

# 非水系バイオプロセスを可能とする 有機溶媒耐性生体触媒

大阪府立大学 大学院  
工学研究科 物質・化学系専攻

荻野 博康

〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1 - 1

TEL・FAX: 072-254-9296

E-mail: [ogino@chemeng.osakafu-u.ac.jp](mailto:ogino@chemeng.osakafu-u.ac.jp)

# 化学産業の最近の動向

- I. 環境負荷の少ない製造方法が求められている。（省資源・省エネルギー・廃棄物削減・環境調和型プロセス）
- II. 日本の化学産業では機能性製品やファインケミカル製品の重要性がますます高まっている。（高付加価値・高機能・高性能・高品質・高純度）
- III. 機能性製品やファインケミカル製品の製造では、有機溶媒存在下で反応を行うことが多い。（複雑な構造・難水溶性・水中で不安定・蒸発により容易に除去）

# 有機溶媒存在下での酵素反応の利点

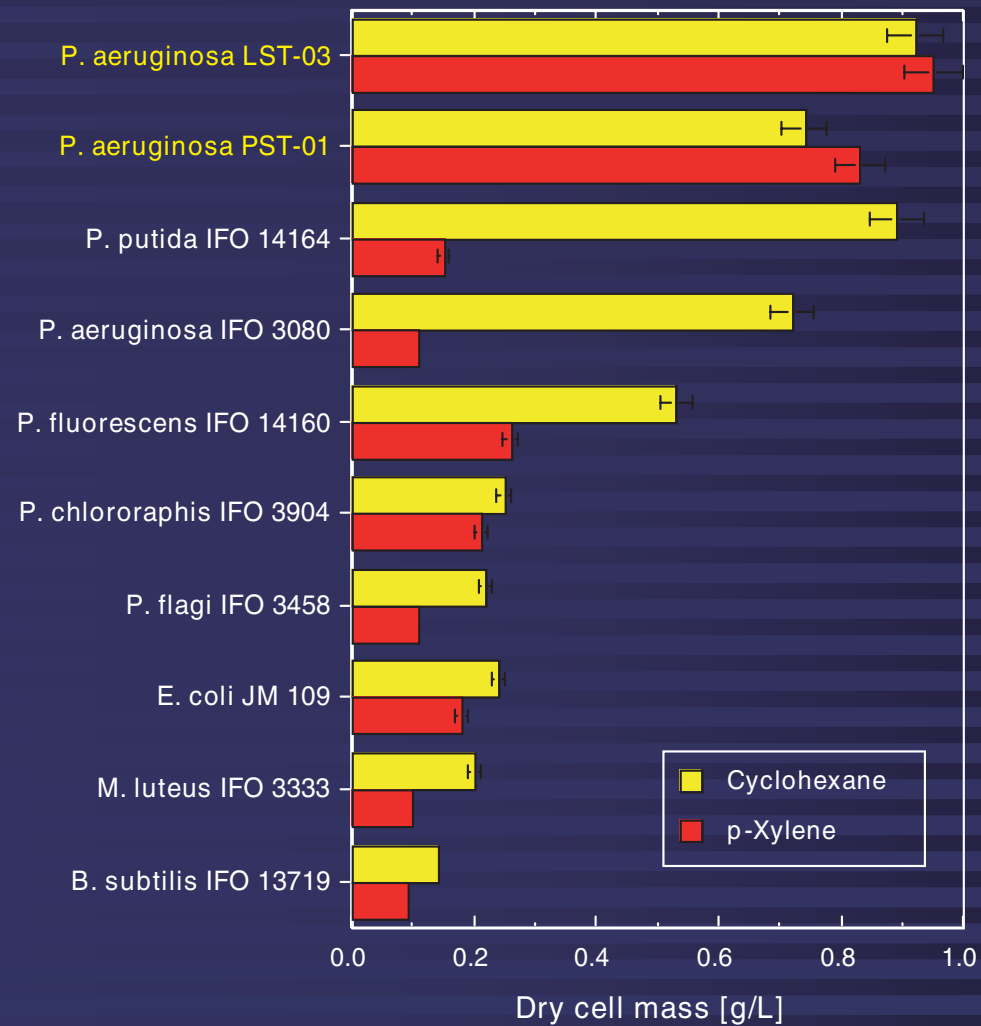
- 非極性の基質の溶解性向上
- 反応平衡を加水分解から合成側に移行
- 反応溶液の微生物汚染の低減

# 有機溶媒耐性酵素を生産する 有機溶媒耐性微生物

有機溶媒に安定なリパーゼを生産する  
有機溶媒耐性微生物

有機溶媒に安定なプロテアーゼを生産する  
有機溶媒耐性微生物

# 種々の微生物の有機溶媒存在下での生育

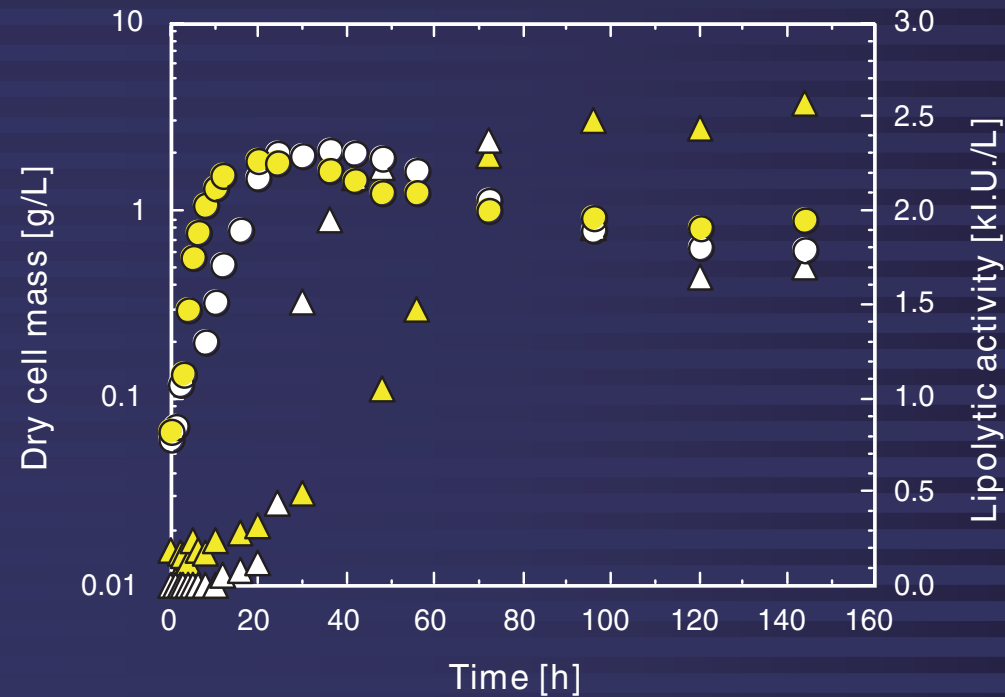


有機溶媒耐性リパーゼ生産株

有機溶媒耐性プロテアーゼ生産株

有機溶媒耐性微生物は  
有機溶媒存在下でも  
良好に生育できる

# 通気培養槽での有機溶媒耐性微生物の生育 と有機溶媒耐性リパーゼ生産



- Growth in the presence of cyclohexane
- Growth in the absence of an organic solvent
- ▲ Activity in the presence of cyclohexane
- ▲ Activity in the absence of an organic solvent

有機溶媒存在下での  
リパーゼ生産・発酵  
が可能

# LST-03リパーゼの 有機溶媒存在下での安定性

Organic solvent	Half-life [d]
<i>n</i> -Decane	> 100
Ethyleneglycol	50.0
Dimethylsulfoxide (DMSO)	36.2
<i>n</i> -Octane	29.0
<i>n</i> -Heptane	17.7
Isooctane	16.4
Cyclohexane	15.7
<i>n</i> -Hexane	11.6
Methanol	11.3
Glycerol	10.8
<i>N, N</i> -Dimethylformamide (DMF)	9.5
1,4-Butanediol	9.3
Toluene	9.0
<i>p</i> -Xylene	8.3
Triethyleneglycol	7.7
Ethanol	7.6
1,5-Pentanediol	6.8
<i>tert</i> -Butanol	1.2
None	12.5

リパーゼ及びこれを  
産生する微生物

特許第3514799号  
(2004年1月23日)

# *P. aeruginosa* LST-03株におけるリパーゼの 予想される発現・活性化機構

DNA  
RNA

リパーゼ遺伝子

シャペロン遺伝子

翻訳

翻訳  
膜に局在

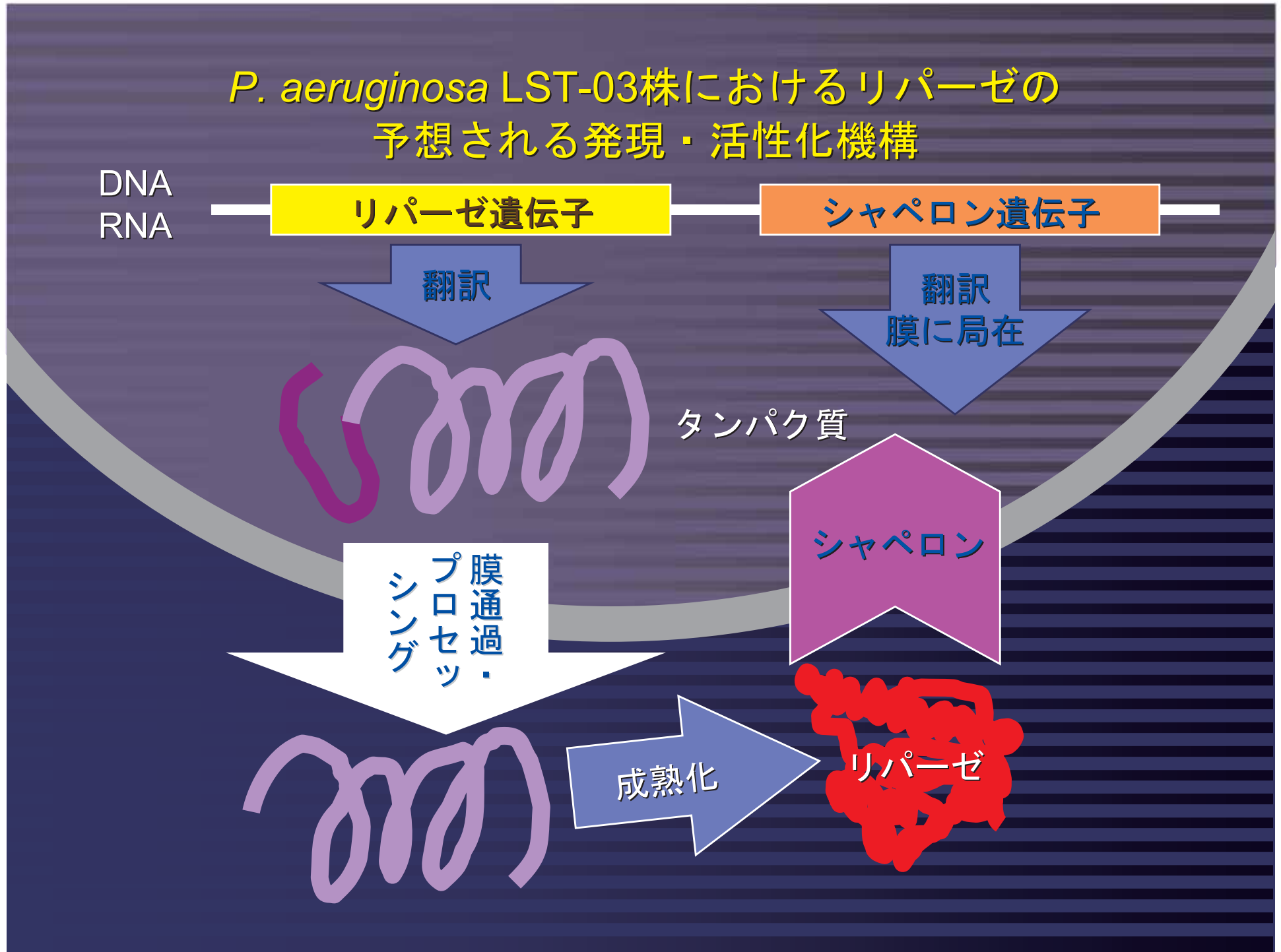
タンパク質

膜通過・  
プロセッ  
シング

シャペロン

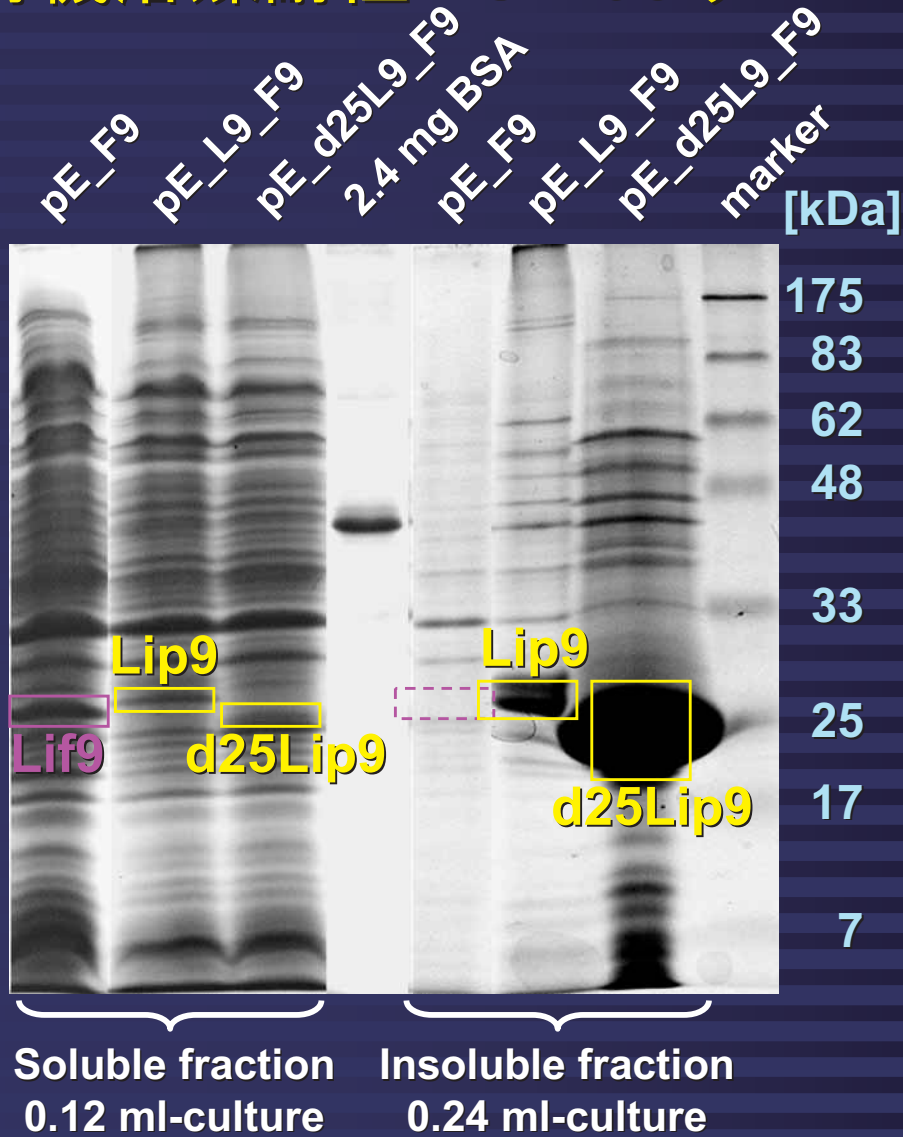
成熟化

リパーゼ





# 遺伝子組換えによる 有機溶媒耐性 LST-03リパーゼの高発現



有機溶媒耐性  
リパーゼの  
高生産に成功

# 遺伝子組換えによって高発現させた有機溶媒耐性 LST-03リパーゼの分子シャペロンを用いた活性化

1. 組換え大腸菌の培養と破碎
2. 不溶化された封入体の回収
3. 尿素を用いた封入体の可溶化
4. 希釈あるいは透析による尿素の除去
5. 分子シャペロンによる活性化
6. カルシウムイオンの添加

高生産性・高純度・高活性の有機溶媒耐性リパーゼの生産に成功

# 有機溶媒耐性LST-03リパーゼの生産性の向上

---

Expression system	Raw [I.U./L]	Purified [I.U./L]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> system (purification from culture supernatant)	1,100	140
Recombinant using <i>E. coli</i> system (Solubilization of inclusion body, and activation with foldase and Ca <sup>2+</sup> )	0	178,000

---

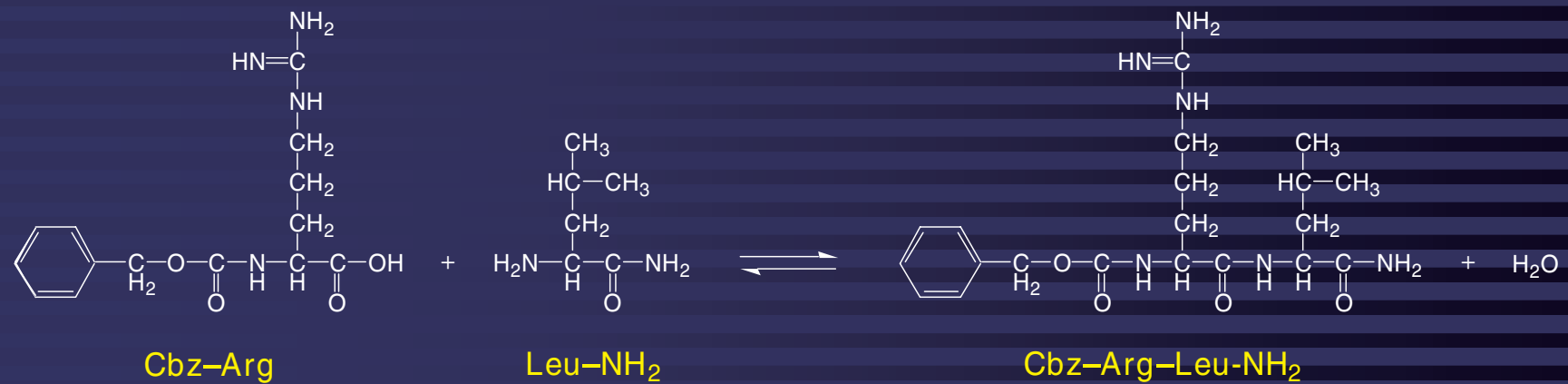
高比活性リパーゼの調製方法 特許出願：2007-339381（2007年12月28日）

# 種々のプロテアーゼの 有機溶媒存在下での安定性

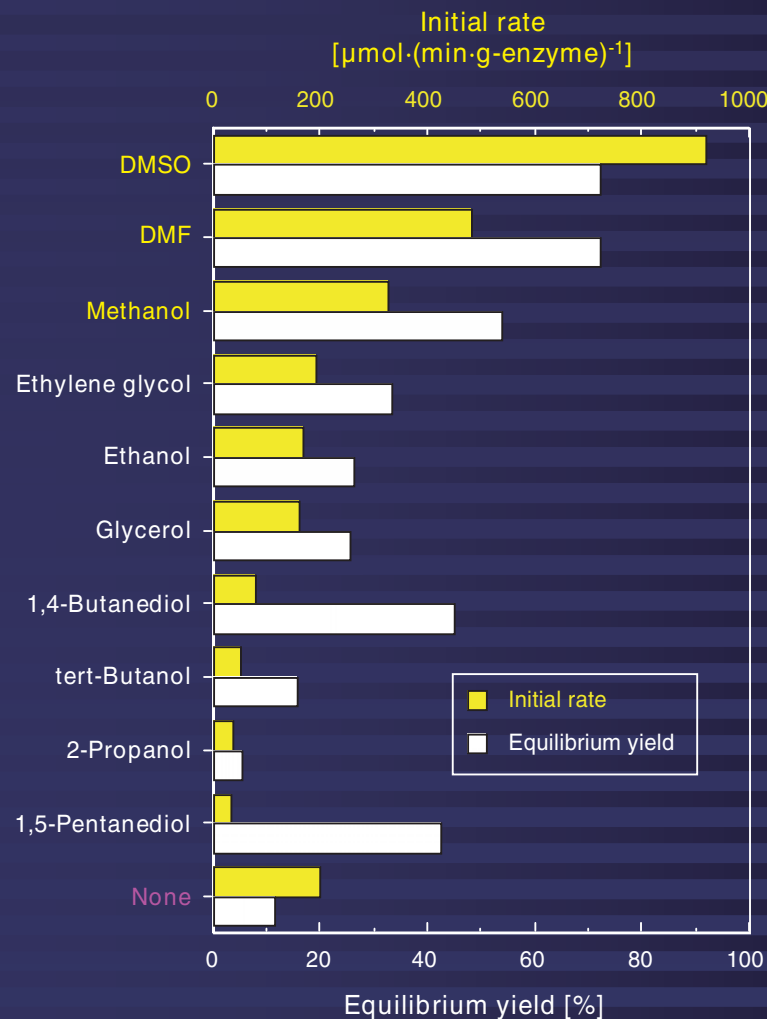
Organic solvent	Half-life [d]			
	PST-01 protease	Subtilisin	Thermolysin	$\alpha$ -Chymotrypsin
Ethyleneglycol	> 100	14.3	> 50	6.9
1,4-Butanediol	> 100	25.0	4.4	0.7
1,5-Pentanediol	> 100	> 50	1.7	0.4
Ethanol	> 100	> 50	3.0	27.0
1-Hexanol	> 50	13.7	18.2	14.2
Methanol	> 50	26.2	4.6	6.0
Dimethylsulfoxide (DMSO)	> 50	6.4	2.6	33.6
2-Propanol	> 50	47.6	1.2	0.6
Triethyleneglycol	> 50	39.7	5.1	11.1
<i>tert</i> -Butanol	> 50	41.6	0.8	0.5
1-Heptanol	> 50	8.6	13.1	3.8
<i>N,N</i> -Dimethylformamide (DMF)	25.3	39.8	0.9	2.2
1-Octanol	24.2	n. t.	n. t.	n. t.
1-Butanol	24.2	47.6	0.9	0.3
Acetone	23.1	24.8	0.7	0.6
1-Decanol	19.4	n. t.	n. t.	n. t.
1,4-Dioxane	17.7	29.3	0.8	0.5
Toluene	12.0	5.7	22.5	> 100
Benzene	7.8	n. t.	n. t.	n. t.
<i>n</i> -Heptane	4.8	n. t.	n. t.	n. t.
<i>p</i> -Xylene	4.4	n. t.	n. t.	n. t.
<i>n</i> -Hexane	3.8	n. t.	n. t.	n. t.
<i>n</i> -Decane	2.4	n. t.	n. t.	n. t.
Cyclohexane	2.3	n. t.	n. t.	n. t.
None	9.7	0.3	10.8	13.2

PST-01プロテアーゼは既存のプロテアーゼに比べ、有機溶媒耐性に優れている

# Cbz-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>の合成反応

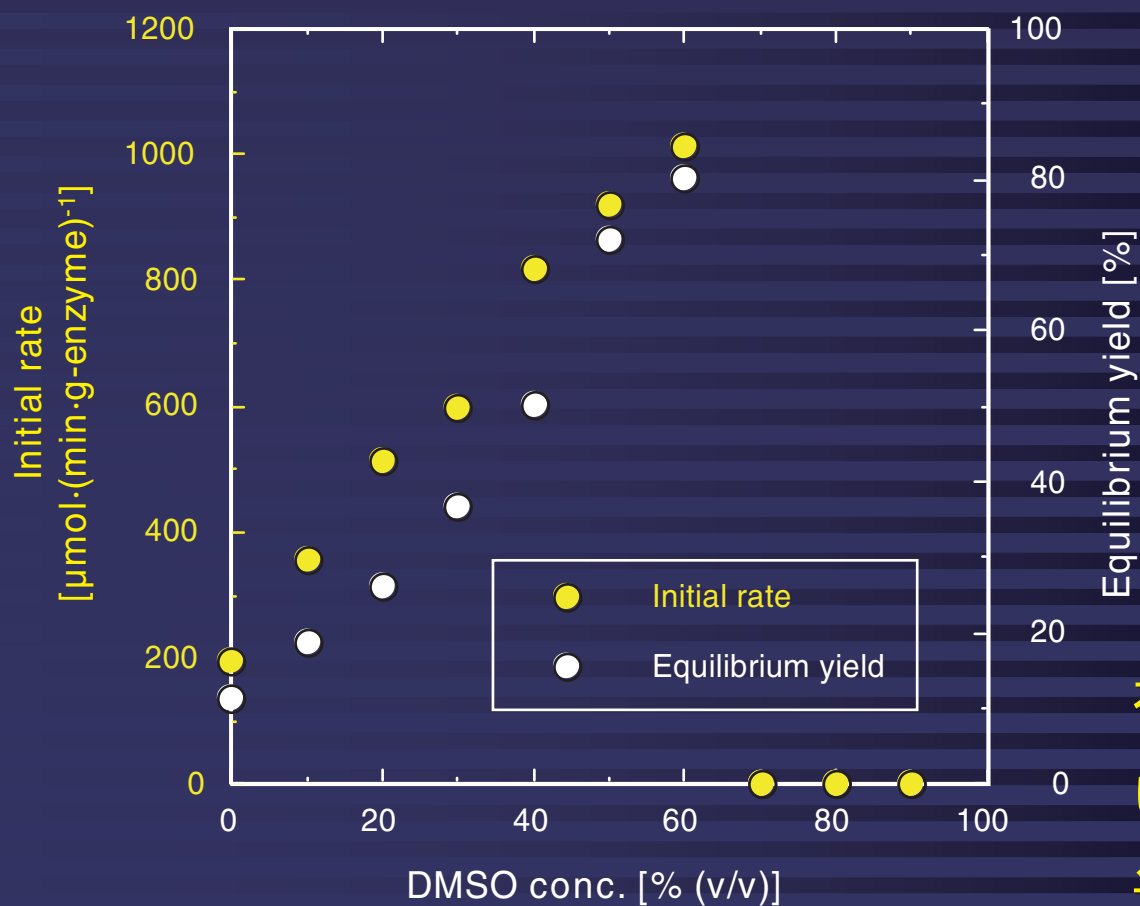


# PST-01プロテアーゼを用いた Cbz-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>の合成



有機溶媒存在下では  
収率が増加するだけ  
でなく、反応速度も  
高まる

# PST-01プロテアーゼを用いた Cbz-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>の合成



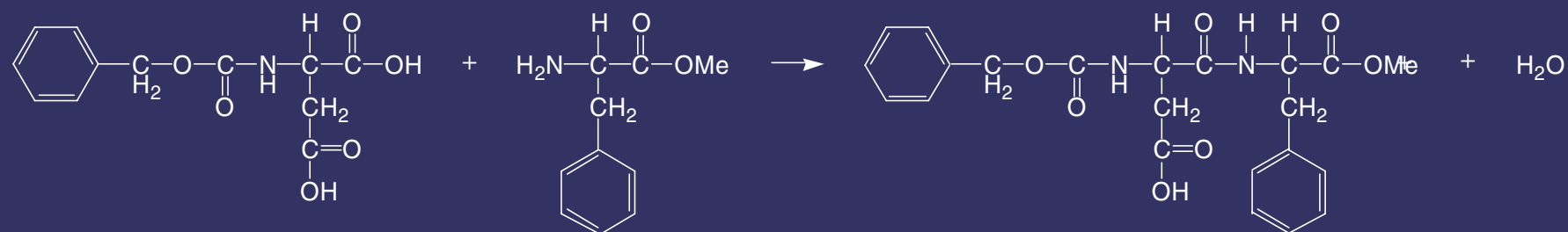
有機溶媒濃度が高いほど収率や反応速度が増加する

# タンパク質工学的的手法による 高活性を有する有機溶媒耐性酵素の開発

## 有機溶媒耐性アスパルテーム前駆体合成酵素

### アスパルテーム (Aspartame)

- 砂糖によく似た甘さの合成甘味料
- 甘味度は砂糖の約200倍（200分の1の低カロリー）
- 年間約1万5000トン製造されている
- サーマライシンを用いたペプチド合成可能



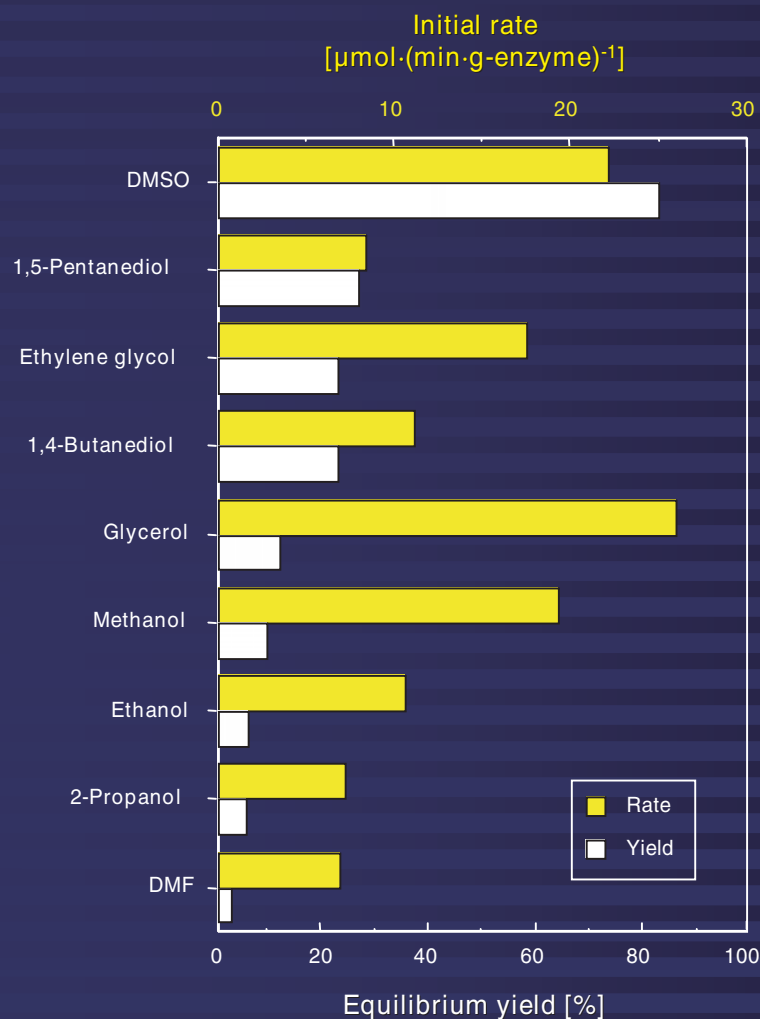
**Cbz-Asp**

**Phe-OMe**

**Cbz-Asp-Phe-OMe**

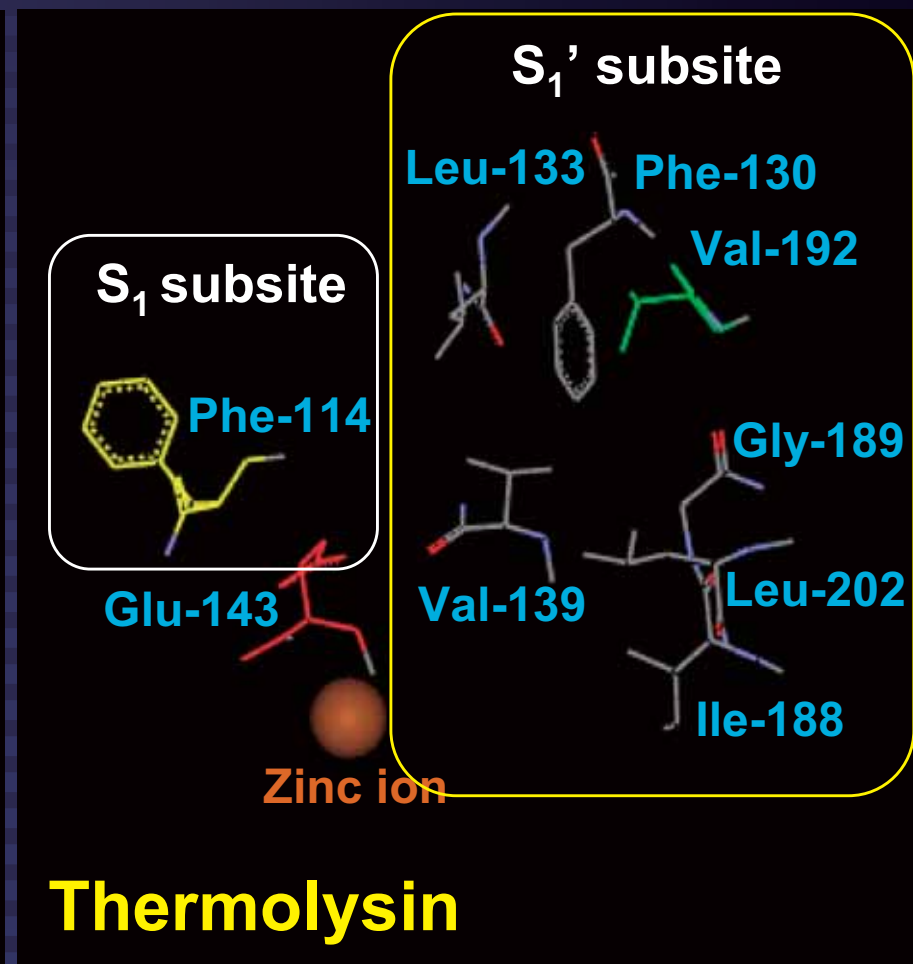
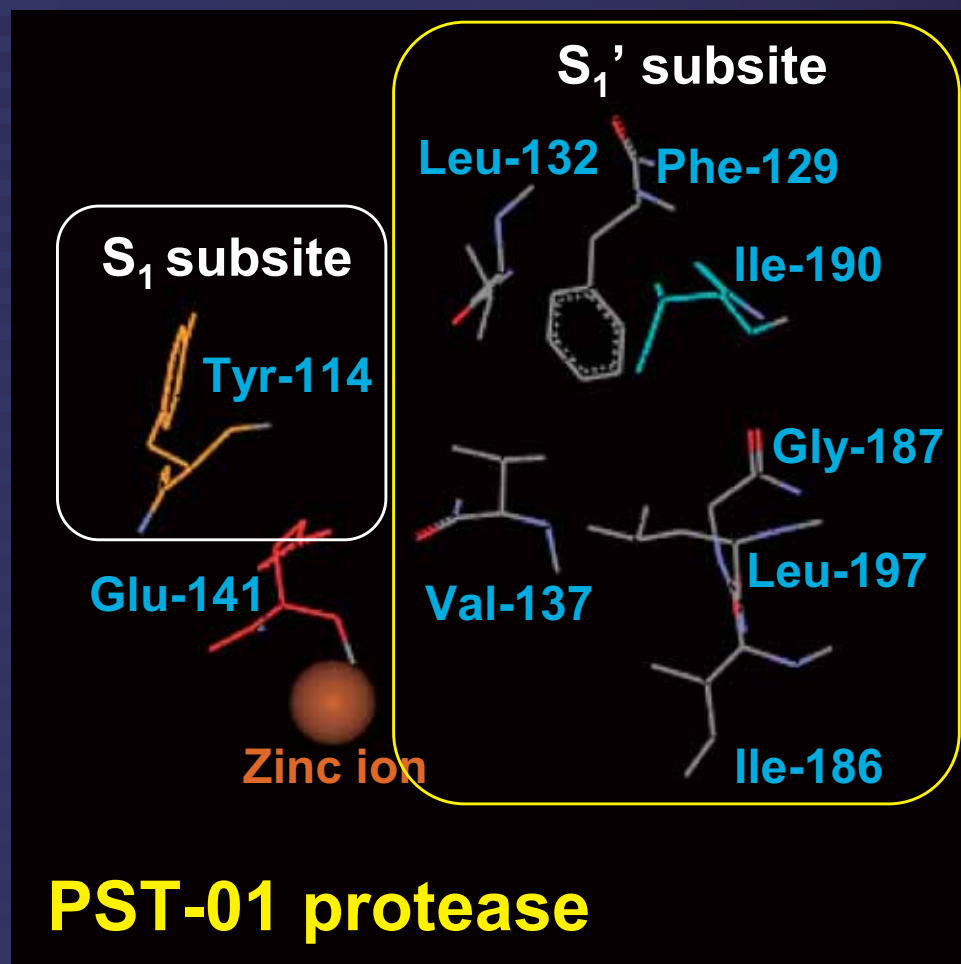


# PST-01プロテアーゼを用いたCbz-Asp-PheOMe（アスパルテーム前駆体）の合成

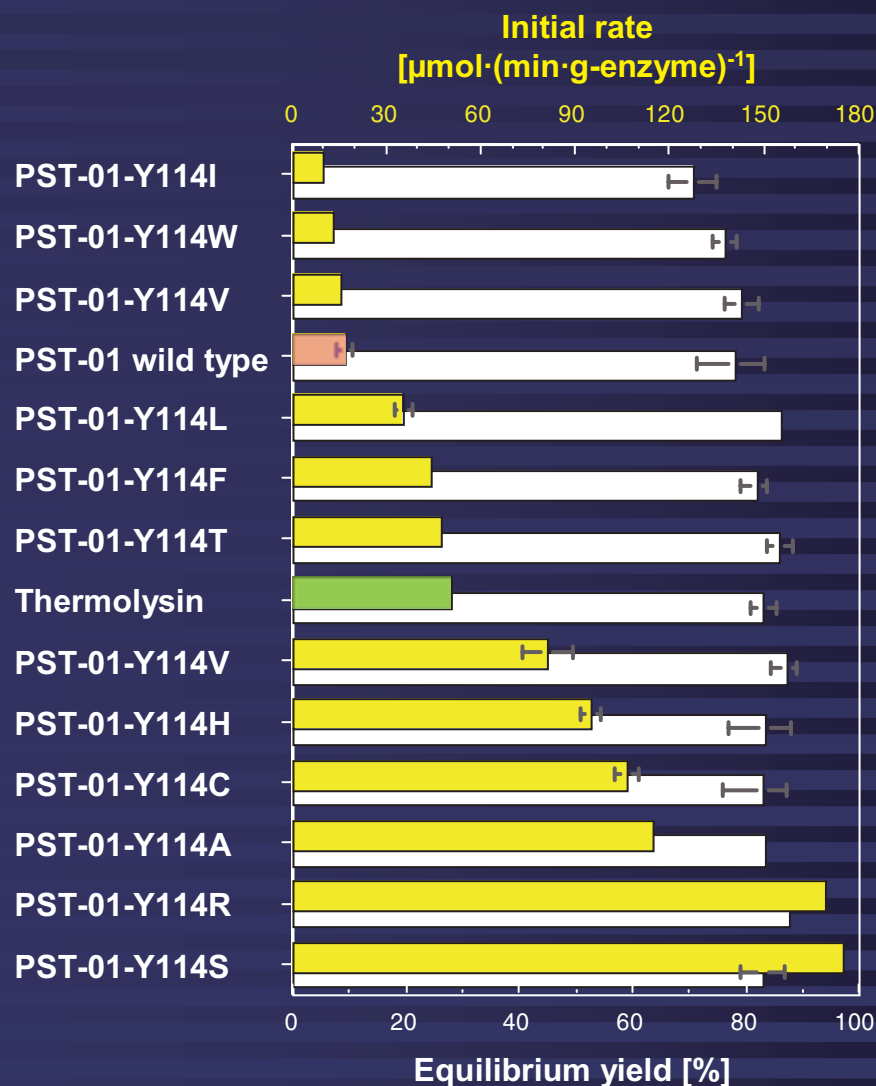


有機溶媒存在下で  
アスパルテーム前  
駆体の合成も可能

# PST-01プロテアーゼとサーモライシンの 活性中心の立体構造の比較



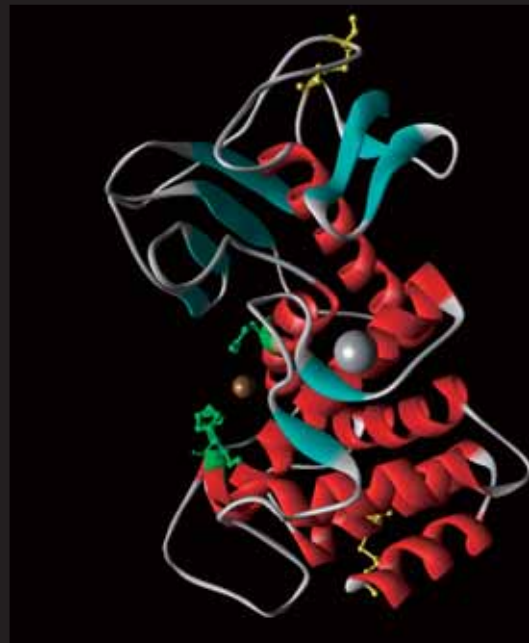
# 種々の変異PST-01プロテアーゼを用いたアスパルテーム前駆体の合成



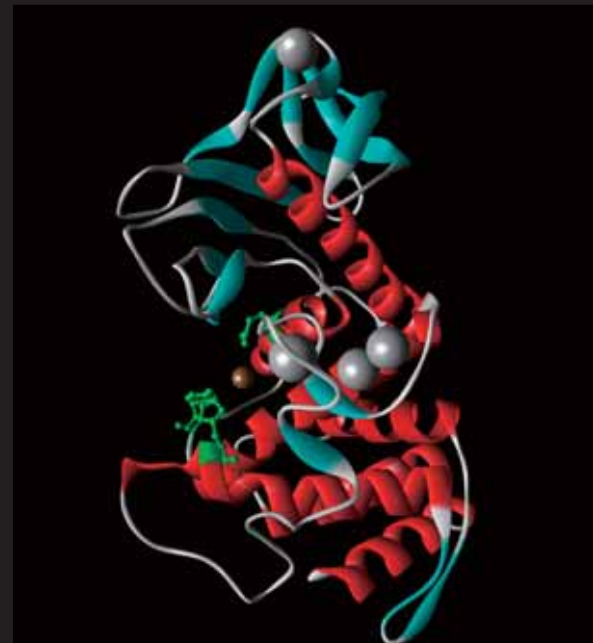
変異型プロテアーゼ及び該プロテアーゼを用いたペプチド合成  
特願2008-1741  
特願2008-217928

サーモライシンより高活性で、有機溶媒耐性に優れた酵素の作成に成功

# PST-01プロテアーゼとサーモライシンの 立体構造の比較



**PST-01 protease**

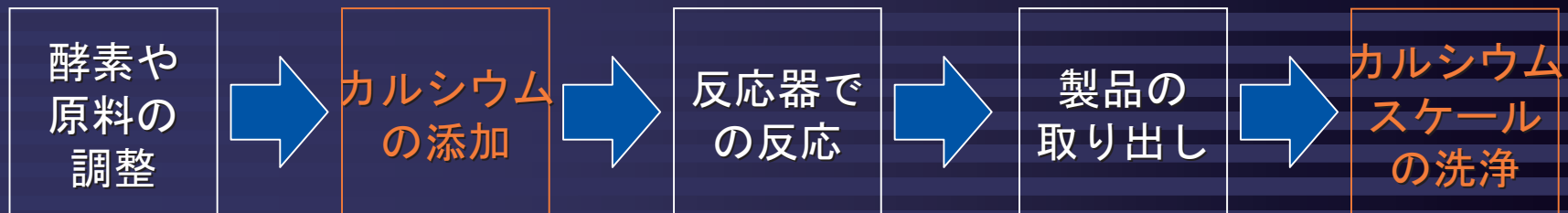


**Thermolysin**

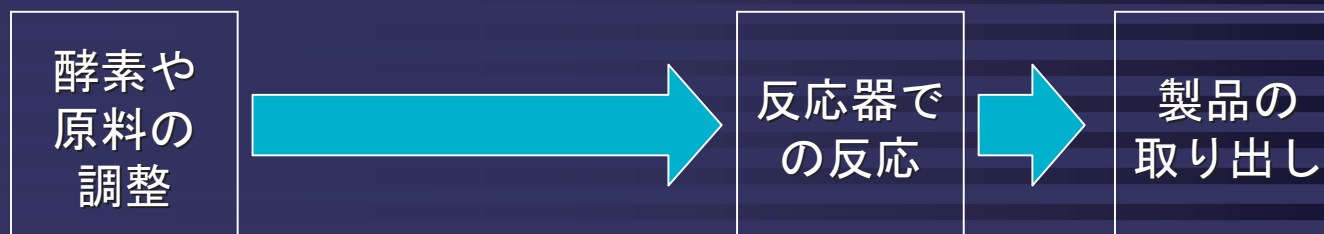
構造が非常に良く似ているが、カルシウムの配位に違いがある

# アスパルテーム前駆体 合成工程の比較

サーモライシンを用いた場合



PST-01プロテアーゼを用いた場合



変異型プロテアーゼ及び該プロテアーゼを用いたペプチド合成方法

特開2008-29270号 (2008年2月14日)

特願2008-1741号 (2008年1月9日)

特願2008-217928号 (2008年8月27日)

# 非水系バイオプロセスで用いられる 有機溶媒耐性生体触媒の開発

- 新規有機溶媒耐性酵素・微生物の探索
- 有機溶媒存在下での生体触媒の利用技術
- 酵素の有機溶媒安定性の解明
  - タンパク質工学的手法や分子進化工学的手法による改変
  - 有機溶媒存在下での酵素の構造変化
  - コンピュータシミュレーションによる安定な構造の探索
- 既存の酵素への有機溶媒耐性付与

# 非水系バイオプロセスで 用いることが期待される例

<有機溶媒耐性プロテアーゼ・リパーゼ編>

- 合成甘味料の合成
- ポリアミノ酸の合成
- 高付加価値食品用油の合成
- バイオディーゼルの合成
- エステル系香料の合成
- 医薬品の合成
- コンビナトリアル・ケミストリー用生体触媒

# お問い合わせ先

公立大学法人 大阪府立大学  
産学官連携機構リエゾンオフィス  
コーディネーター 稲池稔弘

- TEL 072-254-9872
- FAX 072-254-9874
- E-mail [inaiket@iao.osakafu-u.ac.jp](mailto:inaiket@iao.osakafu-u.ac.jp)