

XB122

組換え酵素を利用した 7-アミノセファロスポラン酸の製造

(塩野義製薬 生産技術本部) ○瀧本 明生*

【はじめに】

Cephalosporin-C acetylhydrolase (CAH)は、セファロスポリンC (CPC) や7-アミノセファロスポラン酸 (7-ACA) などのセファロスポリン類の脱アセチル化を触媒するエステラーゼである。生成物のデアセチルセファロスポリン類は種々の半合成セファロスポリン系抗生物質製造の出発原料として有用である。CAH 活性は、柑橘類の皮、カビ、酵母、放線菌などで報告されているが、これまでに産業上利用された例はなかった。我々は土壌より分離した枯草菌の一菌株 *Bacillus subtilis* SHS 0133 が新規なCAHを生産し、かつ、本酵素が7-ACAの脱アセチル化を効率よく触媒することを見出した。しかしながら、デアセチル7-ACAの工業的生産法確立のためには、

- (a) CAH 生産量は 5 mg/L と非常に少ない
 - (b) 臭気が激しく高度な脱臭対策が必要
 - (c) 孢子形成菌であり GMP 上好ましくない
- 等の問題があった。そこで、安全性の確立されている大腸菌宿主を用いて組換え CAH によるプロセス開発を行うこととした。

【枯草菌由来 CAH の精製および特性解析】

Bacillus subtilis SHS 0133 株の培養液より CAH を精製し、その酵素化学的諸性質を調べた。本酵素は、分子量 35 kDa の均一サブユニットからなる 8 量体構造を持っていた。また、至適 pH は、基質である7-ACAおよび生産物であるデアセチル7-ACAの溶解度が高い 8.0 - 8.5 であり、工業的使用に好適であると考えられた。CAH は、基質に対して Michaelis-Menten 型の濃度・速度相関を示し、生成物阻害は極めて微弱であることが分かり、デアセチル7-ACAの工業生産にとって有利な性質と考えられた。

【組換え大腸菌による CAH の大量生産】

CAH 遺伝子をクローニング、全塩基配列を決定し、954 bp (318 アミノ酸残基) からなる読み取り枠を見出した。次に、大腸菌で CAH 遺伝子を高発現させるために、宿主・ベクター・プロモーター・SD-ATG 間配列などの検討を行ない、生産用組換え大腸菌を造成した。また、培地成分についても種々検討し、M9 を基本とし、炭素源としてグリセロール、窒素源としてカゼインおよび酵母エキスを添

加したものを選択した。30-L ジャーファーマンターで 37°C、20 時間培養した結果、約 5 g/L の生産が可能となった。本培養法では、操作が煩雑な流加培養は行っておらず、スケールアップも容易である。発現した CAH は、大腸菌細胞の可溶性画分から、8 量体の活性型として容易に回収された。

【固定化 CAH を用いたデアセチル 7-ACA の生産】

組換え体の培養液から菌体を分離し、細胞破碎後、珪藻土由来の Micro-Gel T38 (Manville, Col., USA) で処理して不純物を除去することにより酵素液を得た。Micro-Gel T38 による精製のみで純度は 90% 以上に達した。限外ろ過膜により酵素を濃縮した後、固定化を実施した。固定化酵素による反応は、酢酸生成に伴う pH 低下を制御する必要があることから、カラム法は採用せず、バッチ形式で行った。また、7-ACA は水溶液中で不安定であるため、スラリー状で供給し、反応は 20°C で実施することとし、200-L のパイロットスケールのバイオリクターを設計した。

実際に反応を行わせたところ、物質収支式から得られる理論値と実験値は良い一致を示した。200-L のバイオリクターを使用するパイロットスケールの反応では、14 L の固定化酵素を用いて、10 kg の 7-ACA を連続的に供給しながら 20°C、pH 8.0 の制御下で脱アセチル反応を実施した。約 80 分の反応で 7-ACA は消失し、デアセチル 7-ACA に変換された。また、本固定化酵素を 70 日間、52 回繰り返し使用したが、反応終了時間の延長は認められなかった。

現在、本バイオリクターをスケールアップすることに成功し、抗生物質プロモックスの合成原料としてデアセチル 7-ACA を工業生産している。

【参考文献】

- 1) Takimoto et al. J. Ferment. Bioeng., 77 17-22 (1994).
- 2) Takimoto et al. J. Biosci. Bioeng., 87, 456-462 (1999).
- 3) Takimoto et al. Appl Microbiol. Biotechnol., 65, 263-267 (2004).

* 連絡先 E-mail: akio.takimoto@shionogi.co.jp