

XB120

生体触媒利用技術の無駄が徹底的に省ける新技術の開発

(阪大)○(正)大竹久夫*、本田孝祐、(正)大政健史
(耐熱酵素研) 奥 崇、岩田 英之、(広大)黒田章夫

演者らは平成13年度より、経済産業省の経費による「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」および「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」プロジェクトに参画してきた。この取組の中で、今後重要となる技術開発課題の一つが、多様な化成品を自在に製造できる生体触媒利用技術の開発であることを強く意識するに至った。しかし、化成品製造分野にバイオプロダクション技術を導入するためには、生体触媒利用技術を化学触媒利用技術並みに簡略化する必要がある。化学触媒利用技術に較べると、生体触媒利用技術は複雑で手間とコストが掛かり、生体触媒利用技術の化成品製造分野への進出は阻まれている。生体触媒利用技術を化学触媒利用技術並みに簡素化するためには、多くの技術的課題を克服する必要があるが、国内外いずれにおいてもまだ、生体触媒利用技術を化学触媒利用技術並みに簡略化しようとする戦略的研究は行われていない。

本プロジェクトでは、①生体触媒を精製する必要がなく、②副産物を生成せず、③多様な化学原料を変換でき、④雑菌汚染の心配もなく、⑤複雑な培養制御もいらない、夢のバイオプロダクション新技術を構築することを目的としている。本プロジェクトが対象とする技術開発要素には、以下の様なものがある。

- 生体触媒精製の不要化
- 副反応の完全除去
- 補酵素再生系との共役化
- 多段階反応の最少ステップ化
- スケールアップおよび反応制御の簡略化
- 有機溶媒中での生体触媒の活用
- 生体触媒発現細胞のライブラリー化

本技術開発ではまず、超好熱菌より耐熱性酵素遺伝子をクローニングする(工程①)。耐熱性酵素遺伝子を大腸菌や親油性放線菌などの中温菌で高発現させる(工程②)。形質転換株を30-37℃で大量に培養する(工程③)。培養した菌体を70-100℃の高温で処理する(工程④)。加熱処理により、耐熱性酵素以外の酵素が失活し、変成した蛋白質や核酸により耐熱性酵素が細胞内に固定されるとともに、細胞表面に無数の小孔が形成されて物質の透過性が高まる。耐熱性酵素のみが機能し細胞の物質透過性が高まった死滅細胞を固定化耐熱生体触媒として回収し、合成反応に用いる(工程⑥)。

固定化耐熱生体触媒を生体触媒であることを意識せずに、化学触媒に準じた取扱いができる点に本技術の特色がある。演者らは、本プロセスを

Simple ECO (Enzymatic Conversion) Process と命名し、各技術要素が開発可能であることを実証的に示すための基礎実験を実施している。超好熱菌由来の耐熱性酵素は、高温条件下でも高い酵素活性を保持するため、70-100℃の高温条件下で化成品の合成反応が可能になる。高温条件下で合成反応を行うことで、基質の溶解度が増大するとともに雑菌の汚染を防止できることも利点となる。また、熱処理により中温菌の酵素は総て失活するため、酵素を精製しなくても他の酵素による副反応物の生成を懸念する必要がない。さらには、高温処理により細胞表面の物質透過性が上昇するので、膜を透過しにくい基質や生産物の菌体内外への移動が促進される。なお、菌体そのものは生理活性を保持する必要がないから、大量培養した菌体の保存は容易であり、パン酵母の様に菌体ペーストとして工場等へ出荷することも容易になる。中温菌に *Rhodococcus opacus* B-4 株などの親油性細菌を利用すれば、化学プロセスと同様に有機性溶媒中での化成品製造が可能となる。さらには、生菌体を用いては実現不能な酵素反応を逆行させたり、代謝経路をバイパスさせるなどの改変も可能である。

本講演では、Simple ECO Process の実験例を具体的に示しながら、①生体触媒を精製する必要がなく、②副産物を生成せず、③多様な化学原料を変換でき、④雑菌汚染の心配もなく、⑤複雑な培養制御もいらない、夢のバイオプロダクション新技術が実現可能であることを説明したい。



図1 組換え大腸菌を70℃で数分加熱すると、耐熱性酵素以外の酵素は全て失活するとともに、細胞に穴が開く。

* 連絡先 hohtake@bio.eng.osaka-u.ac.jp