

難水溶性のファインケミカル製品製造プロセスの触媒として応用可能

今回新たに開発された有機溶媒耐性酵素は、有機溶媒耐性微生物が作り出す有機溶媒耐性酵素(プロテアーゼ^(注1))を改良することで、有機溶媒存在下でのペプチド合成反応を迅速に触媒する高活性酵素(有機溶媒耐性PST-01プロテアーゼ等)を開発したものです。

- 従来酵素(サーモライシン)と比較して、有機溶媒存在下で16倍以上の安定性と3.4倍以上のアスパルテーム^(注2)前駆体合成活性を有します。有機溶媒耐性と高い合成活性の両方の特徴を有した酵素の開発は世界初です。
- ファインケミカル製品の多くは水に不溶性であり、製造の過程では有機溶媒が用いられることが多くあります。一方でファインケミカル製品を合成する酵素は、特定の化合物を特定の生成物に変換する特異性が高いが、有機溶媒存在下では活性を失いやすい等の課題がありました。
- 本研究で開発した酵素は、有機溶媒中の50%ジメチルスルフォキシド存在下においてアスパルテーム前駆体を収率83%で合成可能であることが明らかとなる等、有機溶媒存在下でも安定性して高活性を示し、ファインケミカル製品の合成酵素としての有用性を確認しています。
- 従来の合成反応酵素において必要だったカルシウム等の安定化剤の添加やその洗浄プロセスを不要とすることで高効率な連続生産プロセスの構築も可能です。また有機溶媒の使用量を低減し、環境負荷低減を可能とする省資源・省エネルギーのケミカルプロセスの構築が期待されます。

競合技術への強み

比較項目	有機溶媒存在下での活性の半減期 (高い活性が維持できる時間)			反応溶液への カルシウムの 添加	アスパルテーム 合成活性
	エタノール 存在下	メタノール 存在下	DMSO 存在下		
耐熱性サーモライシン (従来酵素)	△ 3日	△ 5日	△ 3日	△ 必要:カルシウムスケール(垢)の原因	△ 50.7 [μmol·(min·g-enzyme) ⁻¹]
有機溶媒耐性PST-01プロテアーゼ (新規開発酵素)	◎ 100日以上	○ 50日以上	○ 50日以上	◎ 不要:連続生産プロセスの構築も可能	◎ 174.9 [μmol·(min·g-enzyme) ⁻¹](PST-01-Y114Sプロテアーゼを用いた場合)

▲耐熱性サーモライシンと有機溶媒耐性PST-01プロテアーゼの比較表

有機溶媒耐性酵素には、次の特徴があり、有機溶媒耐性酵素(PST-01プロテアーゼ)は、耐熱性酵素(サーモライシン)と比べ、有機溶媒存在下での安定性に優れています。そのため、有機溶媒存在下で長期間使用することが可能になります。(表参照)

- 有機溶媒耐性酵素は、水に難溶性のファインケミカル製品等の合成に用いられる有機溶媒存在下でも安定して触媒機能を発揮します。
- 酵素は常温・常圧で機能し、基質特異性が高いため、工程数低減、副生成物低減、収率増加、使用原料低減、使用溶媒量低減、使用エネルギー低減、ユーティリティ低減、環境負荷低減し、省資源・省エネルギーの環境調和型プロセスが構築できます。
- プロセスの簡略化により大幅なコストダウンが期待できるため、極めて経済的なプロセスの構築が可能になります。

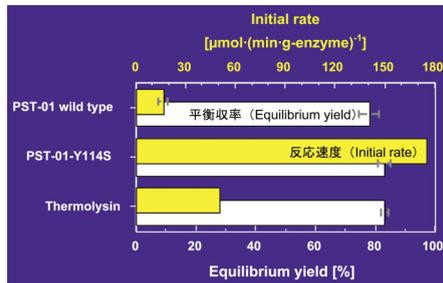
ここがポイント

ファインケミカルの製造には多段階の反応過程を必要とするため、最終的な収率が低く、多量の廃棄物や環境負荷の原因となる副生成物を生じています。酵素は常温・常圧で反応を促進し、特定の化合物を特定の生成物に変換する特異性が高いため、このようなファインケミカルの製造の触媒として用いると、省資源・省エネルギーかつ、副生成物を生成しない環境負荷を低減したケミカルプロセスの構築が可能ですが、難水溶性のファインケミカル製品製造プロセスの溶媒として用いられる有機溶媒存在下では、酵素の安定性が悪く、活性が失いやすいという課題がありました。

今回新規に開発した酵素は、有機溶媒耐性微生物が作り出す有機溶媒耐性プロテアーゼのアミノ酸の一部を遺伝子組み換えにより改良したもので、有機溶媒存在下で高いペプチド合成活性を有しています。プロテアーゼは本来、ペプチド結合を加水分解する酵素ですが、有機溶媒存在下ではペプチド結合の合成反応を促進します。例えば、有機溶媒耐性酵素(PST-01プロテアーゼ)は合成甘味料(アスパルテーム)の前駆体を合成することが可能です。タンパク質工学的にサーモライシン(thermolysin)

より高いアスパルテーム前駆体合成活性を有する酵素(PST-01-Y114S)の作成に成功しています。(図参照)

また、サーモライシンを用いる場合に、安定化剤としてカルシウムイオンの添加が必要であり、製造過程ではカルシウムの垢の形成によるトラブルが懸念されますが、開発した酵素はカルシウムイオンの添加が不要であり、高効率な連続生産プロセスの構築も可能です。プロテアーゼ以外に有機溶媒耐性リパーゼ^(注3)等の開発も進んでおり、これらの有機溶媒耐性酵素を用いれば、副生成物を生じずに種々のペプチドやエステルを合成でき、合成甘味料の他に、ポリアミノ酸、バイオディーゼルの高付加価値食品油、エステル系香料、医薬中間体等の合成が可能です。



▲種々のPST-01プロテアーゼとサーモライシンを用いたアスパルテーム前駆体の合成

ブレイクスルーへの道のり

20世紀後半：日本人研究者による酵素工学的手法による有機溶媒存在下での酵素反応に関する多くの研究成果、有機溶媒耐性微生物の発見。

1991年：有機溶媒耐性酵素のスクリーニングの開始。

1994年：世界最初の有機溶媒耐性酵素を産生する有機溶媒耐性微生物の発見。

1995年：有機溶媒耐性酵素や有機溶媒耐性微生物の基礎的知見の収集。

1999年：有機溶媒存在下で有機溶媒耐性酵素を用いると高効率に合成反応が進行することを確認。

2001年：有機溶媒耐性酵素の遺伝子を取得、米国カリフォルニア大学バークレイ校での研究開始。

2005~2008年：NEDO産業技術研究助成事業「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」を実施。以下①~⑥の研究開発に取り組み、ほぼ全てのテーマについて所望の成果を得た。

- ① 酵素の有機溶媒耐性に関する新しい知見の蓄積。
- ② タンパク質工学的手法による有機溶媒耐性酵素の作製。
- ③ 異種宿主を用いた有機溶媒耐性酵素の高発現系・高活性化。
- ④ 遺伝子工学的手法による有機溶媒耐性微生物の作製。
- ⑤ 有機溶媒存在下での発酵の実施、新規有機溶媒耐性酵素の発見。
- ⑥ 有機溶媒存

在下の酵素・微生物反応の工学的解析。本助成期間中に、特許出願4件、査読つき英語論文11報、著書(海外からの執筆依頼・章を担当)1冊、総説1件、国際会議等発表20件、国内学会等発表43件。研究成果は、日経産業新聞(2007年12月4日)や日刊工業新聞(2008年1月18日)で取り上げられる。酵素工学研究会酵素工学奨励賞受賞(2007年10月)、国際会議でのPoster Award受賞(2007年10月)。

■サクセス・キー

通常の酵素は有機溶媒存在下では不安定であるため、酵素に物理的・化学的修飾を施し、酵素の安定化が行われていました。既存の常識にとらわれず、物理的・化学的修飾なくとも有機溶媒存在下で安定な酵素はないものか?という考えから、有機溶媒耐性酵素の探索を開始し、結果的に世界最初の有機溶媒耐性酵素の発見につながりました。

■ネクスト・ストーリー

ファインケミカルの製造の触媒として用いることのできる有機溶媒耐性酵素の開発を今後も推進すると共に、有機溶媒耐性酵素の上市、有機溶媒耐性酵素の利用拡大、酵素への有機溶媒耐性付与技術の確立を目指します。共同研究や研究成果の社会への還元を推進していただけるパートナーを募集しています。

(注1) タンパク質中のペプチド結合を加水分解する酵素のこと。一般に、タンパク質中のアミノ酸間のペプチド結合(アミド結合)部分を加水分解する。タンパク質中の特定のペプチド結合部位だけを、特異的に切断するという切断する機能(高度な選択性)を有する酵素を「基質特異性が高い」と言う。

(注2) 人工甘味料の一つ。フェニルアラニンのメチルエステルと、アスパラギン酸とがペプチド結合した構造を持ち、甘味は砂糖の約200倍。アスパルテーム(アスパラギン酸フェニルアラニンメチルエステル)の前駆体は、年間世界で1万5000トンの生産されている。

(注3) 脂質のエステル結合を加水分解する酵素のこと。一般にトリグリセリドのエステル結合部分を分解して脂肪酸を遊離する。



プロジェクトID・研究テーマ名・年度

05A33005d「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」(平成17年度第1回公募)

代表研究者・所属機関・所属部署名・役職名

荻野 博康 大阪府立大学大学院工学研究科 准教授