

| | |
|----------|--|
| 氏名 | たきもとあきお 瀧本明生 |
| 学位(専攻分野) | 博士(農学) |
| 学位記番号 | 論農博第2543号 |
| 学位授与の日付 | 平成16年11月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文題目 | Studies of Production of Deacetyl 7-Aminocephalosporanic Acid with Recombinant Cephalosporin-C Deacetylase (組換えセファロスポリンCデアセチラーゼを用いるデアセチル7-アミノセファロスポラン酸製造に関する研究) |
| 論文調査委員 | (主査) 教授 江崎信芳 教授 清水昌 教授 加藤暢夫 |

論文内容の要旨

デアセチル7-アミノセファロスポラン酸(DAc-7-ACA)は、セフロキシムやフロモックスをはじめとする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。DAc-7-ACAは、7-アミノセファロスポラン酸(7-ACA)を化学的あるいは酵素的に脱アセチルすることにより生産される。しかしながら、化学的製造法では、大量の有機溶媒を要するほか、7-ACAおよびDAc-7-ACAの分解を避けるために低温で長時間反応させる必要があり、なおかつ製造過程でDAc-7-ACAがラクトンを生成し収率が低下するといった数々の問題点がある。一方、酵素的製造法では、温和な条件で反応させることができることから、高収率・高効率な生産が期待されるほか、環境保全の観点からも化学的製造法を凌駕するが、産業に実用できる優れた酵素の開発には至っていなかった。本研究は、DAc-7-ACAの酵素的製造法確立を目的として、工業生産に実用できる優れた酵素を開発するとともに、その特性を解明し、遺伝子組換えによる酵素の高生産を達成し、固定化酵素を用いる高効率な生産系の開発を行ったものであり、その結果は以下のように要約される。

1. 土壌より分離した *Bacillus subtilis* SHS0133 株に新規なセファロスポリンCデアセチラーゼ(CAH)を見いだした。本菌より本酵素を精製し、その酵素科学的諸性質を解明するとともに、その遺伝子をクローニングして高発現させる系を構築した。本酵素は、生成物である DAc-7-ACA および酢酸による阻害をほとんど受けず、熱や pH の変化に対しても安定であり、反応の最適 pH は中性付近にあることから、DAc-7-ACA 製造用触媒として好適であることを見いだした。

2. 大腸菌の遺伝子組換え系を用いる CAH の優れた工業生産法を確立するために、CAH 遺伝子の構造最適化を検討し、その結果、Shine-Dalgarno 配列と開始コドン間の塩基長とその配列を改変することにより、CAH 生産量を数倍上昇させることに成功した。この改変遺伝子の発現系を用いることによって、原株の約1,000倍に相当する CAH の高生産を達成することができた。本発現系において、培養液から菌体を分離した後、菌体破砕液を珪藻土マイクロセル T38 で処理するだけで、培養液1リットルあたり5グラムの精製 CAH を取得できる画期的な工業生産法を開発することに成功した。

3. ポリアクリルアミド系樹脂を担体とする固定化 CAH を作製し、酵素工学的な特性を明らかにした。DAc-7-ACA の生産にあたっては、酢酸による pH 低下を制御する必要があり、そのためには機械的強度の高い本固定化酵素が最適であることを実証した。また、7-ACA は水溶液中で非常に不安定であるが、7-ACA をスラリー状で添加し、20°C で反応を行うことで、DAc-7-ACA のラクトン化を0.2%以下に抑制するとともに、98%以上の変換率で DAc-7-ACA を生産することに成功した。本生産系における物質収支式の組み立て、反応シミュレーション法の確立によって、大容量バイオリアクターの設計に道を拓いた。その結果、70日間、52回の繰り返し運転が可能な12トンのバイオリアクターの開発に成功し、DAc-7-ACA の工業生産を実現させた。

論文審査の結果の要旨

セフェム系抗生物質の合成原料となる DAc-7-ACA を低コストで効率よく製造する方法の開発が求められている。本研究は、DAc-7-ACA の工業生産に実用できる CAH を見だし、その優れた特性の解明、高生産法の確立、ならびに固定

化 CAH を用いる DAc-7-ACA の工業生産用バイオリアクターの開発を行ったものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. 土壌分離菌 *B. subtilis* SHS0133 株より、7-ACA を効率よく DAc-7-ACA に変換する CAH を見だし、その遺伝子をクローン化し、高発現させるとともに、CAH の酵素科学的な性質を詳しく調べた。安定性が高く、生成物である DAc-7-ACA や酢酸による阻害をほとんど受けず、DAc-7-ACA の工業生産に実用できる優れた CAH を発見した学術的、産業的意義は大きく、高く評価できる。

2. 有用物質の酵素的工業生産を成功させるためには、短時間で大量に酵素を生産できるかどうか鍵となる。CAH 遺伝子の構造を最適化し、遺伝子組換え系における CAH 生産量を飛躍的に向上させることに成功しており、その意義は大きい。また、菌体破碎液を珪藻土マイクロセル T38 で処理するだけで精製 CAH を取得できる優れた方法を開発した成果も特筆に値する。CAH の工業利用に道を拓く重要な発見であり、高く評価できる。

3. ポリアクリルアミド樹脂を担体とする固定化 CAH を作製し、その酵素工学的な特性を解明した。スラリー状の 7-ACA を添加するという斬新な方法の開発により、7-ACA の分解および DAc-7-ACA のラクトン化を抑えることに成功した意義は大きく、本研究の重要な成果といえる。反応シミュレーションの確立によってバイオリアクターのスケールアップに成功したことも、高く評価できる。

以上のように本論文は、DAc-7-ACA の製造に実用できる CAH を発見し、その酵素科学的性質を解明するとともに、固定化 CAH による DAc-7-ACA の工業生産法を確立したものであり、応用微生物学と応用酵素学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年9月9日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。