

タンパク質工学を利用してした産業用酵素の開発



ノボザイムズ ジャパン株式会社 松井知子

はじめに

自然界には、様々な機能を持つ酵素が存在し、比較的容易に目的とする反応を触媒する酵素を取得することができる。自然界に存在しない化合物を基質とした反応を触媒する酵素ですら発見されることがある。しかし、産業用酵素としては、目的とする触媒機能だけではなく、実際のプロセスの条件(pH、温度等)に適した酵素であることが求められる。また、長い貯蔵安定性等も産業用酵素の重要な要件の一つである。これらすべての要件を満たした酵素を自然界から得ることは難しく、最近ではタンパク質工学を利用して酵素を改变することによって足りない要件を満たすことが日常的に行われている。

以下に、筆者らが中心となり、タンパク質工学の手法を利用した酵素開発の例をいくつか紹介する。

1. アスパラギナーゼによるアクリルアミドの低減

2002年にスウェーデン食糧庁とストックホルム大学によって、澱粉等の炭水化物が多く含まれる食材の高温加熱加工の際に、アクリルアミドが生成することが発見された¹⁾。アクリルアミドは、グルコース等の還元糖とアスパラギンからアミノカルボニル反応(メイラード反応)によって生成されるのが主な経路と考えられている。そこで、弊社では *Aspergillus* 由来のアスパラギナーゼを用い、食品中のアスパラギンのアスパラギン酸への脱アミド化によって、原因物質のひとつであるアスパラギンを低減することを目的としたアスパラギナーゼ製剤「アクリルアウェイ」を開発した(図1)。本製剤を生地に添加しアスパラギンを減少させた後に焼成することにより高温で加工製造される(ビスケットやトルティーヤ、成型ポテトチップスなど)の食感・外観を損なうことなく、アクリルアミドの生成を抑制することが可能になった。この製剤の用途を広げるために、タンパク質工学によるアスパラギナーゼの耐熱化を行った。変異導入箇所を、酵素分子のモデリングなどにより特定し、アスパラギナーゼ遺伝子の変異体ライブラリーを酵母を利用して作製

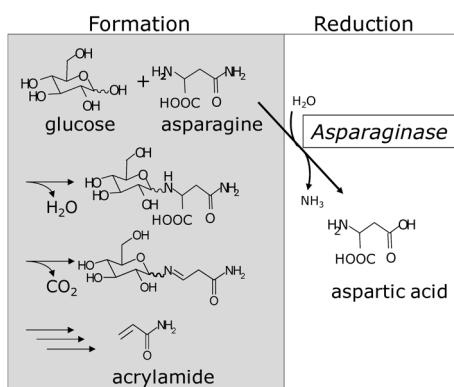


図1. アクリルアミド生成過程の一経路(左)とアスパラギナーゼによるアクリルアミド低減のメカニズム

し、MTP(microtiter plate)によるスクリーニングを行い、高温での活性・耐性がともに上昇した変異体を取得した。

これにより、高温でのプランチング処理が行われるフレンチフライ等へのアスパラギナーゼの効率的な応用の可能性が広がっている。

2. 飼料用フィターゼの開発

穀物中の有機リンはフィチン酸の形態で貯蔵されているが、これは難消化性であるため別に飼料として無機リンを添加する必要がある。また、フィチン酸はカルシウム等の2価金属イオンと結合するため、これらの腸内での吸収を妨げる。フィターゼは、このフィチン態ことによりカルシウムの吸収を促進させる。排泄物の富リン化や狂牛病の問題のため無機リン、肉骨粉利用が減少・廃止される中、この10年ほどの間に、家畜飼料へのフィターゼ配合は飛躍的に增加了。弊社では、担子菌 *Peniophora lycii* 由来フィターゼを発見し、製品化に至っている。

このフィターゼの熱安定性ならびにさらなる貯蔵安定性の向上をめざし、蛋白質工学による耐熱化を行った。酵素分子の Molecular Dynamics Simulation 法などの手法を用い、ターゲット部位を決定、ライブラリーを構築しスクリーニングを進めていった結果、最終的に熱変性温度が酸性中性両 pHにおいて 20°C 以上上昇した変異体が取得された(表1)。実際にこれらの変異体は、貯蔵安定性等が増加したことが確認されている。

また、飼料製造には、ペレット化工程(殺菌と穀物澱粉の糊化のための短時間スチーム処理)を含む場合が多く、飼料用酵素はペレット化工程中に熱により失活する危険性がある。そこで、弊社では CT 顆粒(コーティングした耐熱性顆粒)を開発、フィターゼに応用し、ペレット化工程で失活せず優れた熱安定性を保持している酵素顆粒製剤を製造しているが、このペレット化工程でのさらなるフィターゼの安定性を得るために、筆者らは *Citrobacter braakii* 由来のフィターゼのタンパク質工学による耐熱化も行った。Molecular Dynamics Simulation (MD) 法を用い、高温化での酵素分子の動きを予測し分子内 SS 結合を導入できる場所を探した。温度変化により大きく構造が変化する部位を同定し、変異を導入したところ(図2)、この分子内 SS 結合変異体は、熱変性温度が上昇しているだけでなく、熱変性後のリフォールディング率の向上した変異体であることが確認された。また、ペレット化工程後の安定性向上も確認されている。

表1. DSC による熱変性温度(Td)

精製酵素	Td (°C) at pH2.5	Td (°C) at pH5.5
野生型	36	59
変異体1	60	82

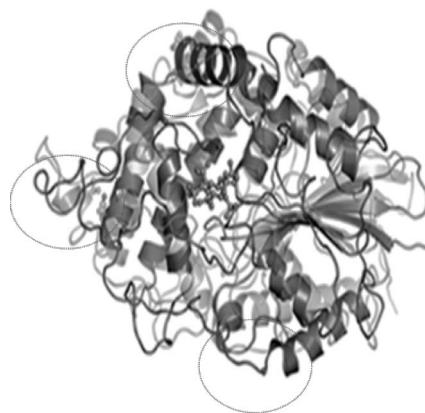


図2. *Citrobacter* フィターゼの 500 K (濃) と 300 K (淡) における MD 予測構造の重ね合わせ
ステイック表示は、フィチン酸、温度変化により大きく構造変化した部分を丸で表示

3. バイオエタノール用アミラーゼの開発

限りある化石エネルギーの代替として燃料用エタノール製造は、ブラジル・アメリカを筆頭に世界的に普及しつつある。原料となるのは、サトウキビ、あるいは、とうもろこしを主とした穀類である。とうもろこしの場合、ミルにて粉碎後、ジェットクッカーあるいは80°C以上の高温で糊化され、バクテリア由来アルファアミラーゼにて液化し、その液化澱粉にグルコアミラーゼなどの酵素製剤を添加しアルコール発酵を行う。これが現在の主流のプロセス(Conventional process)である。

ところが、米国POET社が開発した新プロセスでは、糊化・液化工程を必要とせず、ミル粉碎したとうもろこしを直接一段階にてエタノール発酵を行う。これによりプロセス全体の10-20%ほどかかっていた糊化・液化用エネルギーを削減することができる。また、発酵残渣は飼料として用いられているが、Conventional process のものに比べ、メイラード反応生成物がなくビタミン等豊富なため、付加価値が上がるというメリットがある。しかし、このプロセスでは、生澱粉を分解する必要があり、従来の糊化を含む工程より酵素添加量が非常に多くなってしまい、酵素コストがかかるのがデメリットになっていた。そこで、筆者らは生澱粉に対し非常に特異性の高いアルファアミラーゼをタンパク質工学により開発し、酵素の添加量を顕著に減らすことに成功した(図3)。

4. バイオプラスチック分解促進用酵素の開発

生分解性プラスチックは“グリーンプラ”として各種分野で利用が広まっている。しかし、コンポスト中などの高温下では分解を受けやすいが、実際の土壤中などでは速やかに分解されにくい。そこで、筆者らは酵素を添加することによりその分解を促進させることを試みた。筆者らは以前、ポリエステルの分解を試み、様々な加水分解酵素をスクリーニングし、またその特異性を上昇させるため蛋白質工学も行っている。その時に得られた変異体をPBS(poly (butylene succinate))フィルムの分解に応用させたところ、他の加水分解酵素に比べ、PBSに対して特異性が高いことが判明した。実際に、PBSフィルム断片をこの変異体を含む水溶液中に浸漬し40°Cにて反応させると、4時間後には完全に溶解した。この酵素の実際の応用分野の一つに、畑などに使われる農業用マルチフィルムの分解促進がある。この分野において、作物取り入れ後のフィルムを回

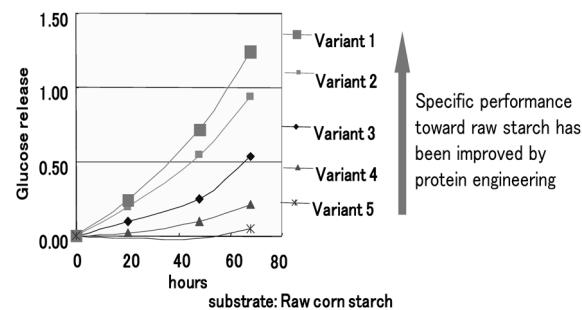


図3. アルファアミラーゼ変異体による生澱粉からのグルコース生成効率の改善
同タンパク量のアルファアミラーゼ変異体と一定のグルコアミラーゼをトウモロコシ生澱粉に作用させ、生成グルコース量を測定

取する手間が要らず、直接トラクターで鋤き込みができる生分解性マルチフィルムの需要が伸びている。この酵素をさらに利用すれば、フィルムの分解がコントロールできるため、作物の取り入れ期の違いによってフィルムを変える必要もなくなる。また、土壤中のシートの切れ端がトラクターに絡まるなどの問題も減少する。実際に市販のPBSフィルムにこの酵素を噴霧したところ、翌日にはシート上に部分分解にて生じた裂け目が観測でき、容易にトラクターにて鋤き込み可能となった。このように、自然界より選び出した酵素のポリエステルに対する基質特異性を向上させ、グリーンプラの分解促進へ応用することに成功した。また、酵素自身は土壤中で分解されるため、環境に影響を与える心配はないという点においても、非常に有用な応用であると考えている

おわりに

近年、ゲノム解析技術の発展とともに利用できる酵素遺伝子情報は膨大に増加しており、DNA合成技術の進歩とともに簡単に遺伝子合成、そしてタンパク質合成が可能となってきている。

しかし、実際に産業用酵素として利用するには、製造時での生産量、安定性、酵素製剤としての安定性、実際の応用条件での酵素のパフォーマンスを始めとして、数多くのハードルを乗り越えなくてはならない。

その際にタンパク質工学は非常に有効な手段であり、各種の変異導入部位選定法、ハイスループットな簡易スクリーニング法と実際の酵素の反応条件に基づいて構築した特異的なスクリーニング方法とのバランスの良い組み合わせにより、必要とされる産業用酵素の開発を迅速かつ的確に遂行することが可能となるであろう。

(引用文献)

- Donald S. Mottram, Bronislaw L. Wedzicha and Andrew T., Dodson Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, Vol. 419, p. 448-449, (2002)
- 松井知子 タンパク質工学・進化分子工学を利用した産業用酵素の開発、生物工学会誌, 85(9), p. 393-408, (2007)

謝 辞 ここにおける研究は、ノボザイムズ ジャパンならびにノボザイムズ デンマーク本社 ノボザイムズ ノースアメリカにて 福山志朗、綾部圭一、倉方悠馬、富木亜紀、平山恵都子、Lars K. Skov, Allan Nørgaard, Allan Svendsen他多くの同僚とともに行った仕事、成果です。改めて、研究開発にかかわったすべての皆様に心から感謝申し上げます。