細胞工学のダウンストリーム —新しい細胞破碎法—

大陽酸素(株)技術研究所 大森良幸

遺伝子工学の発展に伴い人類にとって特定の有用物質を選択的にしかも大量に生産し得るように形質転換させた細胞が数多く世に現れてきた。次のプロセスとして、これら有用物質をできる限り生体内に存在する状態のまま変性させず、効率的に取り出すことが重要な課題となる。対象となる目的物質は、酵素をはじめ、タンパク質、核酸、脂質、オルガネラ、生理活性物質など多岐にわたり、それぞれの抽出に対応する様々な破碎法があり、目的に合う最良の方法を選択しなければならない。

細胞を破碎する方法には、化学的、生化学的な作用によって破碎する方法と、機械的、または物理的エネルギーを加えて破碎する機械的破碎法と、この二つを併用した複合破碎法に大別できる。化学的、生化学的に破碎する方法には、低イオン強度による浸透圧ショック、酸・アルカリ処理による抽出、キレート化合物添加による抽出、有機溶媒抽出、界面活性剤による抽出などがありこれらの方法は、至適条件をうまく設定すれば、目的物質のみを選択的に抽出し得る特徴を持ち、大量処理も可能となるが、適用できるものが限られ必ずしもその抽出効果は高いとはいえない。細胞壁を細胞壁分解酵素にて溶解させ、浸透圧ショックによって破碎する方法もあるが、添加物を取り除く必要がある場合は操作を複雑化させることになる。

これに対して、機械的に破碎する方法としては、凍結融解法やガラスビーズ法、ブレンダー法、加圧法、超音波法などと、破碎され易いオルガネラの単離などに用いられる温和な破碎の間隙摩擦法がある。¹⁾

ガラスビーズ法は、粒径 0.1~1 mm 程度のガラスビーズと共に試料を攪拌させその摩擦作用によって細胞を破碎するもので、装置化され連続処理が可能となったものがあり工業的に利用されているが、実験室でよく用いられる乳鉢と手作業による方法では、再現性も悪く小容量の処理しか行えない。この方法は、処理中に生じる発熱のため冷却機構を備えなければならず、また、目的物質がガラスビーズに吸着される量も多く洗い込み操作が必要なうえ試料とガラスビーズを分離しなければならない。加圧法は、試料を 10,000~40,000 psi に加圧した後、ノズルから噴出させ、ノズル通過時のせん断作用と急激な放圧によって破碎する。加圧法により、グラム陰性菌は、1~2回の処理ではほぼ完全に破碎できるが、グラム陽性桿菌、酵母では、数回の処理を要し、グラム陽性球菌、クロレラの破碎は、難しいとされている。超音波法は、超音波照射によって引き起こされる Savitation (空洞現象) によって生じる水流の引き裂き効果で破碎するもので、桿菌は破碎しやすく、球菌は破碎し難いとされ、グラム陰性菌の *Thermus thermophilus*, *E. coli* などは、容易に破碎できるが、*Staphylococcus* がこの方法に強い抵抗性を持つと報告されている。しかしこれらの方法は、目的物質が一定時間連続的、あるいは断続的に強力なエネルギーを受けることになり、冷却機構を備えてはいるものの局所的な発熱は避けられず、また処理中に酸化作用を受ける可能性もある。超音波処理中にフリーラジカルが発生し、DNA が切断を受け、アルコールデヒドロゲナーゼが超音波処理によって失活すると報告されており、またガラスビーズ処理によって、酵母のインペルターゼが20%失活したとも報告されている。

これらの懸念を回避する方法として、最近新しく開発された凍結衝撃破碎法がある。本法は、液体窒素を用いて作り出す -100~-150°C の低温窒素雰囲気中に細胞懸濁液を粒径約 100 μm になるように噴霧し、瞬間的に凍結させた後、強力な窒素ガス圧力で噴射して高速で衝撃板に衝突させて破碎する。²⁾ 低温、窒素雰囲気中での処理を特徴とし、酵母 *Candida tropicalis* の破碎³⁾ では抽出したカタラーゼ活性が、ガラスビーズ法、超音波法に比べて高く検出され、走査型電顕写真によって微細化せずに大きく破碎する特徴が確認され、かつ、ミトコンドリアやRNAの回収も可能である。さらに液体培養した植物継代培養細胞 *Lavandula vera* から、ペルオキシダーゼ活性、クロロフィルが、ガラスビーズ法より高く検出され、葉緑体の回収も可能である。⁴⁾ DNAの回収における溶菌法との比較検討では高い回収率を示し、切断を受けない完全な二重螺旋構造を保持した状態で回収されており、リゾチーム処理と本法の併用で、グラム陽性菌の中でもとくに破碎困難とされるコリネフォーム細菌 *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium vitarium* から高収率でDNAが回収できている。⁵⁾

このように特徴的な破碎効果を持つ凍結衝撃破碎法は、大量処理の検討もなされており、工業規模での破碎にも、今後大いに期待できると考えられる。

1) Hughes, D. E. et al.: *Method in Microbiology*, 5B, 1 (1971).

2) 小池ら: 特開昭63-185371.

3) Omori, Y. et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 52 (1989).

4) Omori, Y. et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 132 (1990).

5) 津村ら: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 651 (1989).