

JST 広島大学 新技術説明会 4 (アグリ・バイオ分野)

シンプル酵素触媒による効率的な有用物質変換

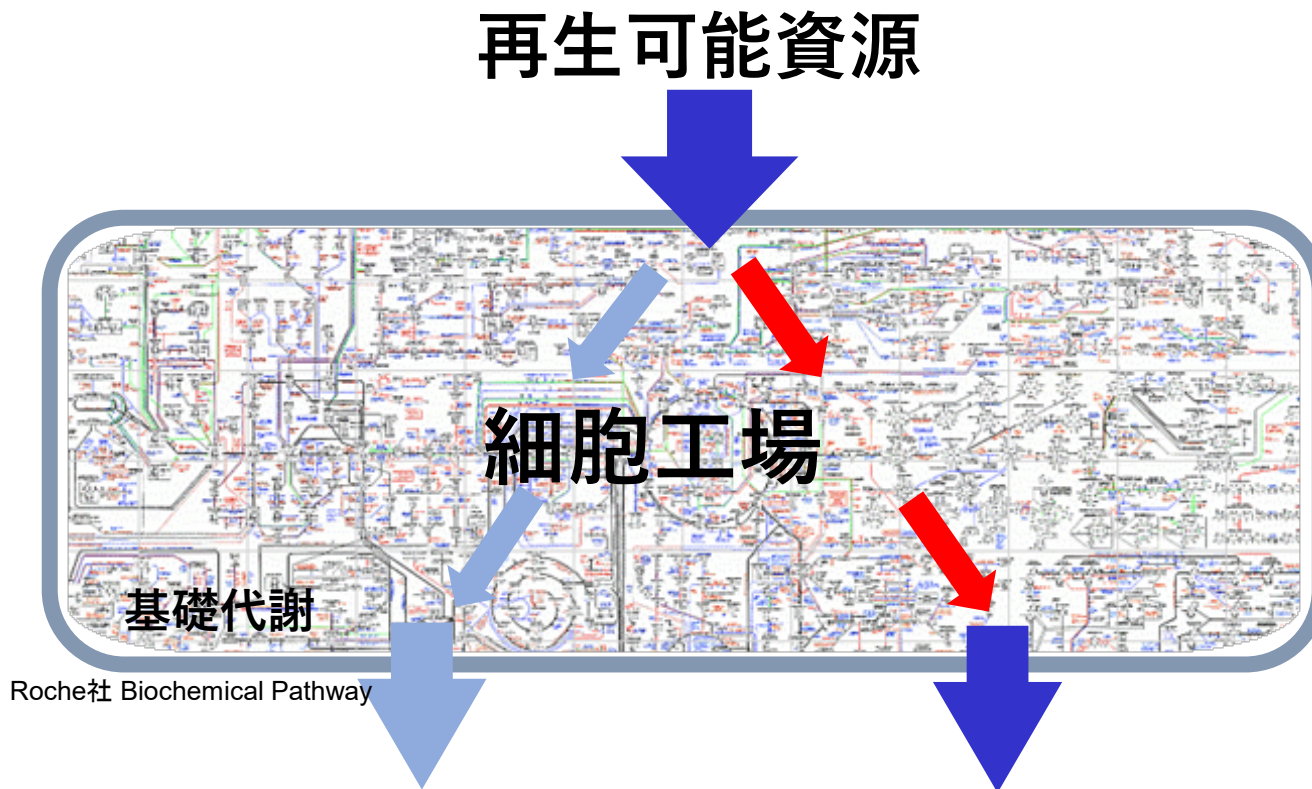


2021年10月5日

広島大学大学院 統合生命科学研究科
生物工学プログラム
准教授 田島 誉久

低温菌を利用したシンプル酵素触媒による物質変換

- ・ 本触媒のコンセプト
- ・ シンプル酵素触媒の基礎的実験
- ・ ポリマー素材等の生産系への適用
(3-HPA, 1,3-PD, アスパラギン酸, イタコン酸)



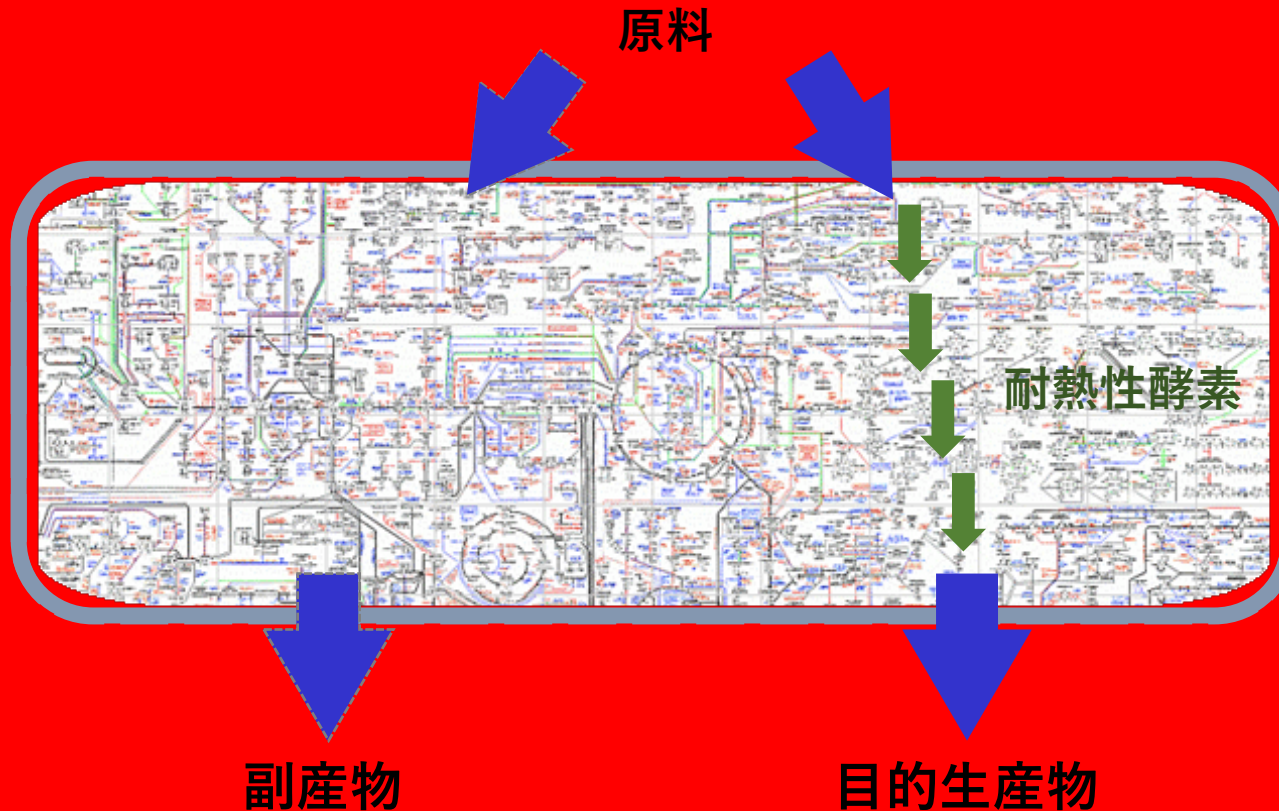
副産物

ポリマー素材などの有用物質

欠点

- 低収率
- 代謝工学による改変、時には困難なこともある
- 培養制御や細胞の取り扱いが複雑

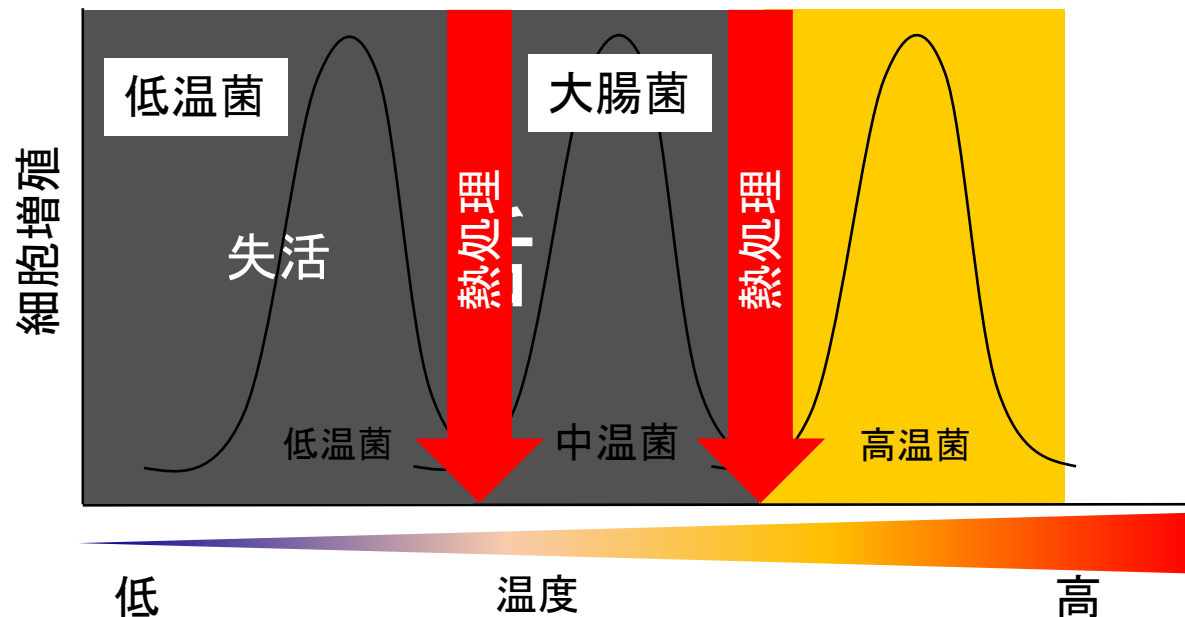
熱処理



利点

- 高収率、副産物を生じない
- 酵素を精製することなく、細胞をそのまま反応に利用できる
- 化学触媒のように扱いが簡単である
- 培養した細胞を熱処理するだけなので調製も容易である

Psychrophile-based Simple bioCatalyst

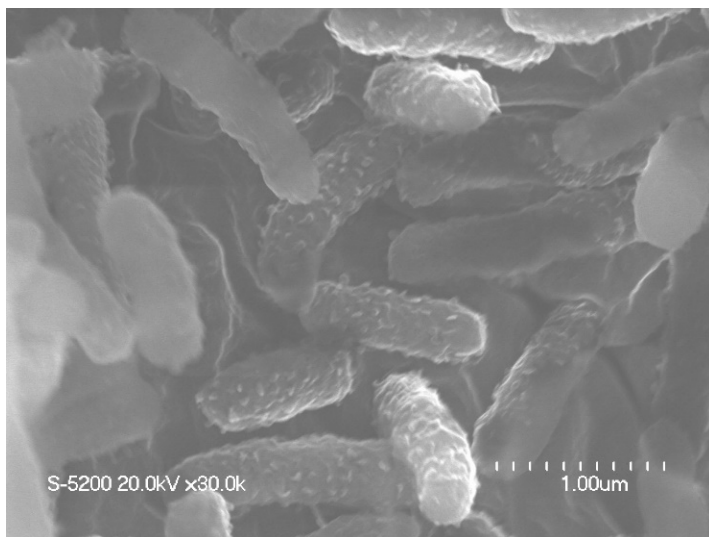


中温性酵素を利用可能とする触媒である。

	低温菌	中温菌	高温菌
菌株数	44	1,799	232
遺伝子数	148,253	4,451,614	457,902

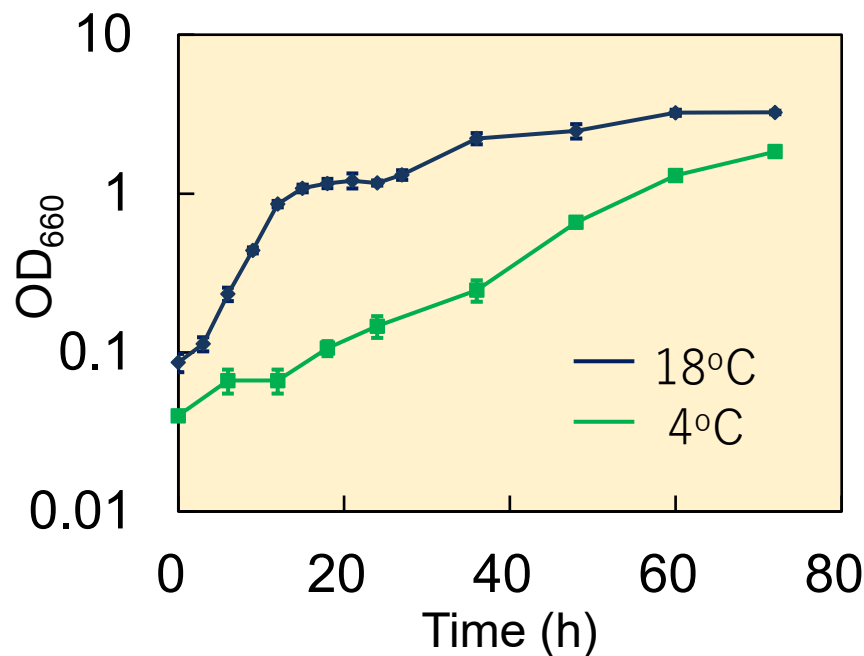
南極海水から単離された海洋微生物

至適生育温度：18°C
30°C以上で生育できない



Shewanella livingstonensis Ac10
(京都大学栗原達夫先生より分譲)

Shewanella frigidimarina DSM12253



Ac10株の増殖

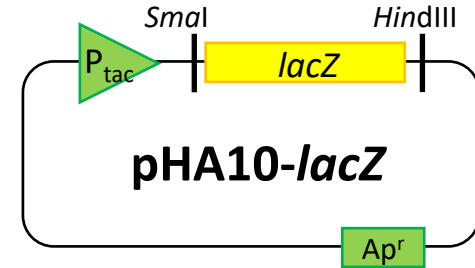


中温の熱処理でシンプル酵素触媒を構築できるのではないか。

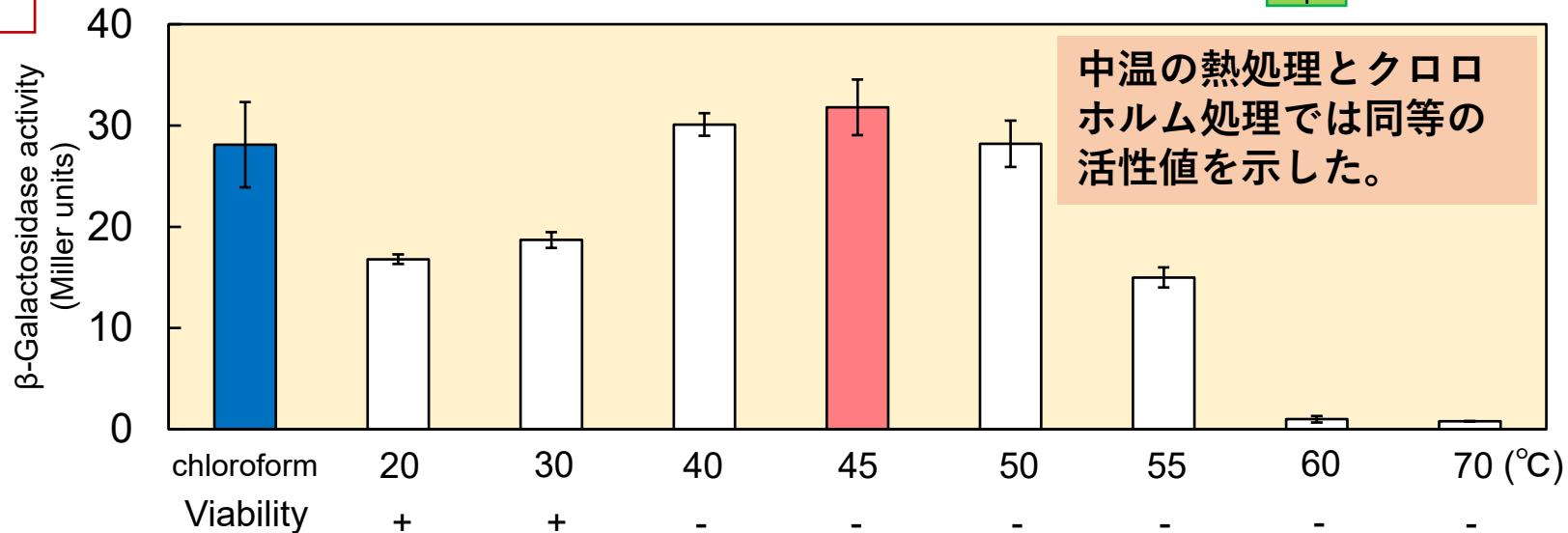
熱処理による基質透過性の検討

各温度（20–70°C）で10分間熱処理後、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

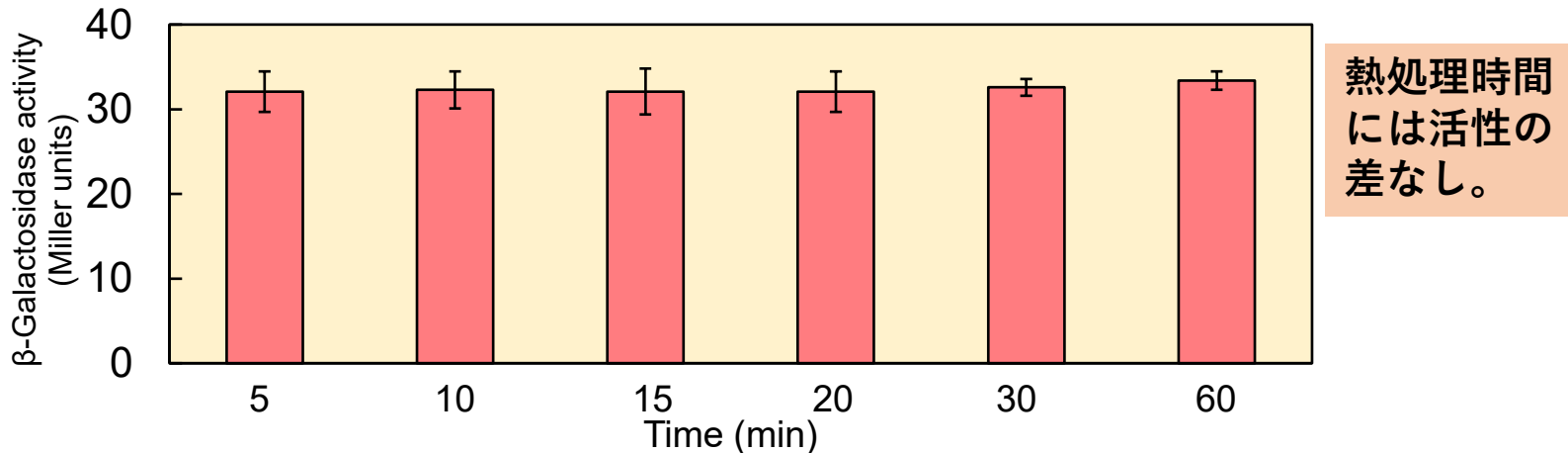
また、触媒を培地に接種して増殖の有無を確認した。



熱処理温度

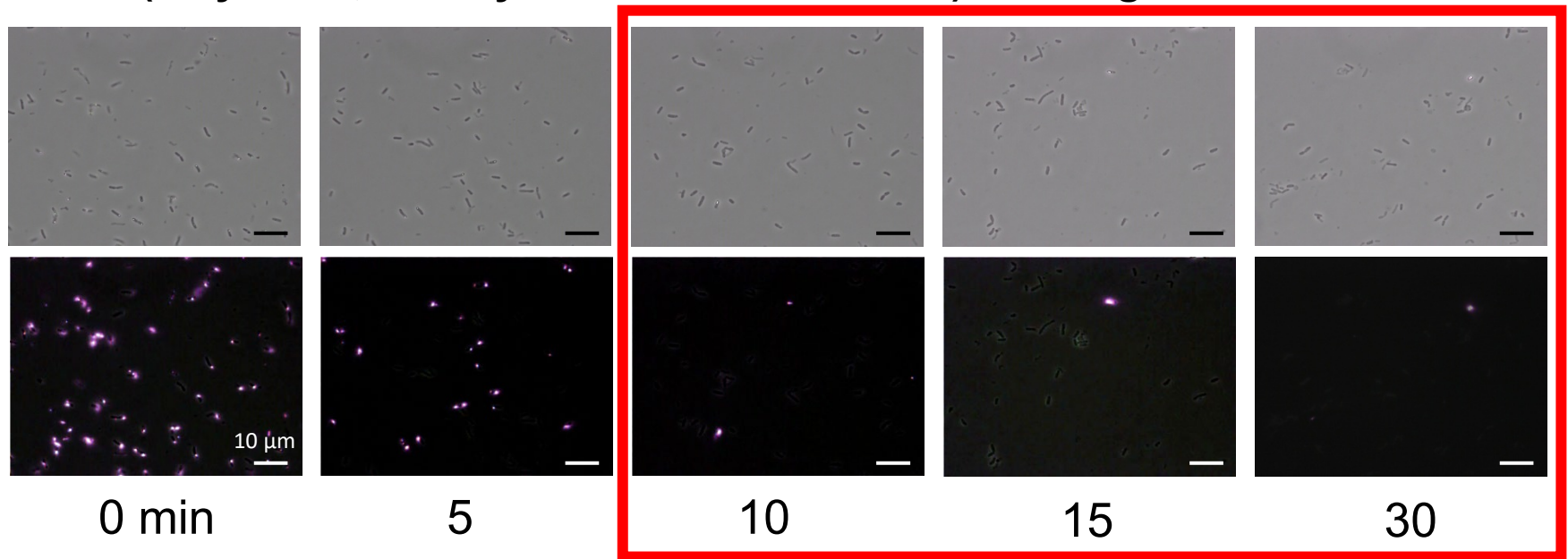


熱処理時間



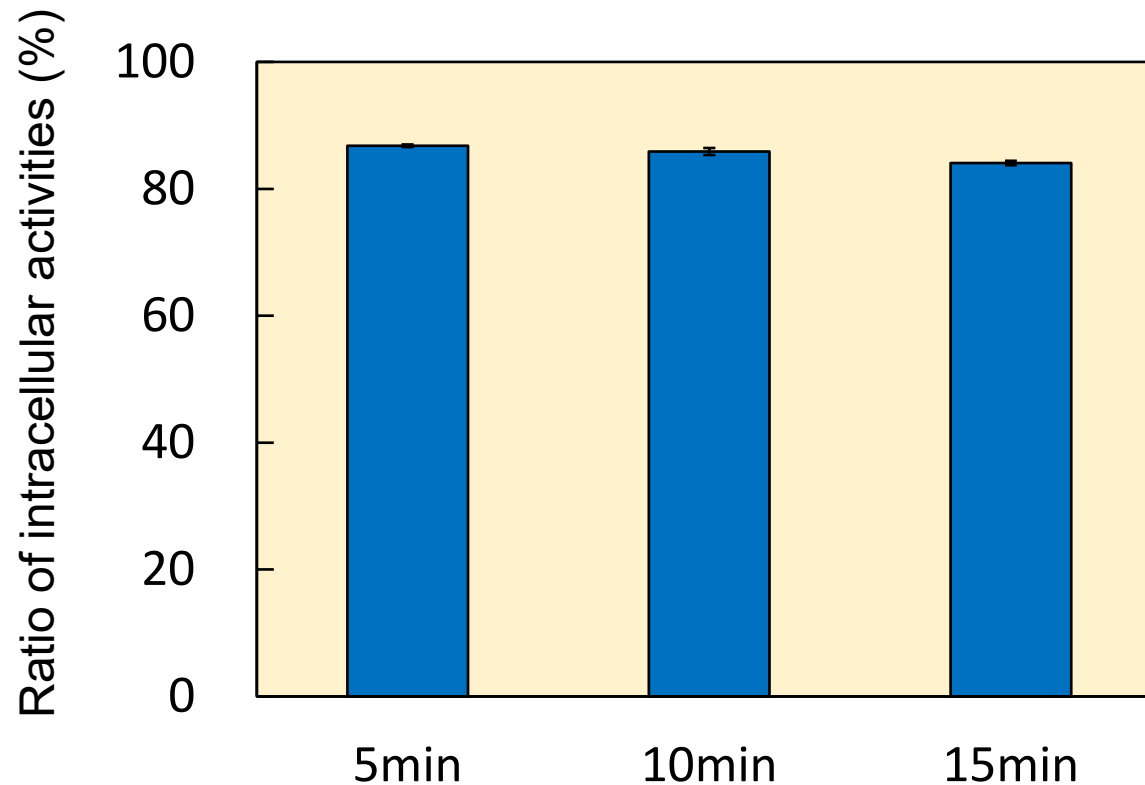
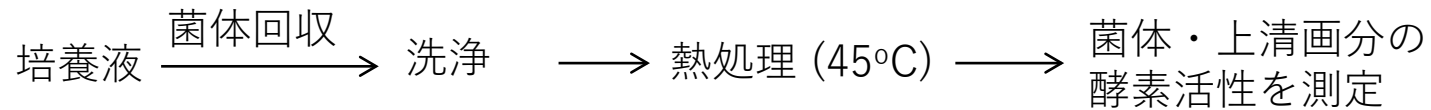
呼吸活性による還元活性の可視的評価

CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) staining



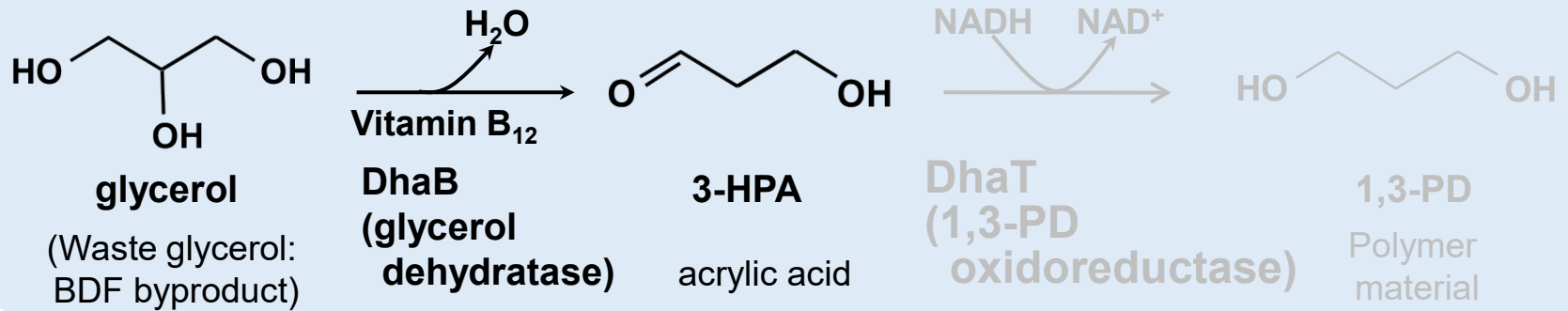
45°C、10分以上の熱処理により低温菌の呼吸活性が想定通りに失活していることが示された。

細胞画分の酵素活性による酵素漏出の評価評価

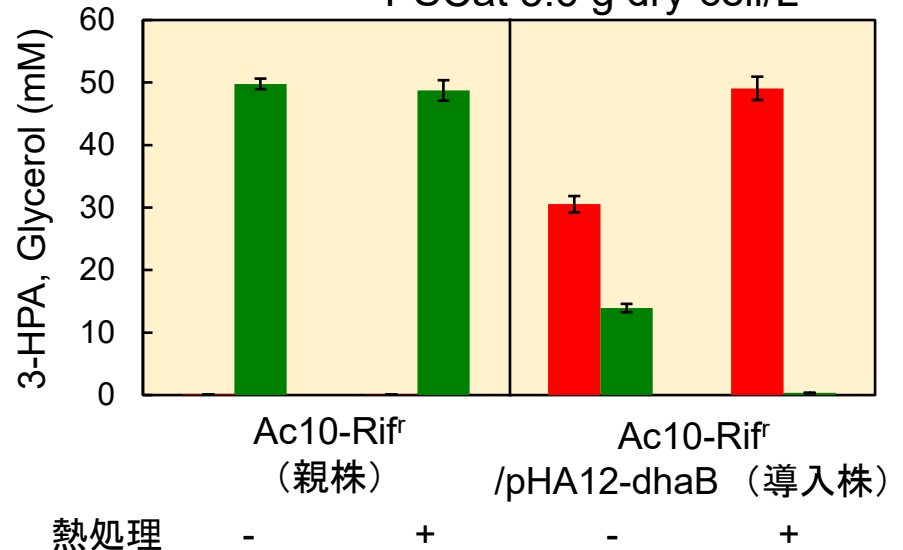
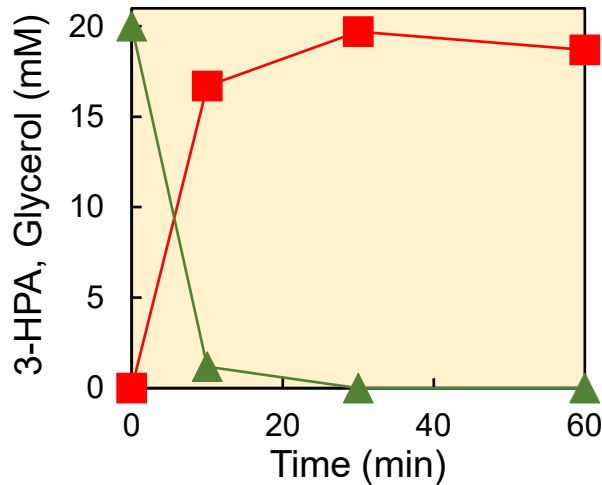


酵素活性の約86%は菌体内部に由来した。

3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(3-HPA) 生産

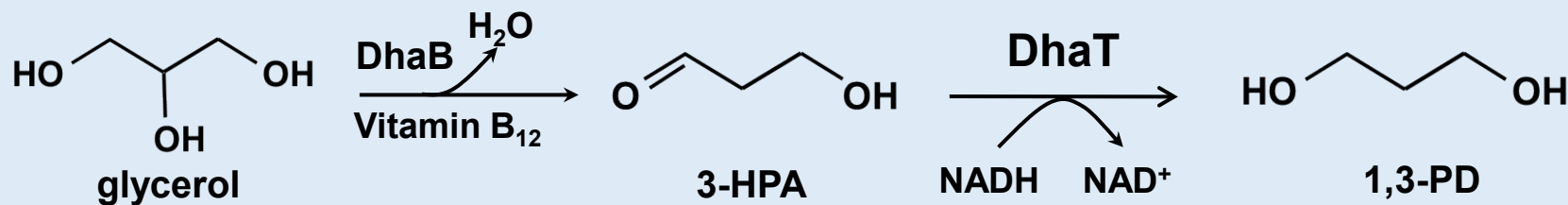


培養(30時間) (12時間後IPTG添加) $\xrightarrow{\text{細胞回収洗浄}}$ **熱処理 45°C, 15min** \longrightarrow 反応 (37°C):
 35 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)
 20, 50 mM グリセロール
 15 μ M Vitamin B₁₂
 PSCat 5.6 g dry-cell/L



3-HPAを収率100%、高生産性(8.85 mmol 3-HPA/g dry cell/h)で生成した。

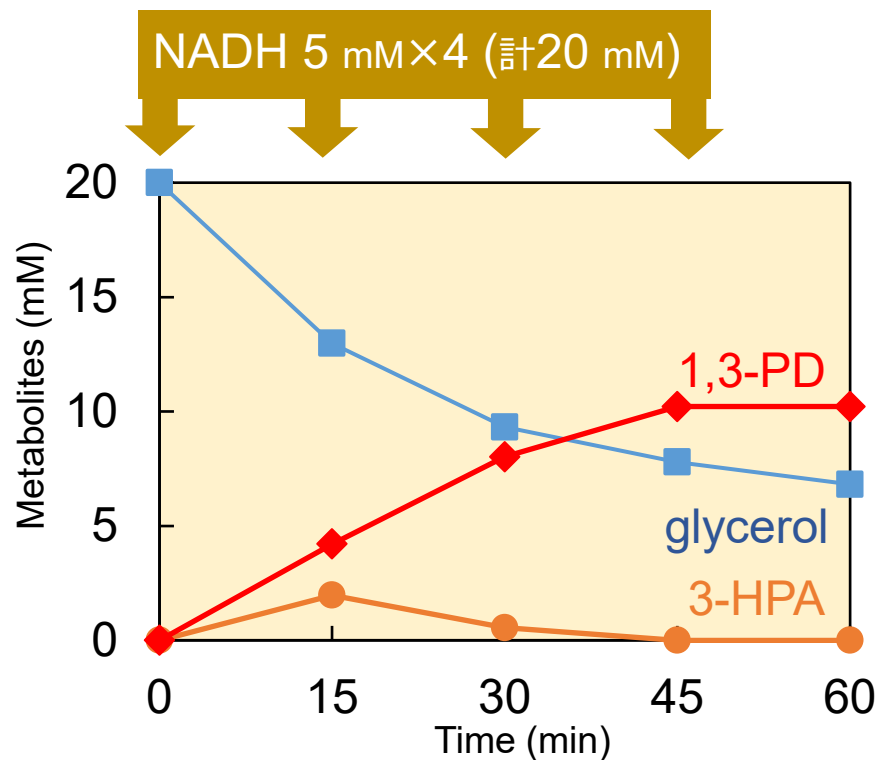
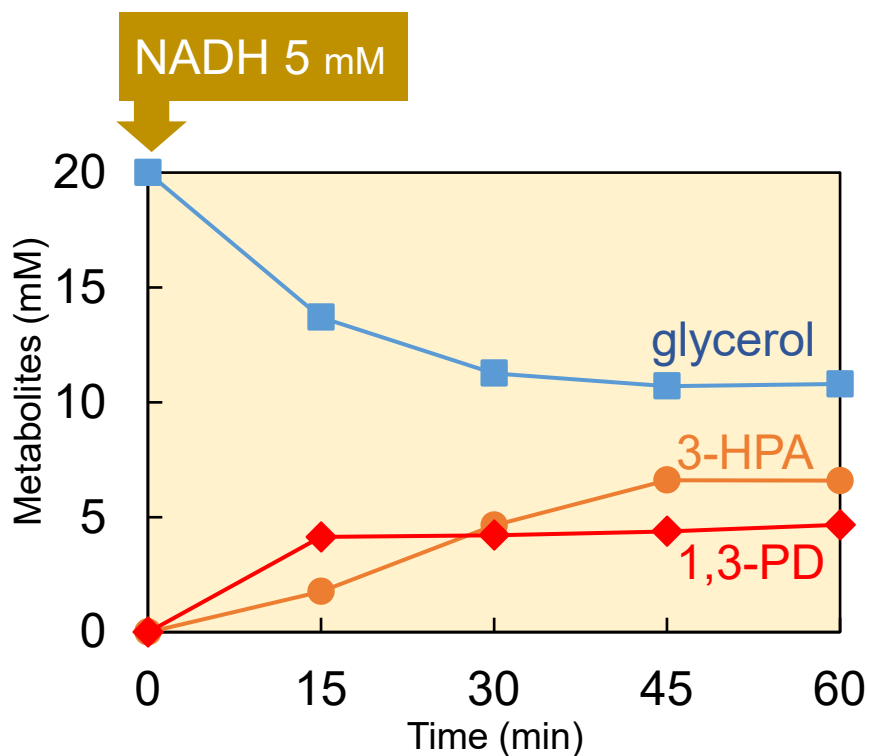
1,3-プロパンジオール生成:NADH添加により生成量向上

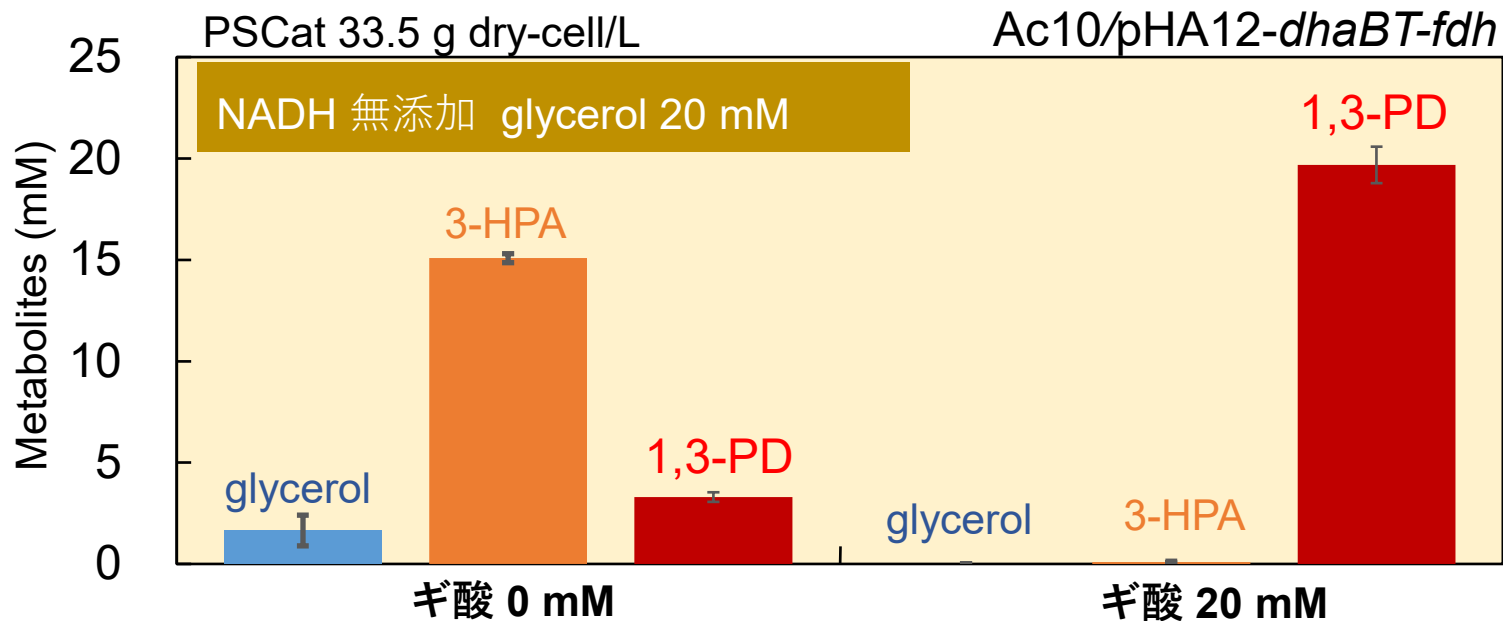
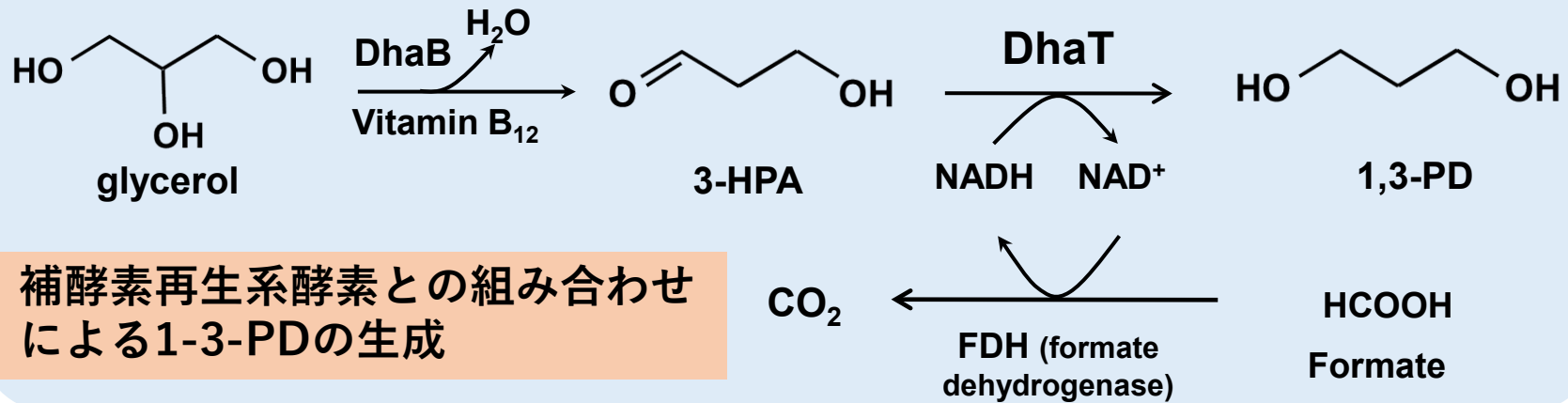


1,3-PD 生成反応

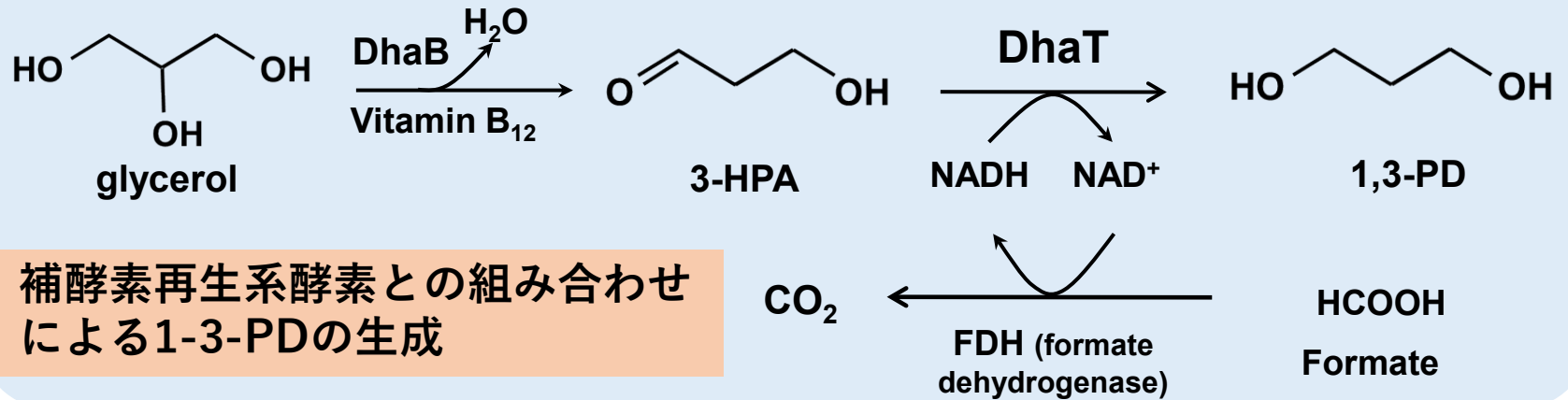
20 mM glycerol, 15 mM VitaminB₁₂, 5 mM NADH
PSCat 5.6 g dry-cell/L

複数酵素の発現による1-3-PDの生成

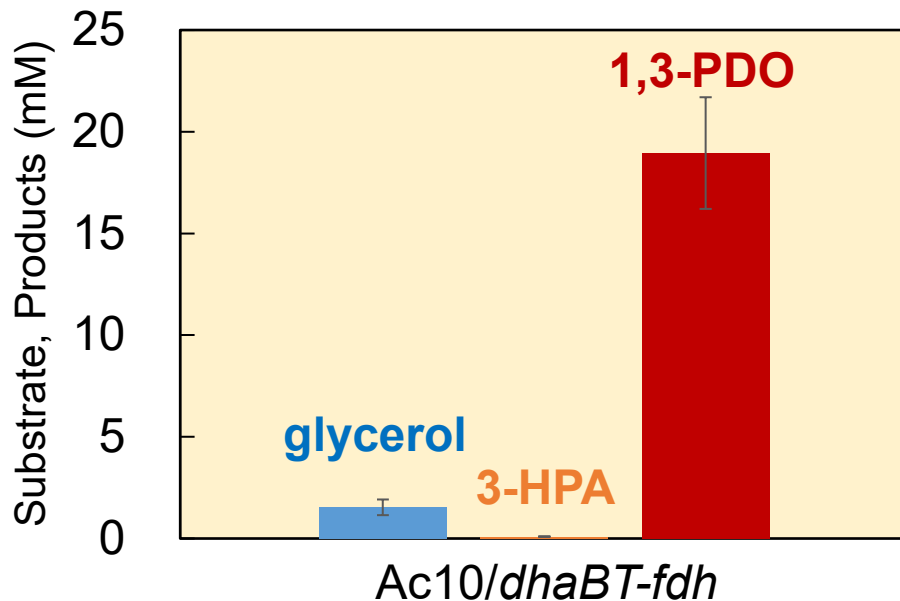




補酵素無添加で1,3-PDを収率98.5%で生成した。



廃グリセロールの変換



廃グリセロール* 20 mM,
ギ酸ナトリウム 20 mM,
NADH 0 mM,
PSCat 33.5 g dry-cell/L

*BDF アルカリプロセス廃グリセロール
(グリセロール20 mM, 成分:57.9% (w/w)
グリセロール, 30.2% メタノール, 12.5%
脂肪酸, 2.7% 灰分)

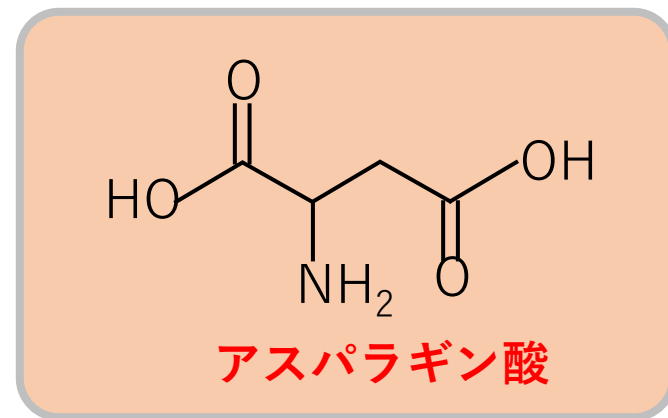
廃グリセロールから1,3-PDを
高収率 (95%) で生成した。



アスパルターゼ



NH₃

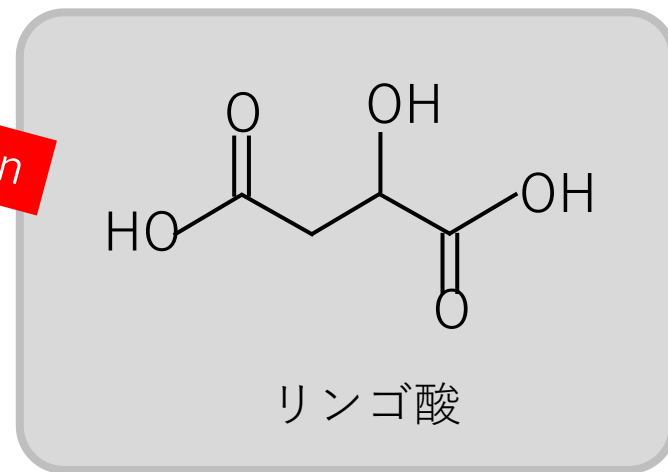


- ・ アスパルターゼの原料
- ・ C4 基幹化学品
(米国DOE選定の有用化学品に含まれる)

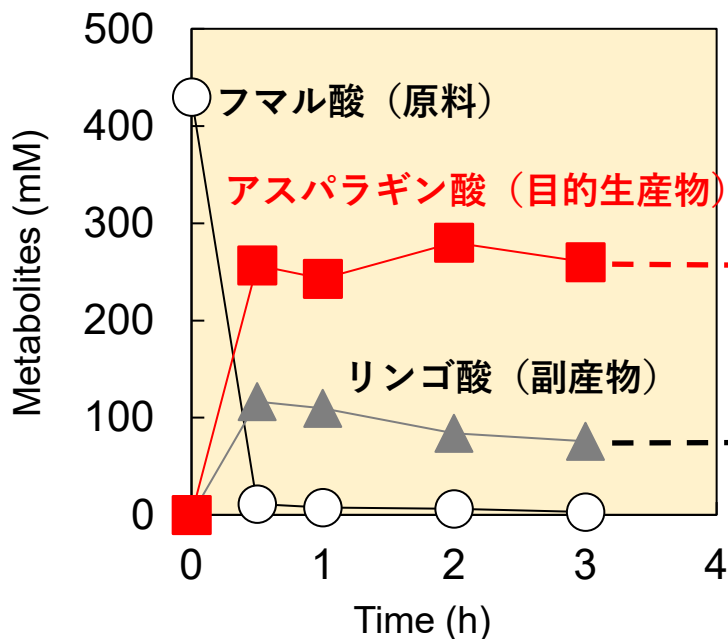
フマラーゼ



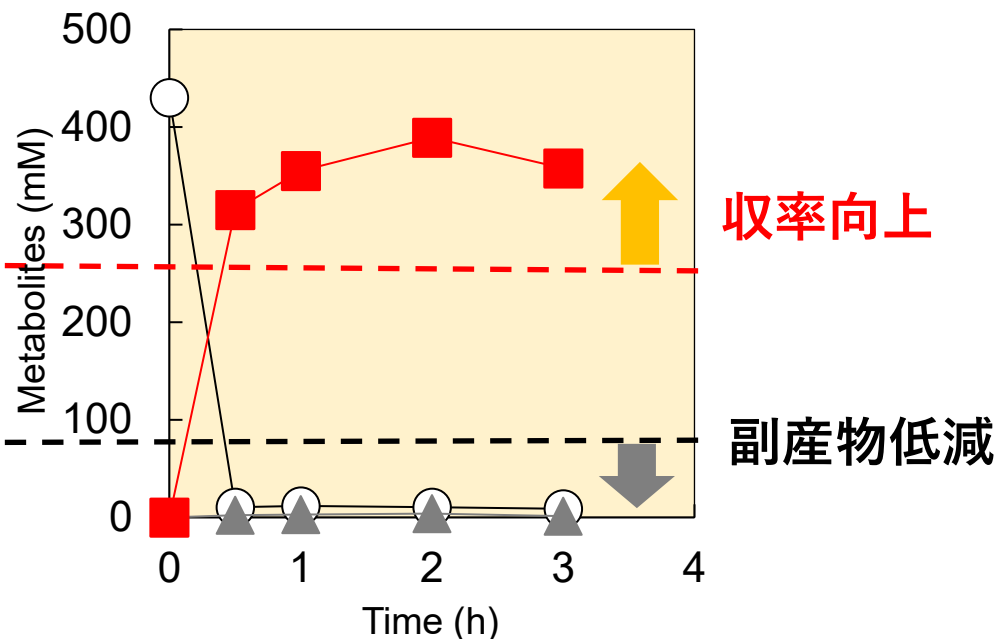
H₂O



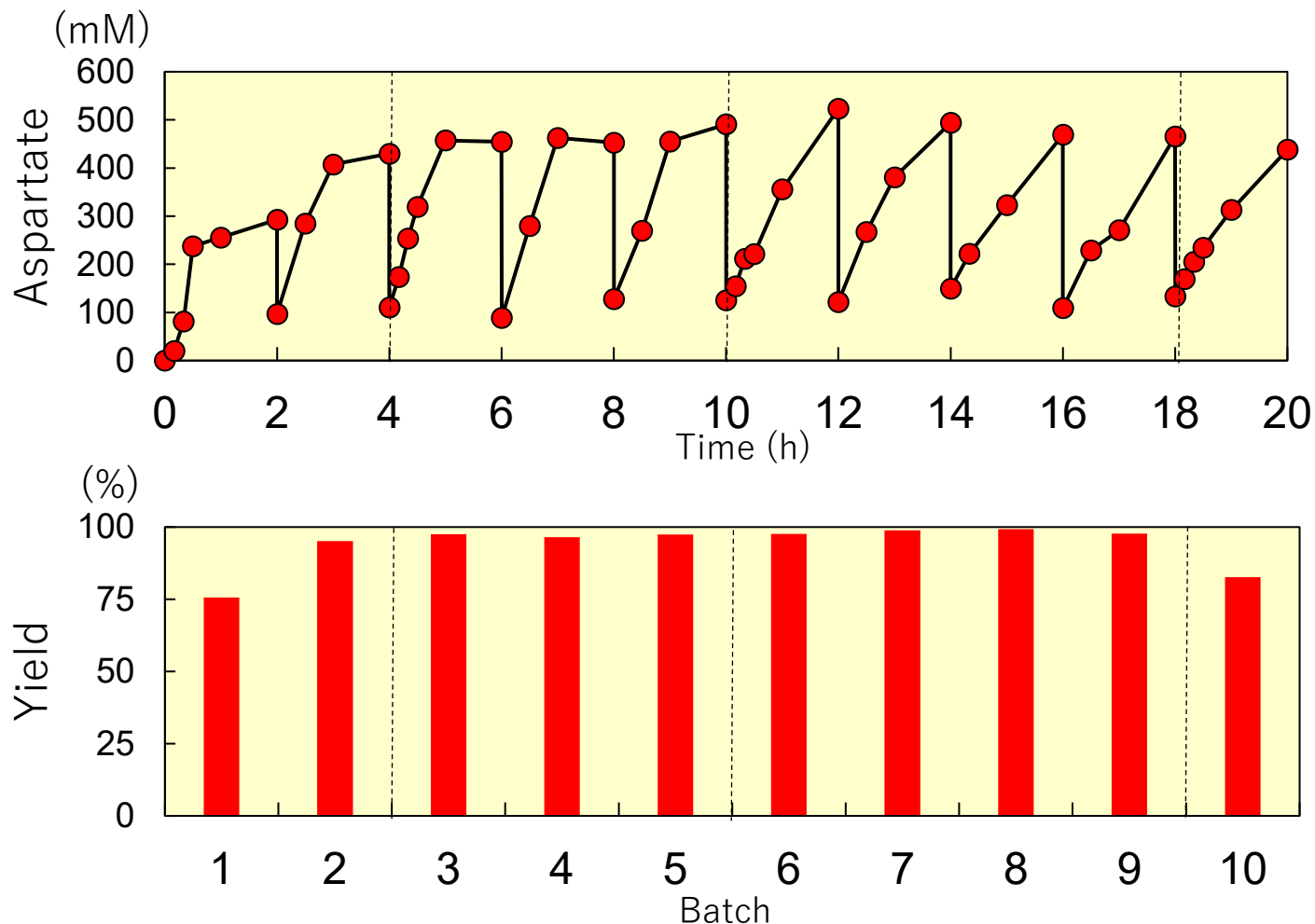
熱処理なし



熱処理 (50°C, 15 min)



宿主の代謝酵素による競合反応を抑制することで副産物生成が低下し、収率向上を実現した

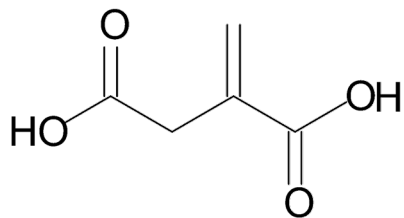


高収率な変換を繰り返し行うことが可能であった。

T. Tajima* et al., Efficient aspartic acid production by a psychrophile-based simple biocatalyst, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **42**(10), 1319-1324, (2015)

	反応回数	担体	収率	固定化しない場合との速度変化	Reference
精製酵素 <i>Bacillus sp.</i> AspB	5	Eupergit C	96.7 %	83.0 %	Fernandez <i>et al</i> , 2012
精製酵素 <i>E. coli</i> AspA	連続	ポリアクリ ルアミド	95 %	30.5 %	Tosa <i>et al</i> , 1973
高発現株 <i>E. coli</i> AspA	8	アルギン酸 ナトリウム	73 %	87.3 %	Chao <i>et al</i> , 2000
シンプル 酵素触媒 <i>E. coli</i> AspA	9	アルギン酸 ナトリウム	97.5 %	94.6 %	This Study

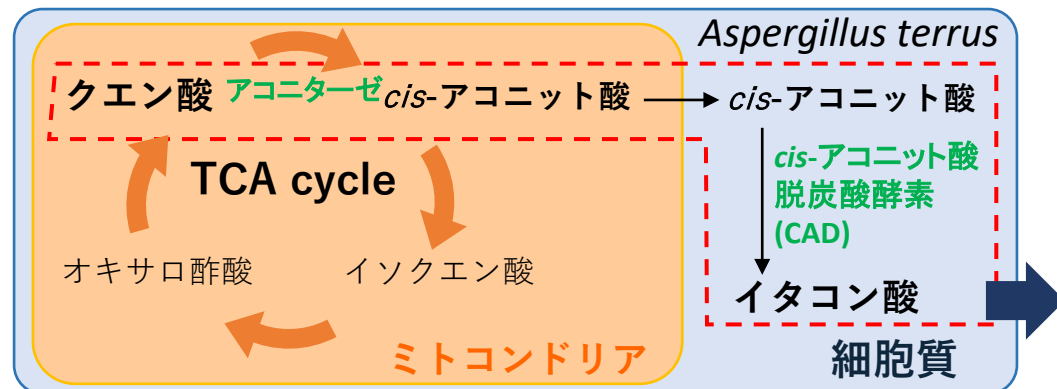
イタコン酸の効率的生産



イタコン酸

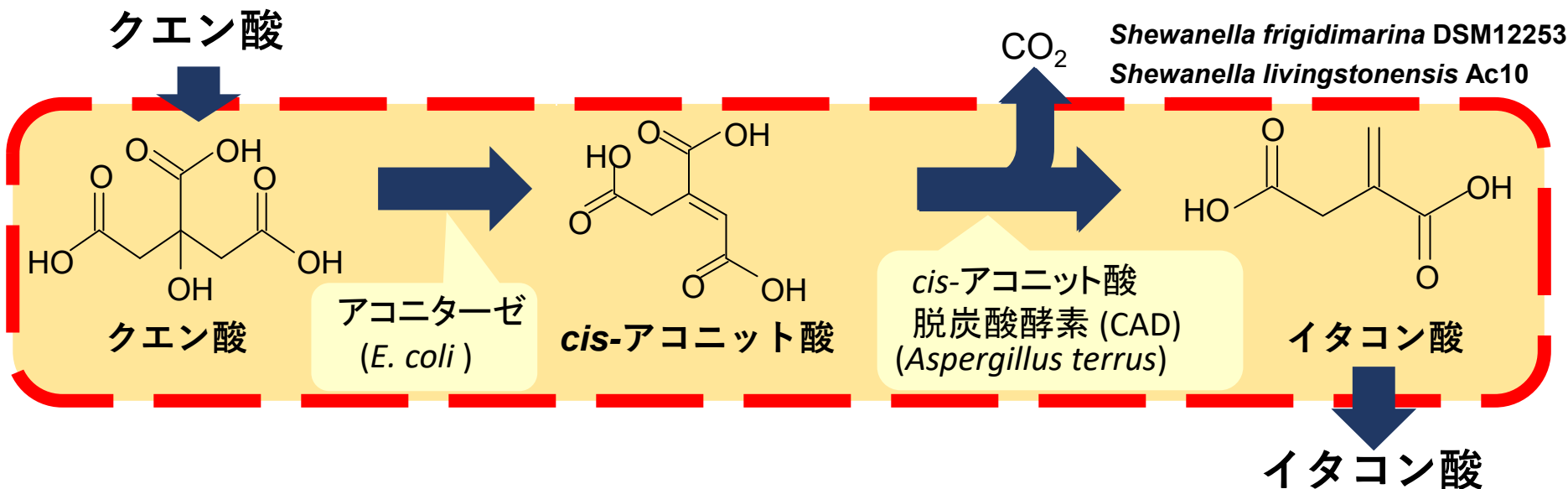
C5 基幹物質:

コンタクトレンズやニトリル製品などのポリマー素材として有用な化合物

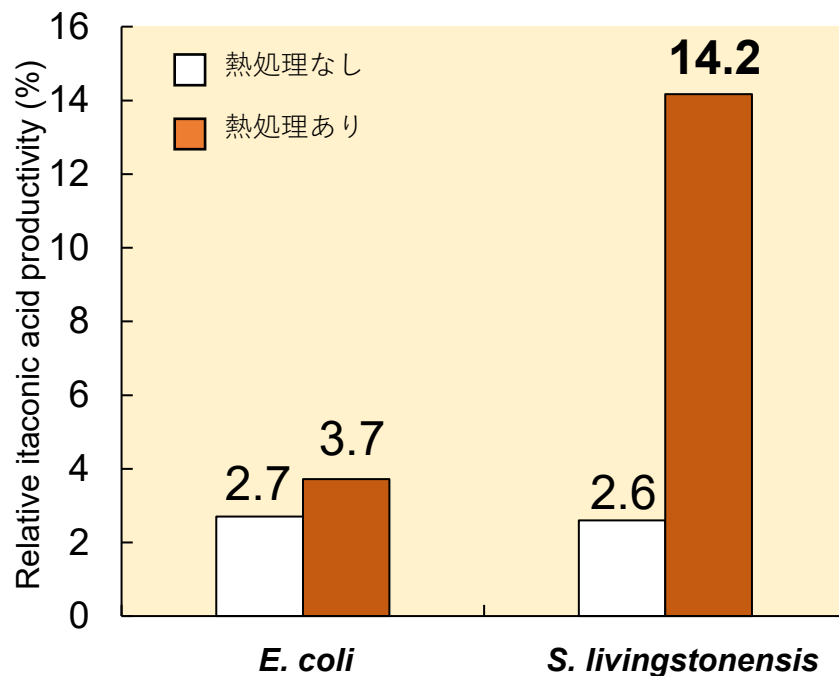
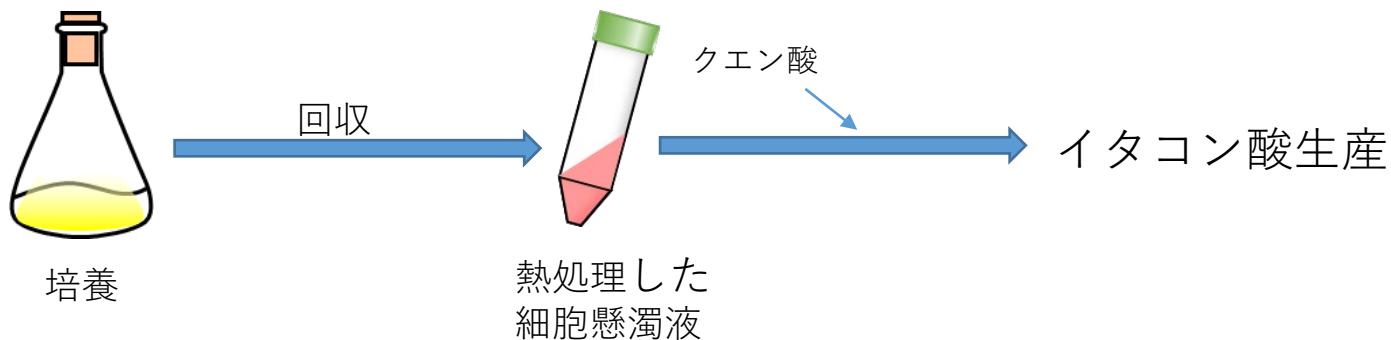


課題： 合成経路が代謝系と競合する
合成酵素が異なるオルガネラに分かれている
(反応場が分断)

シンプル酵素触媒による高効率生産



変換酵素を発現する同一プラスミドを導入した大腸菌と低温菌細胞を用い、熱処理による効果を比較した。



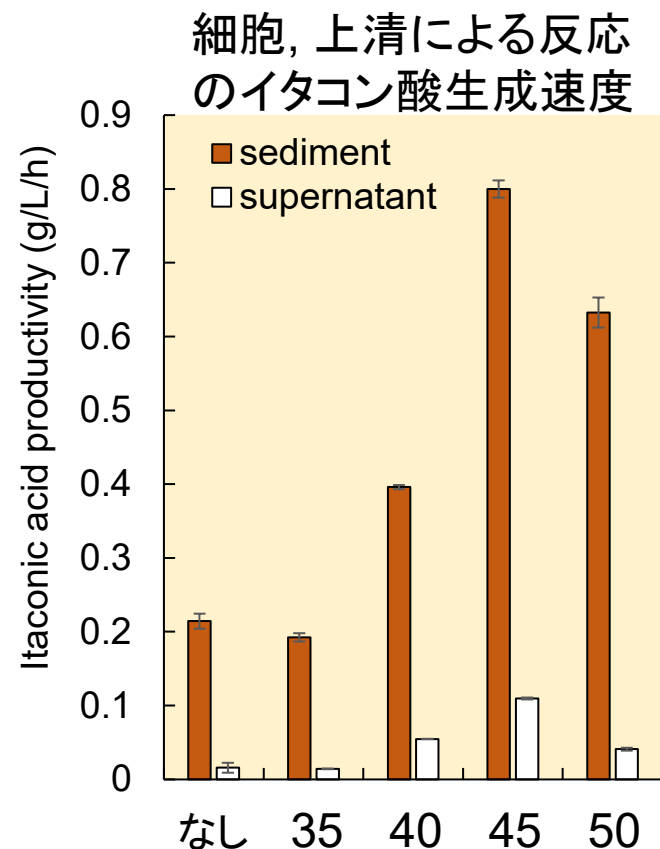
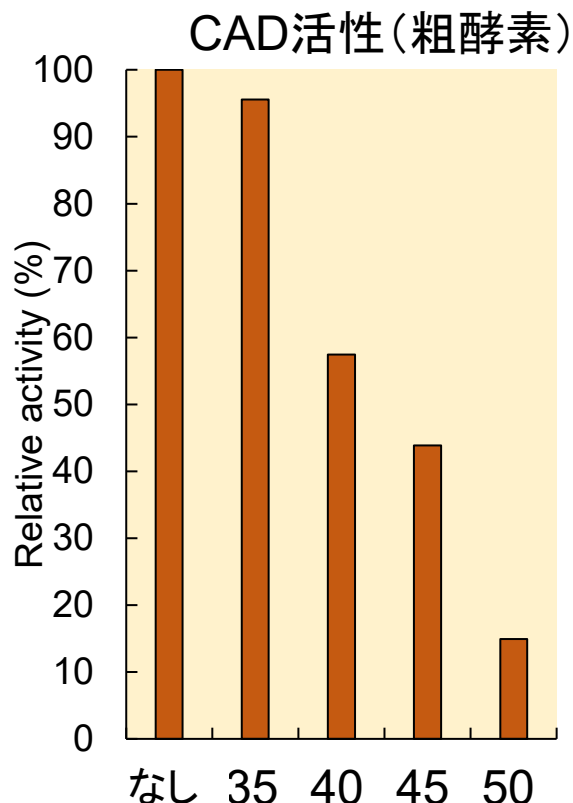
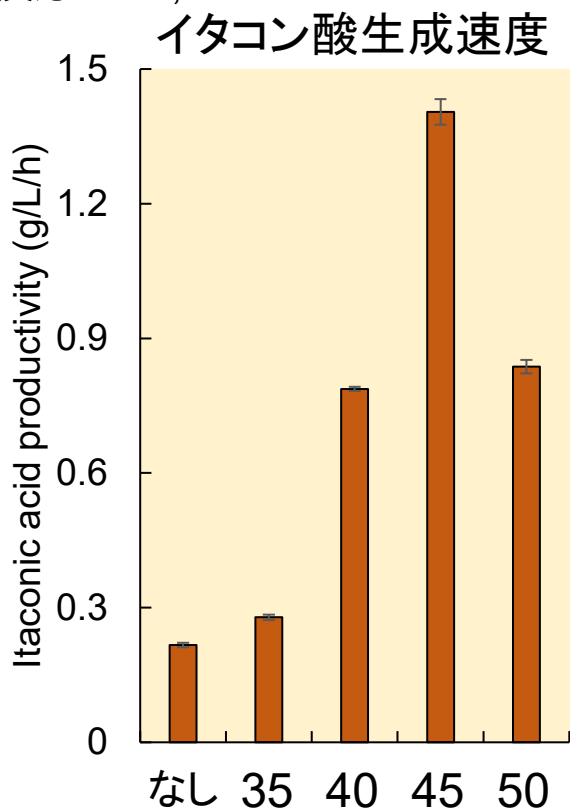
熱処理: 45°C, 15 min

反応: 28°C, 1 h

低温性 *Shewanella* 属細菌を宿主とした触媒では **中温の熱処理** により膜透過性を向上させることができる。

熱処理: 35-45°C, 15 min

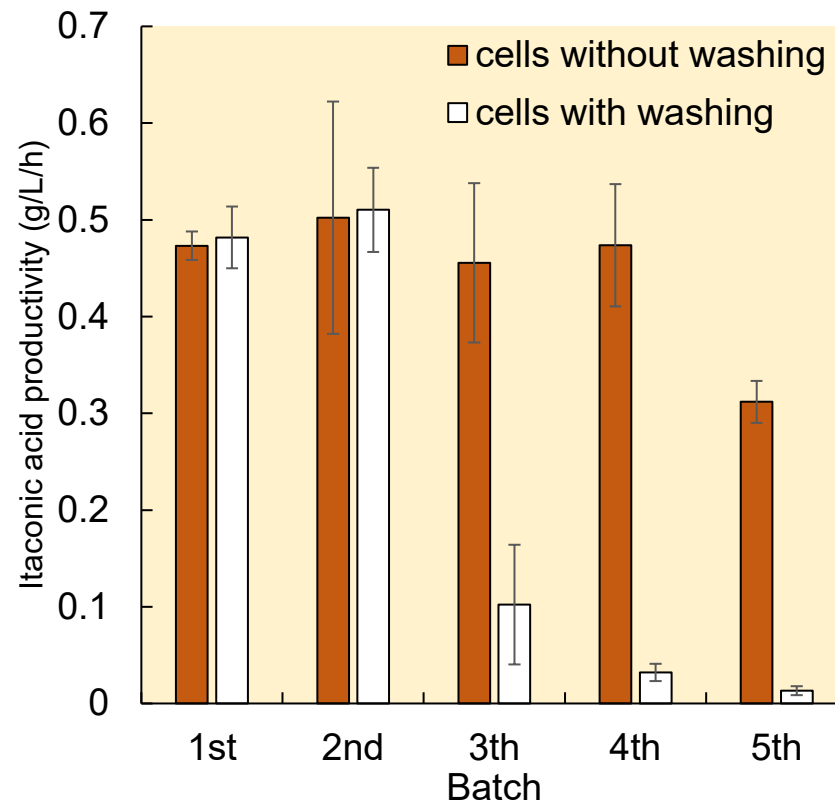
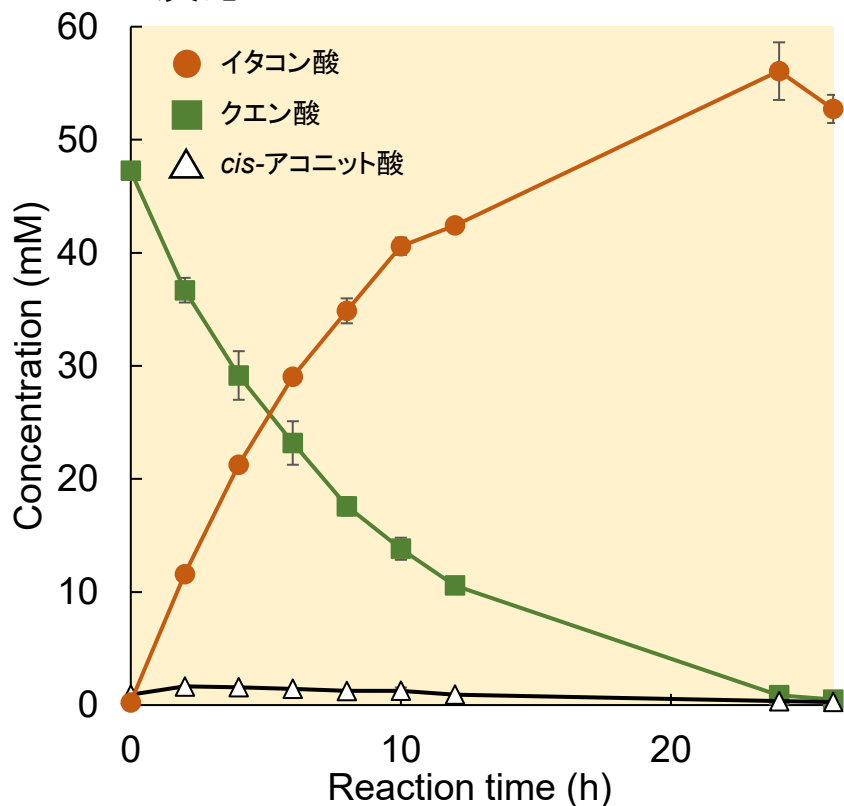
反応: 28°C, 1 h



熱処理温度 (°C)

熱処理温度は45°Cで生産性が最大であったが, CAD活性は低下した。
また, ほとんどは細胞による反応活性だが, 1割程度は上清に漏出した。

熱処理: 45°C, 15 min
反応: 28°C



高収率でイタコン酸を生産し、触媒を繰り返し利用することが可能となった。

従来技術とその問題点

既に実用化されているものには、*Aspergillus*属細菌や大腸菌を用いた微生物変換法があるが、
生産性や収率が低いこと
基質の膜透過性
等に課題が残されている。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、膜透過性の向上に成功した。
- 従来は膜透過性を向上させるために界面活性剤等の薬剤処理が主であったが、シンプル酵素触媒では中温加熱処理で可能となった。
- 本技術の適用により、触媒構築の期間の短縮や薬剤を使わないことから、製造コストの削減が期待される。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、イタコン酸など幅広い化学品のバイオによる製造に適用することで中温での酵素反応を効率的に行うことが可能となる。
- シンプル酵素触媒のメリットとして、熱処理により競合する宿主の代謝酵素による原料基質等のロスをなくし、基質の膜透過性を向上させることが期待される。

実用化に向けた課題

- 現在、変換酵素を活用した高収率なイタコン酸変換が可能なところまで開発済みである。しかし、触媒の固定化による長期利用は未解決である。
- 今後、触媒の安定的利用に関する検討を行う必要がある。

企業への期待

- 収率を向上させた効率的な酵素変換を容易に行う手法として、本シンプル酵素触媒は有用であると考えている。
- 微生物や酵素の固定化技術を有する、酵素による変換プロセスを考えている企業との共同研究を希望。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 低温菌を用いたイタコン酸の製造方法
- 出願番号 : 特願2018-124796
- 出願人 : 広島大学
- 発明者 : 田島誉久、加藤純一、羅宮臨風

お問い合わせ先

広島大学

産学連携推進部 産学連携部門

産学官連携コーディネーター

柳 和裕(やなぎ かずひろ)

〒739-8511 東広島市鏡山1丁目3-2

TEL: 082-424-4306 FAX: 082-424-6189

E-mail: yanagi@hiroshima-u.ac.jp