

**2S2p06 耐熱性ポリリン酸キナーゼを用いたリン酸化合物生産のプラットフォーム構築**○黒田 章夫, 廣田 隆一  
(広大院・先端研・生命機能)

リンは有限の地下資源であり、石油と同じように枯渇する資源である。持続可能な社会を構築するためには我々の使ったリンを回収しなければならない。我々はバイオマス、特に汚泥からのリン回収について検討してきた。リン蓄積汚泥にはポリリン酸が蓄積し、それを穏和な加熱で溶出して回収することが出来ることがわかった。一方このポリリン酸はATPと等価のリン酸ジエステル結合からなる化合物であり、そのままリンとして利用するにはもったいない。「骨までしゃぶる新技術」として、ポリリン酸を有効利用する技術についてお話ししたい。ここでは、高温でのポリリン酸によるATP再生系をうまく組み入れることによって、リン酸化合物生産のプラットフォームを構築できることを紹介する。最後に、我々の夢として、直接ポリリン酸を利用する酵素を新たに創成し、ATP再生反応を必要としないリン酸化合物生産系を構築しようとする試みを紹介する。

生体内のATPを利用したリン酸化反応は、産業的に有用な物質生産のバイオプロセスとして注目されているものも存在する。しかしながら、ATPは高価であるうえに、高濃度のATPをそのまま基質として用いると、キナーゼの反応を阻害する場合がある。この問題を解決する手法として、ATP再生系が用いられる。これまでに、いくつかATP再生方法が報告されているが、いずれのリン酸ドナーもATP同様にコストがかかる。そこで、安価なポリリン酸を用いた ATP 再生系が開発されている。ポリリン酸キナーゼ (PPK) はATPの $\gamma$ 位のリン酸を可逆的にポリリン酸に転移させる酵素であり、ポリリン酸によるATP再生系に使われる。

我々は、耐熱性 PPK を発現する大腸菌を利用した ATP 再生系の構築を行った。高温で膜透過性を上げることによって、外から加えたポリリン酸とADPからATPを合成した。この反応系と同様に耐熱性のリン酸化酵素を組み合わせることで、コストの安いポリリン酸をリン酸ドナーとして用いることができる。ここでは、耐熱性のフルクトースキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼを共役させ、ポリリン酸とフルクトースからフルクトース 1,6-ビスリン酸(FBP)を合成する系を紹介する。

一方ポリリン酸を直接利用できれば、さらにプロセスは簡単になる。一部の微生物はポリリン酸をリン酸化の基質として利用する酵素を持つ。これまで、ポリリン酸と ATP の両方を利用するグルコマンノキナーゼ (ATP/polyP-GK) の構造が京都大学の村田らのグループにより明らかにされている。我々はATPを利用せず、ポリリン酸のみをリン酸化の基質として利用するポリリン酸グルコキナーゼ(PolyP-GK)を発見していた。ある仮説によると、PolyP-GKはATPとポリリン酸の両方を利用するATP/polyP-GKへと進化し、さらにATPのみを利用するグルコキナーゼ(ATP-GK)に進化したのではないかと考えられている。そこで、PolyP-GKの結晶を取得し、広島大学片柳准教授と共同で構造解析を行った。PolyP-GKには特徴的なポリリン酸結合部位と考えられる領域が存在し、そこを基点としてプロセッシングな反応が進むと考えられた。PolyP-GKとATP/polyP-GKの構造を比較したところ、この領域が消失し、おそらくこれによりATPが利用可能になったのではないかと推定できた。さらにATP-GKへと変化する際にはアデノシン認識部位が追加された。これが立体障害となってポリリン酸を利用できなくなっていると考えられた。またその原理に基づいて、ATP利用酵素をポリリン酸利用酵素に改変させることができれば、上記のようなATP再生系を経ることなく、狙ったリン酸化反応を直接ポリリン酸によって行えることが可能になると考えられた。

**Platform for phosphate compound production by means of thermostable polyphosphate kinase**○Akio KURODA, Ryuichi HIROTA  
(Dept. Mol. Biotech., Hiroshima Univ.)**Key words** polyphosphate, phosphate resource, ATP, regeneration**3S2a01 膜利用バイオプロセスによる効率的な発酵システムの開発**○山田 勝成, 澤井 秀樹, 耳塚 孝, 澤井 健司, 峯岸 進一,  
米原 徹  
(東レ・先端研)

枯渇が懸念される石油資源の節約や二酸化炭素排出の抑制のために、カーボンニュートラルな素材が望まれており、微生物によるバイオマスからのポリマー原料合成は、環境にやさしい技術であるため世界的に注目されている。微生物を用いた発酵技術により、ポリマーの原料となる有機酸、アルコールなどが発酵生産できることは従来から知られているが、低コストで高純度な重合グレードのモノマー製造のためには、生産効率の飛躍的な向上が望まれている。我々は、高分子分離膜技術と発酵技術を融合した膜利用高効率連続発酵リアクターと膜利用精製技術からなる膜利用バイオプロセスによって高効率な発酵基盤技術の創出に取り組んでいる。

膜利用高効率連続発酵リアクターでは、蒸気滅菌可能な精密ろ過膜 (MF 膜) を用いることで、微生物を発酵リアクター内に高密度に保持しながら連続発酵が可能な基本技術を確立し、微生物による物質生産を、従来の5倍以上の生産速度で数週間以上連続的に継続させることが可能となっている。ここでは、活性汚泥ろ過に使用可能な目詰まりの少ない低ファウリング性MF膜技術と発酵条件の設定がキー技術である。

発酵における生産効率の向上において、培養液からの目的生産物の分離・精製も重要な課題である。発酵は、化学合成に比べて生成物の濃度が低いため、水の濃縮コストが負担となる。また、培地や微生物に由来する不特定で構造の複雑な不純物が含まれることが多く、目的生産物の物性によっては煩雑な精製方法が必要となるケースがある。我々が取り組んでいる膜利用精製技術では、海水淡水化、浄水処理など幅広い分野の水処理用途に開発したナノフィルトレーション膜 (NF膜)、逆浸透膜 (RO膜) を利用して、低エネルギーかつ低コストな精製プロセスの開発を目指している。今回の発表では、膜利用高効率連続発酵リアクター技術と膜利用精製技術を組み合わせた膜利用バイオプロセスの検討状況について、ビルビン酸発酵を中心に紹介すると共に今後の課題についても触れる。

**Development for highly effective fermentation system by membrane-integrated bioprocess**○Katsushige YAMADA, Hideki SAWAI, Takashi MIMITSUKA,  
Kenji SAWAI, Shinichi MINEGISHI, Tetsu YONEHARA  
(New Frontiers Res. Lab., Toray Ind., Inc.)**Key words** fermentation, membrane reactor, purification, pyruvic acid