

固定化酵素・細胞の利用

戸田 弘

我々生物の体内では実にさまざまな化学反応が営まれており、それらの大部分を触媒しているのは“酵素”である。一般的な酵素には以下のような特徴が見いだされる。すなわち、

- 1) 常温・常圧・中性付近のpHという温和な条件下で機能する。
- 2) 基質特異性や作用部位特異性、立体選択性が高い。
- 3) 反応特異性が高く、副反応を起こしにくい。

こうした化学触媒とは異なる特性から、酵素触媒を用いることにより以下のようなメリットが得られる。

- 1) 高温高压を必要とせず、省エネルギーで反応が可能である。
- 2) 副生物が少なく目的産物の収率向上が望める。また副生物を除く工程とコストが省ける。
- 3) 基本的に水溶液中で反応を行うため、大量の有機溶媒を必要とせず、環境負荷が小さい。
- 4) 重金属や過激な酸化剤、還元剤などが不要なため、設備管理の負担が軽減され、安全性も高い。

しかしながら、多くの酵素はタンパク質であるがゆえに、1) 有機溶媒や強酸・強アルカリ、高温などに対し不安定である、2) 反応時間経過とともに失活し、反応速度が低下する、3) 水溶性であるため、反応液中からの回収が困難であり連続使用が難しい、などの欠点がある。酵素の固定化はこれらを解消することを主目的として行われることが一般的である。

固定化酵素の定義

一般的に固定化酵素 (immobilized enzyme) と言った場合、樹脂や担体と結合させ回収・連続利用を容易にした酵素触媒を想起する人が多いかと思う。しかし正確には「ある一定空間内に閉じ込められ、連続反応が可能かつ反応後に回収・再利用が可能な状態にある酵素」と定義される。したがって、上述の一般的な固定化酵素だけでなく、セロハン膜などの半透性膜で隔離された空間内に酵素を詰め、反応終了後に反応産物と酵素を分離できるようにする場合にも広義の意味では固定化酵素の一種となるので注意されたい。

固定化酵素の歴史

最初の固定化酵素の報告は、およそ100年前に遡る。1916年にNelsonとGriffinは、骨炭へ吸着された酵母由来インペルターゼが酵素活性を示すことを見いだした¹⁾。その後、1948年にSumnerがアルコール溶液中で不溶させたナタ豆由来ウレアーゼについて、また1953年にはGrubhoferおよびSchleithがポリアミノスチレン樹脂への各種酵素の固定化についてそれぞれ報告しており^{2,3)}、1960年代に入ってから本格的な固定化酵素の研究が行われている。特に、イスラエルのKatchalskiらや我が国の千畑らによる研究がその発展に大きな役割を果たしており、専門の解説書も版行されている⁴⁾。欧米においても、1960年代後半から1970年代にかけて研究が盛んになり、また酵素だけではなく微生物の固定化についても研究が進んだ。その後、動植物細胞や藻類などの固定化法も開発され、1980年代頃にはほぼ基本的な固定化技術が確立されたが、2018年現在でも担体や固定化法の改良が日々続けられている。

酵素固定化のメリット・デメリット

多くの酵素は水溶性であり、反応終了後に基質・生成物溶液との分離が困難である。よって反応ごとに酵素を失活させて除去する必要がある、いわば「使い捨て」せねばならない。また酵素の失活による反応速度の低下も起こるため、長期間安定的に連続利用することが難しい。こうした酵素の欠点を解消し、より安定かつ経済的に触媒として利用するために固定化酵素の研究が進められてきた。酵素を固定化するメリットとしては、

- a) 安定性の向上
- b) 酵素の回収、再利用の簡易化
- c) 酵素を一定空間に留めることができ、連続反応が可能
- d) 酵素と反応生成物の分離の容易化、生成物の収率や純度の向上
- e) 反応プロセスの簡便化
- f) 投入酵素の節約とコスト低下
などがあげられる。一方で、
- g) 固定化操作に伴う活性低下、失活のリスク

- h) 固定化のための工程およびコスト発生
 - i) 固定化粒子の表面積や粒子内拡散抵抗などの制約による反応速度低下
- といったデメリットが生じることも考慮に入れなければならない。

酵素固定化の種類

これまでに酵素や微生物菌体の固定化法としてさまざまな手法が研究されているが、それらは、1) 担体結合法、2) 架橋法、3) 包括法の三つに大別される(図1)。

1) 担体結合法 水溶性の酵素を、セルロースやデキストリン、樹脂ビーズ、活性炭、シリカゲル、磁性粒子や高分子膜など各種の不溶性担体に結合させ固定化する手法である。その結合様式により下記のように分類される。

a) 共有結合法

タンパク質中に存在する種々の官能基(アミノ基、カルボキシル基、水酸基、イミダゾール基、フェノール基など)と担体上の反応性官能基との間で共有結合を形成させ、固定化する手法である。固定化に利用される反応性官能基としてはジアゾニオ基、アジド基(酸アジド)、イソシアネート基、活性型ハロゲン化アルキルなどがあり、これらの官能基とタンパク質との結合様式からジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法に分類される。

共有結合法は酵素と担体が共有結合により強く結合することから、酵素の脱離・漏出が起きにくい。一方で、固定化操作の煩雑さや、化学修飾に伴う酵素の変性・失

活のリスク、担体の再生利用ができないといった欠点もあることに注意したい。

b) イオン結合法

多くのタンパク質はその表面に露出しているアミノ酸残基の側鎖の性質により、正もしくは負に荷電している。よって、イオン交換樹脂などの表面に、静電相互作用によりタンパク質を結合することが可能である。共有結合法と異なり、比較的簡便かつ穏やかな条件で結合させることから酵素の失活が少ないこと、また担体の再利用が可能なことからコストメリットが高いなどの利点がある。その反面、共有結合法と比較して担体と酵素の結合力が弱いため、反応液中のpHや塩濃度により酵素が担体から脱離する恐れがある。代表的な結合担体としてはDEAE(diethylaminoethyl)-セルロースやDEAE-Sephadexなどがあげられる。

c) 物理的吸着法

担体と酵素の物理的相互作用を利用して吸着させる手法であり、酵素と担体を混合するだけで簡便に調製が可能である。イオン結合法同様、結合力は共有結合ほど強固ではないため使用条件により酵素の脱離が起こる。担体としては活性炭や骨炭、シリカゲル、セライト、アルミナ、酸化チタンなどが用いられる。また、アルキル基で樹脂ビーズ表面を修飾し、疎水相互作用により結合させる場合もある。近年ではメソポーラスシリカといったメソ多孔担体への固定化も研究されており、担体の孔径の最適化により酵素の安定性が向上するケースも報告されている⁵⁾。

d) アフィニティ結合法

酵素-補酵素、抗原-抗体など、生体分子間の相互作用を利用することにより、酵素を担体に結合する手法である。アフィニティ結合法の大きな特徴として、担体と目的酵素の特異的親和性を利用するため精製酵素を用いる必要がなく、細胞破碎液と担体を混合するだけで目的酵素を選択的に担体に結合させることが可能である。上記の他にも、特定の糖鎖に特異的に結合するレクチン(コンカナバリンA)や、シリカ結合タンパク質(Si-tag)などを利用した担体への結合も研究されている⁶⁾。近年では、酵母などの細胞表層に提示されるGPIアンカー型タンパク質と目的酵素の融合タンパク質を発現させ、目的酵素を菌体表層に提示させた「アーミング酵母」なども研究されている⁷⁾。これも菌体を回収することにより目的酵素も同時に回収できることから固定化酵素の一種と言える。

2) 架橋法 架橋法は前述の共有結合法と同様に、タンパク質中の官能基とそれに反応する化合物との化学

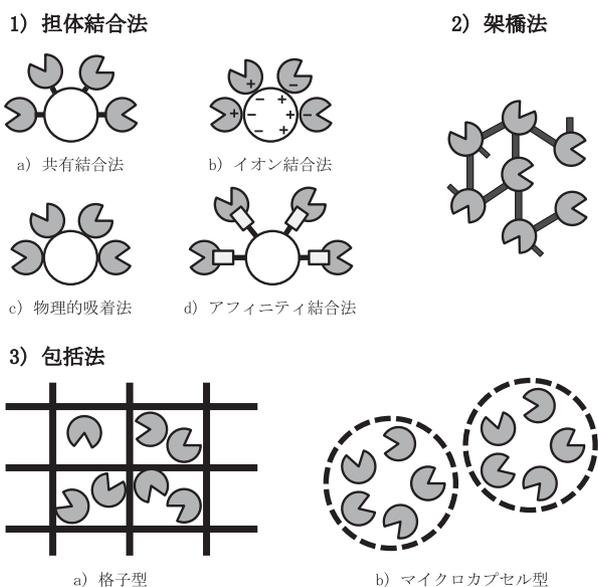


図1. 酵素固定化法の模式図。千畑一郎編集「固定化酵素」より一部改変⁴⁾

結合を利用する。グルタルアルデヒドのような一分子内に二つ以上の反応性官能基を有する架橋剤を用いることで、酵素同士を連結（架橋）させることができる。架橋剤としてはグルタルアルデヒドやイソシアネート誘導体がよく用いられる。支持担体への共有結合と同様、酵素の化学的修飾に伴う失活や活性低下がしばしば起きうるため、目的酵素に最適な架橋法の検討が必要である。

3) 包括法 高分子ゲルの中に酵素を取り込ませることにより、酵素を直接化学修飾することなくゲルの中に固定化する手法であるため、さまざまな酵素への適用が可能である。上記のゲルの格子の中に酵素を取り込ませる格子型と、半透膜のカプセル内に酵素を封じ込めるマイクロカプセル型がある。

a) 格子包括型

アクリルアミドなどのモノマーを含む酵素液に重合開始剤および重合促進剤を添加して重合させゲル化した後に、適当なサイズの粒子へと成形し使用する。ポリアクリルアミドゲルなどの合成高分子のほか、寒天、ゼラチン、カラギーナン、アルギン酸カルシウムなどの天然由来高分子が一般的に用いられる。アクリルアミドなどの合成高分子を用いる場合、モノマー分子が酵素を失活させる場合があるので注意が必要となる。一方、寒天やゼラチンを用いる場合は、これらを溶解させるために熱を加えることから、ある程度の耐熱性を有する酵素向きである。またアルギン酸カルシウムゲルは水溶液中で安定ではあるが、カルシウムイオンが失われるとゲルが溶解するため反応溶液組成には注意が必要である。

b) マイクロカプセル包括型

酵素や補酵素を含む溶液の液滴表面に半透性の被膜を形成させ、微小なカプセルを作製する手法。被膜の形成方法により、界面重合法、相分離法、液中乾燥法の三つに分類される。どの手法も酵素溶液を有機溶媒中で攪拌・分散させその液滴界面に被膜を形成させるが、界面重合法ではモノマー分子を液滴界面で重合させ被膜を形成するのに対し、相分離法および液中乾燥法では有機溶媒に溶解させたポリマー分子により酵素液滴の表面に被膜を形成させる。これらの手法では1-100 μmと非常に微小なカプセルを形成させることが可能であるが、有機溶媒と酵素の接触が多いため失活の度合いが大きいことに注意せねばならない。

4) その他 近年の微細加工技術の発展に伴い、ガラスや樹脂の基板上に酵素や微生物菌体を固定化したマイクロチップセンサーの研究が進んでいる。この際の固体基盤への固定化方法として、レーザー光を用いた手法が研究されている⁸⁾。結合の原理としては物理的吸着

法と考えられるが、大気中もしくは低真空化での操作が可能であること、微細なパターンニングが可能なことなどマイクロチップ型デバイスを構築する上で有利な点が多い。

細胞の固定化

酵素を固定化し工業利用するためには、その酵素を生産する生物から目的酵素を精製する必要がある。酵素源としては微生物、植物、動物などさまざまな生物が考えられるが、原料調達の容易さやコストを考えた場合、微生物由来の酵素を用いることがもっとも現実的である。また、植物や動物由来の酵素を利用する場合でも、多くの場合は遺伝子組換え技術により大腸菌や酵母といった微生物を宿主として発現、利用するのが一般的である。

微生物で酵素を生産させたとき、菌体外に分泌生産されるものはそのまま遠心などにより培養上清を分離・回収し、利用することができる。一方、菌体内酵素の場合は菌体を破碎し目的酵素を抽出した後、精製などを行ってから固定化する必要がある。すなわち、酵素抽出・精製に伴う操作の煩雑化、コスト増、時間などの問題が生じる。そこで、微生物菌体を直接固定化し、固定化酵素と同様に利用することができれば上記の課題を回避することが可能である。またこの場合、菌体自身が持つ代謝系や補酵素再生系を利用できること、複数遺伝子の同時発現による多段階反応が構築しやすいなどの利点もある。伊藤らは、アルコール脱水素酵素 (LSADH) を発現させた大腸菌をポリエチレンイミドおよびグルタルアルデヒドを用いて固定化し、この固定化菌体を詰めたカラムを用いて(R)-1,3-ブタンジオールの連続的生産を行った。これにより固定化菌体の40回以上の繰り返し利用と600時間以上の連続反応を達成している⁹⁾。

また、菌体を生きたまま担体に固定化・培養し、酵素や各種化合物の連続生産に用いる研究は古くからなされている。焼結ガラスや軽石、ポリウレタンフォームを担体として *Aspergillus* や *Penicillium* を培養し、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ヌクレアーゼなどの生産が行われているほか、理科の実験などでおなじみのアルギン酸ビーズで固定化した酵母によるアルコール発酵実験などはもっとも身近な例と言えるだろう。近年では物質生産のみならず、石油分解菌などを担体に固定化し、汚水浄化リアクターとしてバイオレメディエーションに利用する研究もなされている。

固定化酵素の利用形態

酵素を固定化する利点の一つとして、その形を自由に

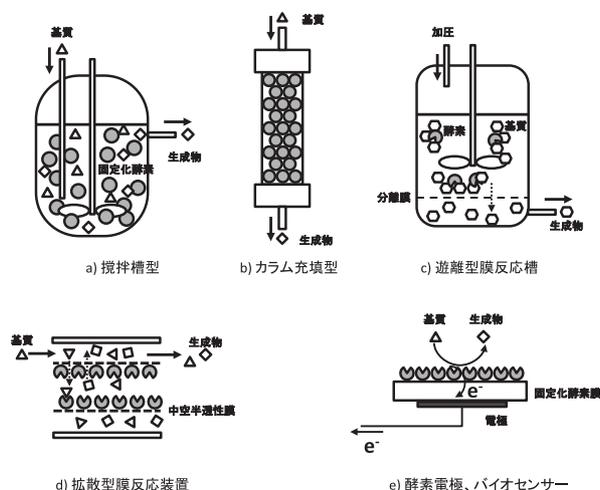


図2. 各種バイオリアクターの模式図

形成可能であることがあげられる。市販されている固定化酵素の多くは粒状であるが、目的により膜状や管状、基盤固定型など、さまざまな形態で利用される。また反応槽（バイオリアクター）についても、さまざまな方式のものが用いられている。代表的なものを図2に示す。

カラム充填型は固定化酵素の高密度充填が可能のため容積あたりの生産性が高いこと、生成物が速やかに除かれることから生成物障害が起りにくいなど攪拌槽型より有利な点がある。このためもっとも広く利用されている反応形態であろう。遊離型膜反応槽は、限外濾過膜や精密濾過膜を反応系に組み込むことにより生成物を連続的に分離可能である。とくに高分子基質から低分子化合物を生産する場合に有効であり、サイクロデキストリンの生産などに利用されている。拡散型膜反応装置は中空性の半透膜内に酵素を固定化し、膜の外側に基質溶液を流す。濃度勾配による拡散により膜内へ基質が移動し、生成物に変換された後再び膜外へと移動する。また、この系を用いた二相系反応も研究されている。この場合は、膜面の片側に有機溶媒を、反対側に緩衝液を流し酵素反応を行う。基質および生成物は各液相へ溶解性に応じて分配され分離される。

固定化酵素・細胞の利用例

有機合成、酵素生産、食品加工、バイオセンサーなどの分析デバイス、医療デバイス、環境浄化などさまざまな分野において固定化酵素や固定化細胞の利用が研究されており、枚挙に暇がない。表1に実用化例の一部を示す。固定化酵素の工業利用の代表例としては、アミノアシラーゼを利用したL-アミノ酸の工業的製造法であろう。1969年に田辺製薬株式会社（当時）が世界で初め

表1. 固定化酵素実用化例

固定化酵素	生産物
アミノアシラーゼ	L-アミノ酸
グルコースイソメラーゼ	異性化糖
アスパルターゼ	L-アスパラギン酸
ペニシリンアミラーゼ	6-アミノペニシラン酸
フマルラーゼ	L-リンゴ酸
ラクターゼ	低乳糖ミルク
シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	シクロデキストリン
L-アスパラギン酸デカルボキシラーゼ	L-アラニン
ニトリルヒドラーターゼ	アクリルアミド
α-グルコシルトランスフェラーゼ	パラチノース
リパーゼ	カカオバター様油脂
リパーゼ	ジルチアゼム中間体
マルトオリゴ糖生成酵素	マルトオリゴ糖
ラクトナーゼ	D-パンテラクトン
D-プシコース3-エピメラーゼ	プシコース
グルコースオキシダーゼ	グルコースセンサー
プロテアーゼ	エアコンフィルター

て実用化し、メチオニン、フェニルアラニン、バリンなどの生産に利用して以来、さまざまな化合物生産に利用されてきた。変わった利用法としては、エアコンフィルターの繊維上に耐熱性プロテアーゼを固定化し、アレルゲン物質の分解機能を付与したものなども見られる。また近年、3Dプリンタの“インク”に細胞を混ぜ、立体的な構造物を造形する研究も進んでいる¹⁰⁾。この時種類の異なる細胞を任意の位置にプリント・配置することにより、生体組織のように複雑な構造体を作ることも可能である。将来的には人工臓器などの開発に应用されると考えられるが、これも一種の固定化細胞と言えるだろう。

最後に

本稿では酵素や細胞の固定化技術およびその応用について概説した。「固定化」と一口では言ってもさまざまな手法および形態があり、利用目的に最適な固定化方法を選択する必要がある。また、酵素には常に「失活」というリスクが存在することから、選択した固定化方法および運用形態が酵素の失活を招くことがないように留意すべきである。これらの条件さえクリアできれば、固定化酵素・固定化細胞はその耐久性や経済性、また加工形成の自由度など享受できるメリットは大きい。近年の微細

加工技術の発達なども併せ、今後はより複雑な構造や複合酵素系を持つ「固定化酵素デバイス」の開発も進んでいくと期待される。

文 献

- 1) Nelson, J. M. and Griffin, E. G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 1109 (1916).
- 2) Sumner, J. B.: *Science*, **108**, 410 (1948).
- 3) Grubhofer, N. and Schleith, L.: *Naturwissenschaften*, **40**, 508 (1953).
- 4) 千畑一郎 編集：固定化酵素，講談社 (1975).
- 5) 高橋治雄ら：豊田中央研究所R&Dレビュー，**36**, 57 (2001).
- 6) Taniguchi, K. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **96**, 1023 (2007).
- 7) Murai, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1362 (1997).
- 8) 坪井泰之：酵素開発・利用の最新技術，P. 253，シーエムシー出版 (2006).
- 9) Itoh, N. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1249 (2007).
- 10) Sakai, S. *et al.*: *Macromol. Rapid Commun.*, **39**, 1700534 (2017).