現させた大腸菌についてはリモネンの生産が確認できた。最大リモネン生産量は、Limonene synthase と IP kinase を導入した大腸菌を用いた際に 2.62 g/l であった。

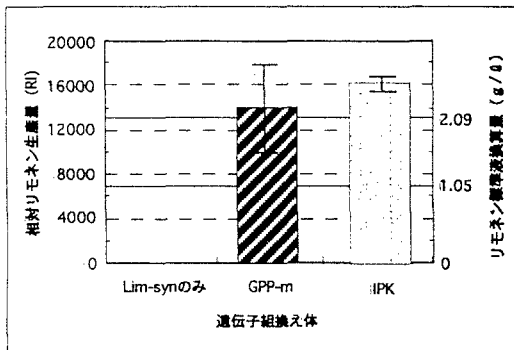


図-2 各種組換え遺伝子による最大リモネン生産量

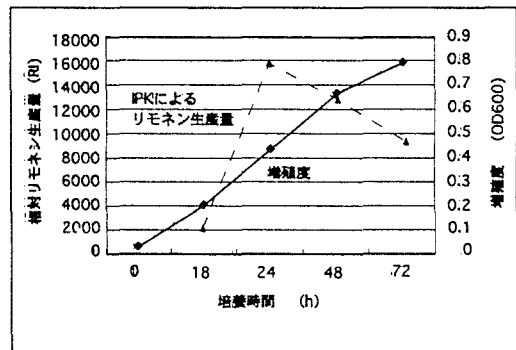


図-3 増殖度とリモネン生産量の関係

5. おわりに

本研究により、遺伝子組換え体を用いてリモネンを生産する際には GPP synthase や IP kinase の基質合成遺伝子を Limonene synthase と共発現させることでその生産量を増加させられることが確認された。今後は、別の基質を合成する遺伝子を組み込み、さらなる生産量の向上を目標としたい。また、実験により大腸菌で生産したリモネンを培養液から、ガスクロマトグラフ分析法を用いて容易に分析する方法も確立することができた。このモノテルペン生産法は培養液量を 100L や 1t といったスケールアップを行うことによって工業生産が可能であり、最終目標である発泡スチロール処理のための安価なリモネン供給が実現すれば、環境に低負荷でやさしい発泡スチロールリサイクル処理が現実なものになると考えている。

最後に本実験を遂行するにあたり、卒業研究生糸賀辰行君、佐々木寿幸君の労に負うところ大である。記して感謝する。

参考文献 1) Keishi N., Shin-ichi O., and Tokuzo N.: Protein Design of Geranyl Diphosphate Synthase. Structural Features That Define the Product Specificities of Prenyltransferases, J. Biochem. 126, 566-571, 1999