有機溶媒中での生体触媒反応 による物質生産

本田孝祐, 大竹久夫

バイオプロセスの適用範囲を脂溶性化学品にまで拡大すべく、有機溶媒存在下での生体触媒利用技術の開発に期待が寄せられている。ここで重要な役割を果たすのが、有機溶媒に対する耐性や親和性といったユニークな特性を有する酵素や微生物である。ただし、いかに優れた生体触媒といえども、これらが無作為に基質と振り混ぜるだけで生産物が得られるわけではない。ここでは、非水バイオプロセスの実現に向けた近年の取り組みをそれぞれの反応実施形態により大別し、解説してみたい。

微生物（由来酵素）による有用化学品合成プロセス、いわゆるバイオプロセスの成否は、用いる生体触媒のポテンシャルをいかにして最大限に引き出すかに強く依存する。このため生体触媒は通常、その最適条件付近、すなわちこれらが本来機能している生体内環境に近い条件で使用されなければならない。一方、私たちの身の回りを埋め尽くした合成樹脂や塗料に目をやれば容易に気づくことであるが、汎用化学品の多くは水にまったく、あるいはほとんど溶けない物質である。これらの物質をバ

イオプロセスの対象とするには、有機溶媒存在下での生体触媒利用技術の開発が不可欠となる。しかし、生体反応と有機溶媒とは文字通り「水と油」の関係であり、互いに相容れないものどうしである。たとえば、日常生活の中で消費期限を過ぎた飲料水が微生物の繁殖による腐敗を起こすことはまれに（しばしば？）見受けられようが、長期間放置した食用油が（酸化などによる品質劣化は別として）同様に腐敗したという経験は誰にもなかるう。この「水と油」のジレンマをいかに克服するかが非水バイオプロセス開発の要であり、国内外を問わず様々な研究開発が進められている。本稿では、これまでに報告された有機溶媒存在下でのバイオプロセスのいくつかをその反応形態により大別し、それぞれにおける代表的な研究例を引用しつつ解説していきたい。

水/有機溶媒二相システム

1. 水/有機溶媒二相システムでの酵素反応

脂溶性物質の酵素的変換に最も一般的に用いられるのは、水系反応液上に基質を溶解させた有機溶媒を重層して反応を行なわせる水/有機溶媒二相系プロセスである。

Biocatalytic Production of Water-insoluble Chemicals in Anhydrous Reaction Media
Kohsuke HONDA, Hisao OHTAKE, 大阪大学大学院工学研究科

多くの場合、反応液の総体積の10～50%程度の有機溶媒が用いられる。有機溶媒相からわずかに溶けだす基質は水相にて酵素による変換を受け、再び有機相に回収される。二相システムのメリットは、基質・生産物の溶解度を高めることに加え、これらを有機相に偏在させることにより水相中の生体触媒との必要以上の接触を阻止し、毒性や反応阻害を軽減できる点にある。水系環境下で暮らす微生物にとって、水に溶けない物質はそもそも利用価値のないものである場合が多く、往々にして高い生物毒性を示す。また、高濃度の生産物の蓄積による酵素反応の阻害は、脂溶性物質をターゲットとした場合に限らず、バイオプロセスにおける一般的な問題である。むしろ、基質・生産物のみならず、これらを溶解させる有機溶媒そのものの生物毒性も無視はできない。

目的とする反応が比較的少数(1～2ステップ)の酵素によって触媒される場合、これらの酵素が基質・生産物や有機溶媒に対して十分な耐性を有していれば事は足りる。片岡らのグループは、NAD(P)H依存型カルボニル還元酵素反応をグルコースデヒドロゲナーゼによるNAD(P)⁺の再還元と共役させることにより、プロキラルケトンから対応する光学活性アルコール類を生産させることに成功している⁽¹⁾。同グループでは、基質特異性・立体選択性の異なる種々のカルボニル還元酵素遺伝子のライブラリー化を進めており、様々なキラルアルコール生産の実施例を報告している。このうち、基質が脂溶性物質である場合、酢酸ブチルなどの有機相を導入してこれらの溶解度を高めた二相システムを採用している。脂溶性基質および補酵素再生の還元力となるグルコースは、それぞれ有機相と水相から供給されており、水/有機溶媒二相システムの特徴を最大限に活用した反応形態であるといえよう。反応はカルボニル還元酵素およびグルコースデヒドロゲナーゼを共発現させた大腸菌の菌体を触媒として行なわれている。大腸菌は酢酸ブチルの毒性には耐えることができないために死滅・溶菌しているものと考えられるが、目的の酵素自身はこの条件下でも活性を保つことができるため、持続的に反応が進行する。

種々のキラルアルコール生産例のうち、代表的なものについて紹介すると、*Sporobolomyces salmonicolor*由来の還元酵素を用いることにより、酢酸ブチル存在下で、4-クロロ-3-オキシ酪酸エチル(COBE)から(R)-体の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(CHBE)をモル収率94%、光学純度92% e.e., 生産物濃度268 mg/mlという高い効率で生産することに成功している。また、本酵素とは逆の立体選択性を示す*Candida magnoliae*由来酵素

を用いることにより、(S)-CHBEの生産(収率89%、光学純度99% e.e., 生産物濃度250 mg/ml)が可能であることも報告されている。これらの優れた成果が契機となり、類似の酵素や反応システムを用いた試みが他グループからも報告されている。

しかし、上記の研究で用いられている酵素反応は、いずれも補酵素再生反応とのカップリングや有機溶媒の利用といった最終的な生産システムの形態を念頭においたうえでの精力的なスクリーニングにより獲得されたものである。したがって、同様のアプローチをとれば必ずしも有機溶媒中での高い生産効率が達成されるわけではない点には注意が必要であろう。

2. 有機溶媒耐性微生物を用いた物質生産

発酵生産のように多段階の酵素反応が関わる変換反応や、ATPなどのエネルギー源の供給が必要となる酵素反応を有機溶媒存在下で実施する場合、このような条件の下でも代謝活性を維持可能な有機溶媒耐性微生物を触媒として用いることが有効と考えられる。あるいは目的酵素が有機溶媒に対して脆弱である場合、これらを有機溶媒耐性微生物の菌体内に保護してやることにより反応効率を高める、という考え方も成り立つ。

多くの有機溶媒は生体膜中に蓄積し、これを破壊することで細胞構造を破壊、死に至らしめるとされている。種々の有機溶媒が示す生物毒性はその化学構造よりも水との混和性に依存し、各溶媒のオクタノール/水分分配係数の対数値(log $P_{o/w}$)がその生物毒性の指標として汎用される⁽²⁾。一般に、log $P_{o/w}$ が1～4の範囲にある有機溶媒は特に生物毒性が高いとされ、この範囲内においてはより低いlog $P_{o/w}$ を有する溶媒がより高い毒性を示すことが知られている。このため、log $P_{o/w}$ が上記の範囲にある有機溶媒を重層した培養液中で旺盛に生育できるものを有機溶媒耐性微生物と定義し、その中でもより低いlog $P_{o/w}$ を有する有機溶媒の共存下で生育できるものをより優れた耐性微生物であるとする考え方が広く受け入れられている。しかし、培地に重層する有機溶媒量や溶媒添加のタイミングなどの詳細な実験条件に関しては、各報文の間でばらつきが見られる。このため、「有機溶媒耐性」を定量化するための明確な指標が存在せず、「既報の中で最も高い有機溶媒耐性を有するのは××菌である」といった評価の基準が曖昧である点は指摘せざるをえないだろう。

ともあれ、有機溶媒耐性微生物を用いた物質生産の研究例に話題を戻したい。上述の定義に従えば、有機溶媒耐性微生物に関する研究は、1982年の井上と堀越によ

るトルエン ($\log P_{o/w} = 2.5$) 耐性 *Pseudomonas putida* IH-2000株の発見⁽²⁾に端を発する。これ以降、*Bacillus* 属や *Rhodococcus* 属などのグラム陽性細菌からも高い耐性を有するものが見いだされている⁽³⁻⁵⁾が、多くの研究が *Pseudomonas* 属細菌に集中しているのが現状である。このうち、Schmidらのグループは、スチレンの立体選択的エポキシ化をモデルとした一連の研究を実施し、有機溶媒存在下での *Pseudomonas* 属細菌の物質生産能力を評価している。残念ながら、生産性という観点で有機溶媒耐性細菌を用いることにより顕著な優位性が見られたとの報告はこれまでのところなされていないが、代謝流速測定などの精密な解析を通じて、これらの細菌のユニークな特徴が示されつつある。

Schmidらがモデル反応として用いたスチレンのエポキシ化を触媒するスチレンモノオキシゲナーゼは、NAD(P)H要求型の酵素である。汎用宿主細菌である大腸菌を用いた場合、有機溶媒存在下では異化代謝を通じたNAD(P)Hの供給能力が低下し、これが変換反応の速度を律する⁽⁶⁾。一方、有機溶媒耐性細菌である *Pseudomonas putida* DOT-T1E株を用いた場合、有機溶媒 (*n*-オクタノール) の添加により異化代謝経路が有意に増強され、NAD(P)H供給速度は溶媒非存在時の8倍程度にまで向上する。しかし、増産されたNAD(P)Hの還元力のほとんどは、有機溶媒中での生命活動の維持に費やされるため、結果的に目的酵素への割り当ては大きく変化しない⁽⁷⁾。事実、*Pseudomonas* 属細菌の有機溶媒耐性にはATP依存型の膜排出ポンプによる有機溶媒の細胞外への汲み出しが非常に重要な役割を果たしており、これら排出ポンプの発現量は培養液への有機溶媒の添加により大きく向上することが知られている⁽⁸⁾。いかに有機溶媒耐性細菌といえども、著量の有機溶媒存在下で生命活動を維持するには相当量のエネルギーが必要であり、安直な方法での物質生産には適合しないようである。

一方、宿主微生物を単に「(有機溶媒感受性の) 酵素を保護するためのカプセル」として利用する場合には、代謝活性の維持は必須ではない。有機溶媒存在下で生きていようが死んでいようが、溶菌を起こさずに細胞構造を維持することが必要である。このような微生物は、上述の有機溶媒耐性微生物の定義にはもはや当てはまらない。松山らのグループは、この「非溶菌性」を基準としたスクリーニングにより *Kocuria rhizophila* DC2201を獲得している⁽⁹⁾。図1に示すように細胞懸濁液に酢酸エチルを重層・混和したところ、大腸菌では溶菌のために液状がドロドロになり、水/有機溶媒界面がぼやけてしまっている。これに対し、*K. rhizophila* DC2201を含む

図1 ■ *Kocuria rhizophila* DC2201 (A) および大腸菌 (B) をけん濁した水/酢酸エチル混合液 (株式会社ダイセル 松山収彰博士より提供)

混合液では溶菌は認められず、くっきりとした水/有機溶媒界面が維持されていることがわかる。ただし、この状態で *K. rhizophila* DC2201 はすでに死滅している。同グループでは、本菌の組換え株を触媒とした (*R*)-マンデル酸生産実験により 205 g/l の高濃度で目的産物を蓄積させることに成功している⁽¹⁰⁾。この最終生産物濃度は、同じ酵素を過剰発現させた大腸菌を用いた場合 (80 g/l) と比べても著しく高いものである。また、本組換え菌の無細胞破碎液を触媒とした同様の生産実験では生産物はほとんど得られないことから、目的酵素を菌体内に保護することにより、ねらいどおり有機相中の基質による阻害効果が低減されていることが確認されている。

3. 親油微生物を触媒とした水/有機溶媒二相システムでの物質生産

筆者らのグループで応用研究を進めている *R. opacus* B-4は、水/有機溶媒の混合液中で有機相に吸着する。また、後述するように固定化や凍結乾燥などの前処理を必要とすることなく湿潤状態で非水溶媒中に分散するといった「親油的」性質を有する (図2)^(11, 12)。筆者らは、以下に記す一連の研究を通じて、水/有機溶媒二相システム中での生体触媒反応の実施において、有機溶媒耐性以外にも *R. opacus* B-4が示すような親油性が生産効率を左右する重要なパラメーターとなることを明らかにしている⁽¹³⁾。

R. opacus B-4および比較対象の「親水性」細菌とし

(A)

(B)

図2 ■ 有機溶媒（シクロヘキサン）にけん濁させた *R. opacus* B-4 (A 左) および大腸菌 (A 右)

約3gの湿菌体に100 mlのシクロヘキサンを加え、マグネティックスターラーにて攪拌した様子を示す。*R. opacus* B-4のけん濁液を顕微鏡下で観察すると菌体は凝集した状態で分散していることがわかる (B)。バーの長さは200 μm

図3 ■ 大腸菌 (A) および *R. opacus* B-4 (B) による水/有機溶媒二相反応液中でのアルキル化ベンゼン水酸化反応

反応液中の水：有機溶媒比を9:1 (■), 5:5 (■), 1:9 (■) と変化させた。

て大腸菌を用い、それぞれに同一の酵素遺伝子 (*P. putida* F1由来トルエンジオキシゲナーゼ) を発現させた組換え株を作製した。これらを触媒とし、比較的毒性の低い有機溶媒であるオレイルアルコールを有機相として含む反応液中にて各種アルキル化ベンゼン (トルエン, エチルベンゼン, プロピルベンゼン, ブチルベンゼン) の水酸化反応を実施した。これには、側鎖アルキル基の炭素鎖数を変化させることで水溶解度を変化させ、基質の水溶解度と変換能との相関を明確にするねらいがある。大腸菌を触媒とした場合、基質の水溶解度が低下するにつれて生産物収率が低下していくのに対し、*R. opacus* B-4 使用時には目立った収率の低下は認められなかった (図3)。この結果は、大腸菌は主として水相に分配された基質に対して作用するため、基質の水溶解度に強く影響されるのに対し、*R. opacus* B-4はその親油的性質により有

機相中の基質に対する高い接触効率を保持しているためだと説明できる。大腸菌における収率の低下について基質の毒性の影響を懸念されるかもしれないが、すでに述べたとおり、細菌に対する有機溶媒の毒性は、これらの $\log P_{ow}$ が高くなるほど低くなる。アルキル鎖の炭素鎖数が長い基質ほど $\log P_{ow}$ は高くなり毒性は低下することから、収率の低下が生菌率の低下に起因するとは考えづらい。

また、有機溶媒相と水系反応液の体積比を変化させ、これらが収率に及ぼす影響についても検討を行なった。この結果、大腸菌では有機相の割合が低いほど反応効率が高まるのに対し、*R. opacus* B-4の場合、等量の水/有機溶媒混合液中にて最大の変換効率が得られた。二相システムにおける有機相から水相への脂溶性基質の分配は両相間での濃度勾配がドライビングフォースとなる。したがって、大腸菌の場合、有機相の割合が小さく基質濃度勾配が大きくなるほど基質が水相中の菌体に供給されやすくなる。一方、*R. opacus* B-4では、有機相中の基質に対しても高い接触効率を有することから、水/有機溶媒間の比界面積が最大となる等量混合液中にて最大の変換効率を示したものと考察できる。

有機溶媒単相システム

1. 酵素の有機溶媒耐性化と非水溶媒中での利用

水をまったく、あるいはほとんど含まない有機溶媒単相システム中で生体触媒反応を実施することができれば、

- 1) 水に依存する副反応を抑制できる
- 2) 熱力学的平衡を加水分解から合成反応側へと転換できる
- 3) 固定化が必ずしも必要でない (生体触媒は有機溶媒に不溶であるため)

4) 微生物汚染が少ない

など、二相システムにはない利点を活用することが可能になる⁽¹⁴⁾。また、当然のことながら二相システムに比べて反応液量を減容することが可能であるほか、生成物の分離・精製といったダウンストリームプロセスの簡略化も期待できるため、実用上のメリットは大きい。とはいえ、冒頭でも述べたとおり、生体反応と有機溶媒とは本質的に相容れないものどしであり、有機溶媒単相システムの実現にはひと工夫が必要である。

単離酵素の場合、凍結乾燥や結晶化といった適当な前処理を施すことによって、水をまったく含まない有機溶媒中（厳密に言えばタンパク質表面の水和水は残存する）でもその活性を維持できるものがあることが比較的古くから知られている⁽¹⁵⁾。水は元来それ自身が高い反応性をもった化合物であり、水が存在するか否かによって、化学反応のダイナミクスは大幅に変化する。上にも述べたとおり、水自身が基質のひとつとなる加水分解反応においては、非水環境下において熱力学的平衡が逆反応（脱水・縮合）側に大きく傾く。非水溶媒中での酵素利用は、1980年ごろより基礎・応用の両面から活発な研究の対象となってきたが、そのほとんどがリパーゼなどの加水分解酵素を用いたエステルやポリマー合成に関するものであるのはこのためである。

凍結乾燥などの前処理により酵素は立体構造上のフレキシビリティを失う。これにより、その比活性が低下する反面、安定性が大幅に向上するというケースも多く報告されている。たとえば、リパーゼ⁽¹⁶⁾、リボヌクレアーゼ⁽¹⁷⁾、 α -キモトリプシン⁽¹⁸⁾において、これらの凍結乾燥標品を有機溶媒中で使用した場合、100℃における活性の半減期は数時間に及ぶとの報告もある。もちろん同じことを水中で行なえば、酵素は一瞬のうちに不可逆的に失活する。

また、酵素反応の最大の特徴ともいえる基質選択性、位置・立体選択性も、有機溶媒中においては水系反応液中のそれとは大きく変化する。たとえば、*N*-アセチル-L-フェニルアラニンのエチルエステルは水中において α -キモトリプシンのよい基質となり、*N*-アセチル-L-セリンエチルエステルと比べ50,000倍の速度で加水分解を受ける。しかし、オクタン中で同じ酵素を用い、これら2つのアミノ酸誘導体を基質にエステル交換反応を行なったときには、前者に対する反応速度は後者に対するそれのおよそ3分の1と逆転してしまう⁽¹⁹⁾。選択性の変化は用いる有機溶媒の種類によってもひき起こされる。同じく α -キモトリプシンを用いてラセミ体のメチル3-ヒドロキシ-2-フェニルプロピオン酸に対するエステル交換反応

を行なった研究結果では、用いる溶媒によってその立体選択性が最大20倍も変化したとの報告もなされている⁽²⁰⁾。水溶性のタンパク質分子はポリペプチド鎖中の親水性領域を分子の外側に、疎水性領域を内側に向けた立体構造をとることで水溶液中での熱力学的安定性を高めている。多くの酵素タンパク質において活性中心部位は分子の内側の疎水の領域に存在するため、それらの基質認識において、疎水結合が重要な役割を担っている。有機溶媒中で反応を行なった場合、疎水結合による分子間相互作用は水中でのそれに比べはるかに小さくなり、結果的に酵素の選択性に重大な影響が及ぼされると考えられる。

2. 有機溶媒単相システム中での微生物反応

微生物菌体そのものを水を含まない有機溶媒中で用いる場合、その利用形態は、湿潤菌体そのものを用いるか、あるいはこれを凍結乾燥やアセトン脱水などにより乾燥させたものを用いるかに大別される。ただし、後者において触媒微生物は代謝活性を失った状態で使用されるため、その応用範囲は単離酵素の場合と同様、脱水縮合反応などに限定される。一方、湿潤菌体を用いる場合は、代謝活性を保ったまま反応を行なわせることも可能である。ただし、菌体内には重量当たり通常70～80%程度の水分が含まれているため、厳密に水の混入を嫌う変換反応には適用できない。

また、この利用形態を可能にするためには、もう一つ別の前提条件が満たされなければならない。それは、湿潤状態の菌体が有機溶媒中に均一に分散されることである。通常の微生物は湿潤状態で有機溶媒中に分散されることはない。したがって、これらの微生物を非水溶媒中で利用するためには、界面活性剤を用いたwater-in-oil型の逆ミセル中に封入してけん濁させる、あるいは適当な樹脂で包括固定化したものを分散させるといった工夫が必要である。厳密に言えば、これらは有機溶媒単相システムというよりも「水の少ない二相システム」と呼ぶべきかもしれない。しかし、有機溶媒相と水相間の物質移動はその比界面積に比例することから、溶媒中に菌体を分散させることにより、通常の二相システムに比べてより迅速な物質移動、ひいてはより高い変換反応効率を達成できると期待される。

前述の *R. opacus* B-4 のように、ある種の細菌は逆ミセル化や固定化を施すことなく湿潤状態で有機溶媒中によく分散する。数は多くないものの、これらを難水溶性物質の変換に応用した例も報告されている（表1）。筆者の調べた限りでは、最初の報告例は1975年のBuck-

表1 ■ 水を含まない有機溶媒中での微生物変換反応の実施例

菌株	基質	生成物	溶媒	文献
<i>Nocardia</i> sp. NCIB10554	コレステノン	コレステロール	四塩化炭素	21
(<i>Rhodococcus rhodocrous</i>)	4-AD ^a	ADD ^b	ベンゼン： <i>n</i> -ヘプタン	22
<i>Corynebacterium equi</i>	1-テトラデカノール	ミリスチン酸テトラデシル	イソオクタン	23
	2-テトラデカノール	2-テトラデカノン	イソオクタン	23
<i>Mycobacterium</i> sp. NRRLB-3805	β -シトステロール	4-AD ^a	BEHP ^c	24
<i>Rhodococcus opacus</i> B-4	インドール	インジゴ	BEHP	11

^a4-アンドステロン-3,17-ジオン, ^bアンドロスト-1,4-ジエン-3,17-ジオン, ^cビス(2-エチルヘキシル)フタル酸

図4 ■ 有機溶媒中における *R. opacus* B-4 の生菌数ならびにベンゼンジオキシゲナーゼ発現強化株による各溶媒中でのインジゴ生産

R. opacus B-4の湿菌体を初期菌体濃度が 2.4×10^9 cells/mlとなるように各有機溶媒にけん濁し、振とう培養した。1日後(青)および5日後(緑)に一部をプレーティングし、コロニー数を計測することで、生菌数を測定した。同様にベンゼンジオキシゲナーゼを発現強化した*R. opacus* B-4を5mg/mlのインドールを含む各有機溶媒にけん濁し、30℃にて12時間反応させた後のインジゴ生産量を測定した(赤)。括弧内の数字は各有機溶媒のlog $P_{o/w}$ を示す。写真はBEHP中でのインジゴ生産の様子を示す。

landらによる *Nocardia* sp. (後の再分類により *Rhodococcus rhodochrous* とされた) を用いたコレステロールの酸化反応に遡る⁽²¹⁾。その後、本菌はわが国にも取り寄せられ、さらなる研究成果を生むこととなるが、このあたりの経緯は山根の総説に詳しい⁽¹⁴⁾。Diasらは *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805を用いた β -シトステロールの側鎖分解について報告している⁽²⁴⁾。セライト(珪藻土)上に吸着固定化した湿潤菌体を触媒に、ビス(2-エチルヘキシル)フタル酸(BEHP)中で、初発濃度5g/lの基質より70%のモル変換率で生成物である4アンドステロン-3,17-ジオンを得ることに成功している。Bucklandらに取り上げた反応が単一の酵素(コレステロールオキシダーゼ)により触媒されるものであったのに対し、 β -シトステロールの側鎖分解は9種類の酵素による14段階の反応からなるものである。その中には補酵素要求型酵素なども複数含まれるが、本菌は分解した側鎖そのものを異化代謝することで反応に必要なエネルギーを得ていると考えられる。

一方、筆者らのグループでも、*R. opacus* B-4を用いて水を含まない有機溶媒中における微生物反応の実施を

試みてきた。*R. opacus* B-4は、図2に示したように見かけ上均一に有機溶媒中に分散可能である。ただし、この懸濁液を顕微鏡下で観察すると、個々の細胞が完全に分散しているわけではなく、100 μ m程度の大きさに凝集した菌体塊が分散していることがわかる(図2-B)。筆者らは、本菌由来のベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を発現強化し、この組換え株を触媒としたインドールからのインジゴ生産をモデルに有機溶媒単相システムでの生産評価を行なった⁽¹¹⁾。まず、種々の有機溶媒中における *R. opacus* B-4の生菌数およびインジゴ生産量を比較したが、インジゴの生産性と生菌数との間には有意な相関は見られず、生産性についてはBEHPを溶媒とした場合に最も良好な結果が得られた(図4)。また、脂溶性炭素源としてオレイン酸を溶解させたBEHPにおいて同様の反応を実施すると、その生産性は有意に上昇する。ベンゼンジオキシゲナーゼはNADH要求型酵素であることから、Diasらの報告と同様に炭素源の異化に伴う補酵素の再生によって目的の酵素反応の持続性が増したためと考えることができる。

有機溶媒中での微生物の分散性にいかなる分子メカニ

ズムが寄与しているのか、詳しく研究した例はまだないようであるが、表1に記された細菌にはある共通点が認められる。これらの細菌はいずれも細胞壁の外側にミコール酸と呼ばれる長鎖脂肪酸群からなる層を有し、抗酸菌と総称されるものばかりである。単純に考えれば、ミコール酸層の存在により細胞表層が疎水性となり有機溶媒への親和性が高くなっていると予想できる。しかし、細胞表層は単一の生体分子からなる均一な構造をとるものではなく、またよく知られるように細菌の脂肪酸組成は培地組成や培養温度などの条件の違いにより大きく変動する。有機溶媒中に分散する微生物についての報告例はまだまだ少なく、抗酸菌以外にもこのような特性を有した微生物が存在するのか否かも含めてさらなる研究の進展が待たれる。

おわりに

冒頭でも述べたとおり、本稿では有機溶媒存在下での生体触媒反応による物質生産システムの開発研究例を紹介するにあたり、これらを反応の実施形態によりカテゴリー化した。筆者らの研究例を除けば、それぞれのカテゴリーで代表的な研究成果を分け隔てなく紹介したつもりではあるが、有機溶媒存在下での組換え大腸菌による物質生産や、有機溶媒耐性微生物の発見、さらには親油性微生物の応用研究など、結果的にわが国で行なわれた研究成果を多く取り上げることとなった。これは、(筆者の浅学に負う部分を差し引いたとしても)日本が同研究分野を先導する立場にあることを裏付けるものではないかと感じている。とはいえ、紹介した研究例も含め、有機溶媒中での生体触媒反応で実生産にまで応用されているものはまだまだ一握りに過ぎない。この分野における今後の応用研究において、わが国が果たすべき役割はまだまだ多く残されている。

文献

- 1) 片岡道彦：日本農芸化学会誌, **74**, 1097 (2000).
- 2) A. Inoue & K. Horikoshi: *Nature*, **338**, 264 (1989).
- 3) C. Kato, A. Inoue & K. Horikoshi: *Trends Biotechnol.*, **14**, 6 (1996).
- 4) K. S. Na, A. Kuroda, N. Takiguchi, T. Ikeda, H. Ohtake & J. Kato: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 408 (2005).
- 5) Z. Zahir, K. D. Seed & J. J. Denis: *Extremophiles*, **10**, 129 (2006).
- 6) B. Bühler, J.-B. Park, L. M. Blank & A. Schmid: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1436 (2008).
- 7) L. M. Blank, G. Ionidis, B. E. Ebert, B. Bühler & A. Schmid: *FEBS J.*, **275**, 5173 (2008).
- 8) A. Rojas, E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J. L. Ramos & A. Segura: *J. Bacteriol.*, **183**, 3967 (2001).
- 9) K. Fujita, T. Hagishita, S. Kurita, Y. Kawakura, Y. Kobayashi, A. Matsuyama & H. Iwahashi: *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 511 (2006).
- 10) 吉田豊和：バイオサイエンスとインダストリー, **69**, 440 (2011).
- 11) S. Yamashita, M. Sato, Y. Iwasa, K. Honda, Y. Same-shima, T. Omasa, J. Kato & H. Ohtake: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 761 (2007).
- 12) K. Honda, S. Yamashita, H. Nakagawa, Y. Sameshima, T. Omasa, J. Kato & H. Ohtake: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 767 (2008).
- 13) T. Hamada, Y. Maeda, H. Matsuda, Y. Sameshima, K. Honda, T. Omasa, J. Kato & H. Ohtake: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 116 (2009).
- 14) 山根恒夫：油化学, **42**, 50 (1993).
- 15) A. M. Klibanov: *Nature*, **409**, 241 (2001).
- 16) A. Zacks & A. M. Klibanov: *Science*, **224**, 1249 (1984).
- 17) D. B. Volkin, A. Staubli, R. Langer & A. M. Klibanov: *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 843 (1991).
- 18) A. Zacks & A. M. Klibanov: *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194 (1988).
- 19) A. Zacks & A. M. Klibanov: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2767 (1986).
- 20) C. R. Wescott, H. Noritomi & A. M. Klibanov: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10365 (1996).
- 21) B. C. Buckland, P. Dunnill & M. D. Lilly: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 815 (1975).
- 22) T. Yamane, H. Nakatani, E. Sada, T. Omata, A. Tanaka & S. Fukui: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2133 (1979).
- 23) Y. Takazawa, S. Sato & J. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2489 (1984).
- 24) A. C. P. Dias, J. M. S. Cabral & H. M. Pinheiro: *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 708 (1994).