

# XB121

## 微生物菌体を用いた代謝連動反応による工業的物質生産

(協和発酵バイオ 生産技術研究所) ○小川 達也\*

### 【はじめに】

協和発酵の研究グループが 1956 年に世界初の発酵法によるアミノ酸製造技術を発明して以来、種々発酵技術の開発過程において代謝制御発酵という近代的な発酵理論が確立され、発酵法による様々な有用物質の大量生産が可能となった。近年では遺伝子組換え技術の目覚ましい進歩で、実用的に使用できなかった様々な生物機能の利用が可能になり、発酵分野の技術革新が加速している。当社も最先端の発酵技術を駆使して発酵法によるアミノ酸、核酸関連物質をはじめ、最近ではヒドロキシプロリン(HYP)、ジペプチドなどの効率的な生産技術を相次いで開発し事業化に成功した。微生物に秘められた無限の可能性を追求する発酵研究紹介の一端として、本報では ATP 再生に代表される代謝連動反応を効率的に利用する発酵生産プロセスを取上げ、その手法、適用例、及びスケールアップと工業化検討について概説する。

### 【代謝連動反応を利用する発酵生産プロセス】

多くの生合成酵素が生合成のエネルギー源として ATP を必要とするが ATP が高価なため、それを原料とする生産プロセスは経済的に成り立たない。我々は細菌の ATP 再生能と ATP を必要とする生合成酵素を共役させることにより、ATP の代わりに glucose を用いて有用物質を生産するプロセスを開発した。この反応系は膜透過性付与のための処理により増殖能を失った「休止菌体」を酵素源とするため、細胞膜処理技術がプロセス実用化の重要ファクターとなる。

自己共役反応系と異菌体間共役反応系があるが(図 1)、前者はアデニンを基質とする ATP 製法で実用化している。後者は ATP 再生菌を *C.ammoniagenes*、生合成酵素供給菌を組換え *E.coli* と分離することで、反応の選択枝を大きく広げることが可能になる。

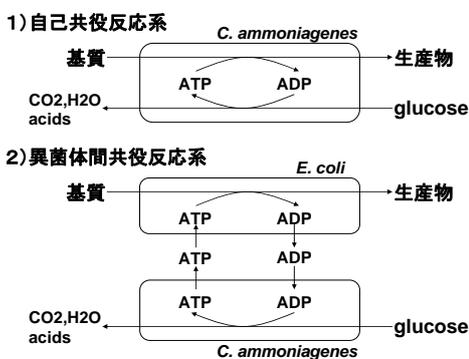


図1 ATP再生反応系の模式図

脳血管障害に対する医薬品の原料となる CDP コリンの実生産に適用している他、本系を用いて、細胞表層で様々な認識に関与し幅広い用途が期待されているオリゴ糖の合成基質となる糖ヌクレオチド生産系、更にはオリゴ糖そのものの生産系にも適用している。

その他の代謝連動反応の応用例として HYP 生産は Pro 水酸化酵素遺伝子を発現する組換え *E.coli* を用いるが、水酸化反応の基質となる 2-oxoglutarate の供給と反応副産物 succinate のリサイクルを、glucose を原料とする菌自体の代謝反応に担わせる効率的なプロセスである。また L-アミノ酸 α リガーゼ(Lal) とポリリン酸キナーゼ(Ppk)を発現させた組換え *E.coli* の休止菌体を用いるジペプチドの製造法は、Lal による基質アミノ酸からのジペプチド合成反応と Ppk による ATP 再生系を連動させることにより成立する。

### 【スケールアップと工業化】

CDP コリンの製法(図 2)を例に上げると、まず 2 種類の菌を夫々大型発酵槽で培養する。膜処理を施した後、発酵液を混合し、基質を添加して反応を行うが、培養・反応工程は大型発酵槽へのスケールアップと培地の作成～添加法、培養・反応条件や膜処理条件の最適化が重要となる。精製工程は菌体分離 etc 一部、発酵法特有の単位操作もあるが基本的には一般の化学プラントと類似の考え方で、生産速度・収率・品質を指標に各工程のスケールアップと単位操作の最適化が図られる。本報では一連のスケールアップや工業化検討のポイントとともに、発酵法特有の技術課題等について概説する。

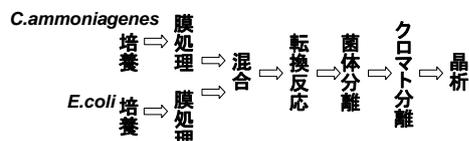


図2 CDPコリンの製造フロー

### 【参考文献】

- 1) Hashimoto J. Biol. Macromol. 8; 28-37 (2008)
- 2) Hashimoto et al. Current Opinion in Biotech. 10; 604-608(1999)
- 3) 藤尾ら バイオサイエンスとインダストリー 59; 83-88(2001)
- 4) 小泉 バイオサイエンスとインダストリー 60; 95-98(2002)

\*連絡先 E-mail:tatsuya.ogawa@kyowa-kirin.co.jp