

研究題目： 乳酸大量生産に向けた4生物種L-LDHの解析

氏名： 廣江 綾香 所属：慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科

研究概要

近年、資源循環型の新素材として環境負荷の小さいバイオプラスチックであるポリ乳酸(Poly Lactic Acid; PLA)が注目されている。本研究は、ポリ乳酸の原料となるL-乳酸を大腸菌の乳酸発酵により大量生産する技術開発を目的として行っている。その中で我々は、大腸菌の乳酸生産に関わる代謝メカニズムを解明し、より乳酸生産性の優れた菌株を作成するための指針を得たいと考えている。その一貫として今回、4生物種(乳酸菌・ショウジョウバエ・マウス・シロイヌナズナ)のL-乳酸デヒドロゲナーゼ(L-LDH)遺伝子をそれぞれ導入した組み換え大腸菌株を作成、培養し、4つの組み換え大腸菌株の乳酸生産能を評価した。また、4生物種の酵素L-LDHのキネティクス(反応速度論的特性)を調べ、L-LDH遺伝子を導入することによる代謝の変化、つまり乳酸生産性の違いを考察した。

対象と手法

本研究の対象は、4生物種(乳酸菌・ショウジョウバエ・マウス・シロイヌナズナ)のL-乳酸デヒドロゲナーゼ(L-LDH)である。ストラテジーとして実験のフローチャートを図1に示した。まず、大腸菌株の乳酸生産性を向上させるため、4生物種由来のL-LDH遺伝子をそれぞれクローニングしたプラスミドを用意し、これを導入した4種類の組み換え大腸菌株を作成した。導入する大腸菌には、図1下方に示した発酵経路においてL-乳酸以外の副産物生成に関わる3つの遺伝子(*pta*, *ldhA*)のノックアウト株を用いた。その後、L-LDH導入株の乳酸生産性を調べるため、ジャーファーマンター培養を行い、蓄積されたL-乳酸量等の測定を行った。また、大腸菌におけるL-乳酸合成に対する異種L-LDHの寄与を酵素学的に検討するために、培養した大腸菌株とは別に、L-LDHを大量発現する大腸菌株を作成し(調製プラスミドを大腸菌DH5 $\alpha$ 株に導入したもの)、*in vitro*酵素活性のキネティクス、ならびに乳酸合成の培養条件下から得た酵素粗抽出液のL-乳酸合成活性を調べた。

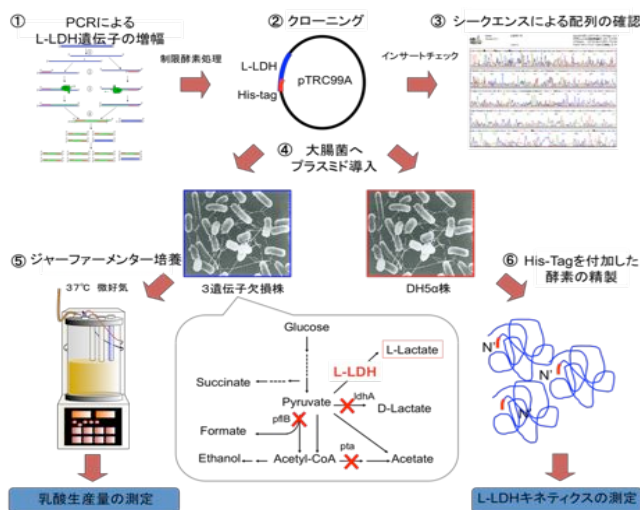


図1. 実験フローチャート

結果

(1) 組み換え大腸菌株の乳酸生産

乳酸菌、ショウジョウバエ、マウス、シロイヌナズナのL-LDH遺伝子を導入した組み換え大腸菌株のL-乳酸合成効率を調べるために、各株の培養液のOD<sub>600</sub>、グルコース濃度、L-乳酸濃度、D-乳酸濃度の経時変化を調べた(図2)。表1には、各株のL-乳酸生産量、乳酸の重量収率、純度、基質消費時間を培養実験データから算出し、まとめた。上位3株は、L-乳酸生産量、収率、純度ともほぼ同様の値を示しており、基質消費速度(培養時間)のみ大きく異なった。乳酸菌L-LDH遺伝子を導入した組み換え大腸菌株が、最短の時間で高い乳酸生産性を示したことから、乳酸菌由来のL-LDHが乳酸生産に適していることが示

唆された。また、いずれの遺伝子導入でもD-乳酸の混入を抑制できており、大腸菌における高純度L-乳酸生産が可能であることを示した。

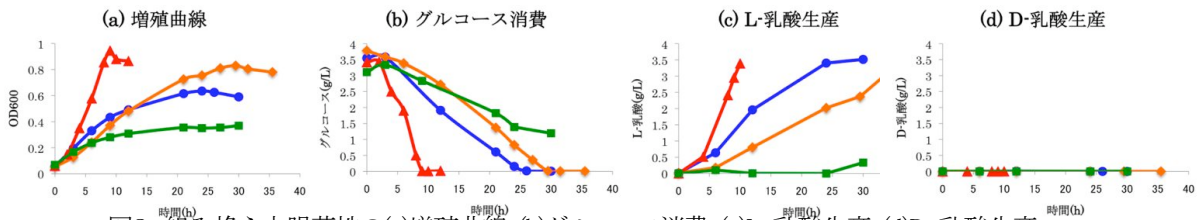


図2. 組み換え大腸菌株の(a)増殖曲線・(b)グルコース消費・(c)L-乳酸生産・(d)D-乳酸生産

表1. 組み換え大腸菌株のL-乳酸生産量・収率・純度・基質消費時間

L-LDH生物種	L-乳酸生産量(g/L)	収率(%)*1	純度(%)*2	時間(h)*3
▲ 乳酸菌	3.4	85	99.9	10
● ショウジョウバエ	3.5	88	100	30
◆ マウス	3.3	84	100	36
■ シロイヌナズナ	0.3	12	100	>40

\*1: 収率=L-乳酸生産量(g/L)/グルコース消費量(g/L) \*2: 純度=L-乳酸生産量(g/L)/(L-乳酸+D-乳酸生産量(g/L))  
\*3: 時間=グルコース(4g)消費時間

## (2)L-LDHのキネティクスの解析

以下に、精製酵素の活性測定から得られた乳酸菌・ショウジョウバエ・マウスのL-LDHの反応速度と基質濃度の関係を示した(図3)。乳酸菌、マウスはミカエリス・メンテン型の酵素活性、ショウジョウバエはアロステリック型の酵素活性を示した。また、図3の反応速度曲線から算出した各L-LDHのキネティックパラメータ(Km, Vmax)を表2に示した。これらの結果より、乳酸生産性が最も高いとされた乳酸菌由来L-LDHの最大反応速度(Vmax)は3生物種L-LDHの中で最も遅く、基質への親和性(Km)も、マウスL-LDHよりも大幅に劣っていることが明らかになった。このことは、高いL-LDH活性が必ずしも大腸菌細胞内での効率的なL-乳酸生産を引き起こすとは限らないことを示し、他の代謝的なファクターが存在する可能性を示唆している。また、より乳酸合成と酵素活性の関連性を明確にするために、実際に(1)の乳酸発酵条件下の菌体から調製したタンパク質溶液を用いて活性測定を行った。以下に、粗酵素液の作成に用いた菌体のサンプリング時間とそれぞれのサンプリング時間における各L-LDHの比活性を示す(表3)。表3より、培養中の菌体を破碎して得た粗酵素液を用いた活性測定においても、精製酵素の活性測定と同様に、乳酸菌L-LDHの比活性(1mgのタンパク質当たりが1分間に消費する基質の量;  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )がサンプリング時間を問わず最も低いことが示された。

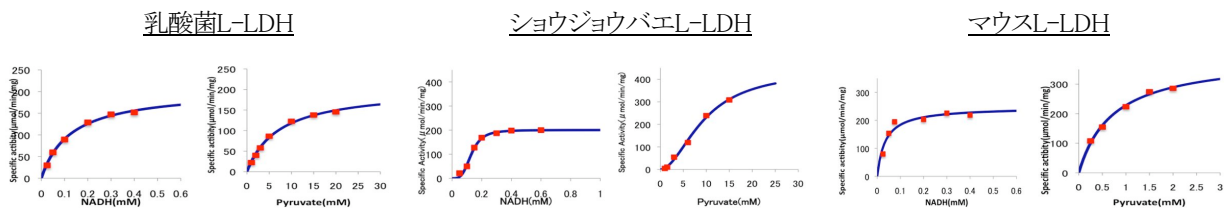


図3. 3生物種L-LDHの基質濃度と反応速度の関係

表2. 4生物種L-LDHキネティクス(pH7.0, 37°Cの同一条件下)

L-LDH生物種	基質	Km,app(mM)	Vmax( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )
乳酸菌	NADH	0.126	205
	Pyruvate	7.22	203
ショウジョウバエ	NADH	0.130	200
	Pyruvate	9.57	444
マウス	NADH	0.034	247
	Pyruvate	0.728	395
シロイヌナズナ	NADH	—	—
	Pyruvate	—	—

表3. 粗酵素液の比活性

L-LDH生物種	サンプリング時間(h)	比活性( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )
乳酸菌	4	11.32
	9	9.60
ショウジョウバエ	6	19.74
	24	47.49
マウス	9	34.03
	30	16.33
シロイヌナズナ	6	—
	24	—

## 議論

乳酸菌L-LDHを導入した大腸菌株の乳酸生産性が最も高いにも関わらず、乳酸菌由来L-LDHの最大反応速度(乳酸合成方向)が最も小さく、基質との親和性も低いことが示された。これまで、物質生産性の向上は、目的とする代謝物質を生産する系における酵素の発現量を上げ、単純に反応速度を上げるように改変が行われてきた。しかし、本研究の結果より、単一の酵素の量や活性を増大させるだけでは、乳酸生産速度は向上しないことが示唆された。展望として、L-LDH逆反応キネティクス及び細胞内メタボロームデータの取得と大腸菌乳酸発酵モデルの構築を予定している。乳酸発酵のシミュレーションにより、乳酸生産の律速となっている要素を同定し、乳酸性向上の指針を示したい。