福島大学 共生システム理工学類 分子デザイン科学コース・杉森大助
研究課題：廃棄ニトリルゴムのバイオアップサイクル技術の開発

6. 研究内容及び成果の本文

酵素法による廃棄 NBR のアップサイクル技術の開発を目指し、NBR 分解初発酵素 Nro1 の組換え生産性の向上、Nro1 のアミノ酸置換による活性増強、試験管内人工代謝反応による NBR 分解率および有用物質変換収率の向上に取り組んだ。

まず、様々な組換え生産方法を検討することにより、0.1 mg-protein/L-培養液以下であった生産量を 10 倍以上向上させることを目指した。図 1 に示すように、市販可溶性タグである Triger Factor（TF タグ）を Nro1 の N 末端に融合させることにより、約 1,000 倍にあたる 100 mg-protein/L-培養液の生産量を達成することが可能となった。また、発現条件および菌体破砕条件の検討の結果、NBR の分解収率が少なくとも 45 倍まで増強させることに成功した。

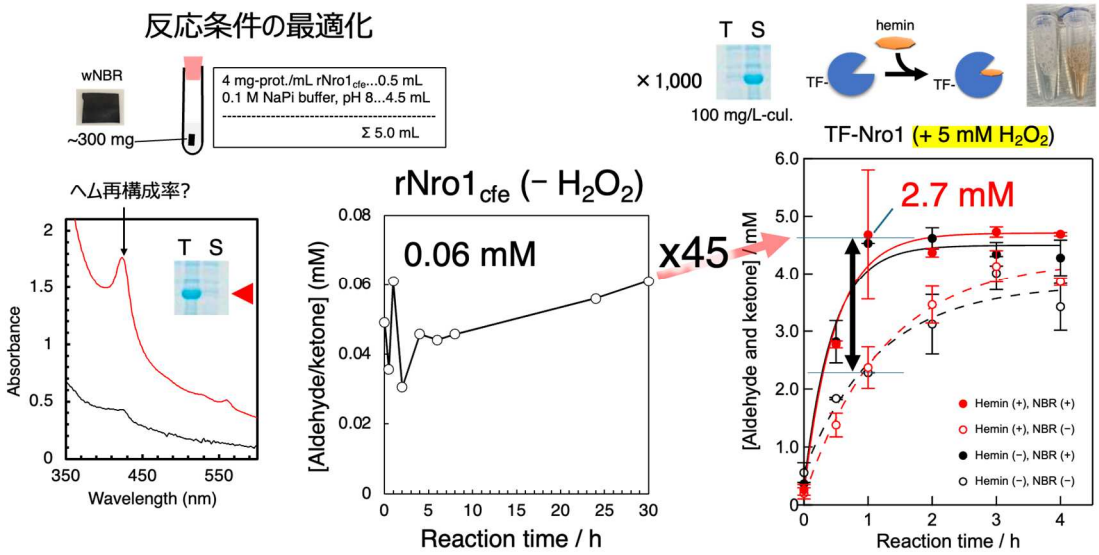


図 1. TF タグ融合発現による Nro1 の異種組換え生産性および反応収率の増強

NBR の酵素分解産物について各種化学分析を行った結果、次世代液状ゴムとして期待されるアルデヒド基およびケトン基を持つ NBR オリゴマーであることを示唆する結果を得た。

Nro1 のアミノ酸置換による改良の結果、点変異体において、活性が約 1.7 倍増加し、5 および 10 置換変異体では反応収率が約 1.5 倍増加した。人工（祖先型）設計 Nro1（24 アミノ酸置換体）では反応収率が約 4 倍まで増強できることを見出した。試験管内人工代謝反応では、2 種類のアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH、GeoB)の併用および逐次添加実験を行った結果、併用により約 4 倍反応収率が増加し、さらに逐次添加反応では反応収率が約 10 倍向上した（図 2)。

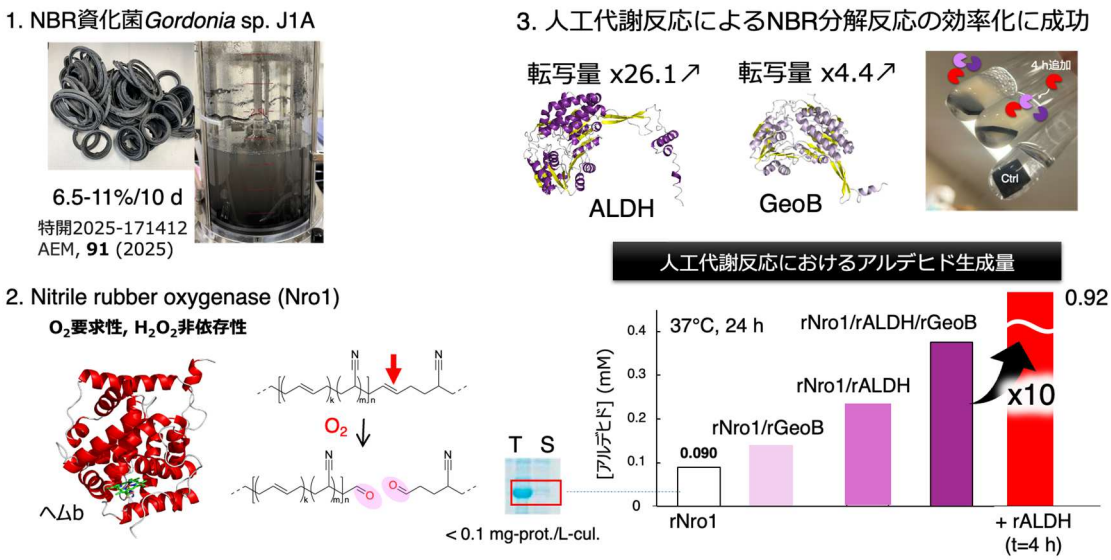


図 2. 2 種類のアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH、GeoB)の併用および逐次添加実験による反応収率の向上