

## 高次構造情報などを基にした有機溶媒耐性酵素の改変

(阪府大院工) ○ 荻野 博 康\*

## 【はじめに】

機能性製品や医薬品等のファインケミカル製品の多くは複雑な構造をしており、難水溶性であるため、ファインケミカル製品の製造時の溶媒として有機溶媒が用いられる。また、ファインケミカル製品は極めて純度の高いものが必要とされ、製造に消費される資源・エネルギーの量や排出される廃棄物量は莫大である。

酵素は常温・常圧、中性の水溶液中で触媒機能を発揮し、決まった反応を進行させる基質特異性や反応選択性が高い。そのため、ファインケミカル製品の製造プロセスの触媒として酵素を用いると、省資源・省エネルギーでしかも環境負荷の少ない環境調和型物質生産プロセスの構築が可能となる。しかし、ファインケミカル製品の製造の触媒としては、有機溶媒存在下でも失活しない有機溶媒耐性酵素が必要となる<sup>1-3)</sup>。

## 【有機溶媒耐性酵素を生産する有機溶媒耐性微生物】

有機溶媒存在下でも失活しない酵素を効率よく見つけ出すために、有機溶媒耐性酵素を生産する有機溶媒耐性微生物の取得を試みた。その結果、有機溶媒耐性リパーゼを生産する *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 株<sup>4)</sup>、有機溶媒耐性プロテアーゼを生産する *P. aeruginosa* PST-01 株<sup>5)</sup> を取得した。これらの微生物は有機溶媒存在下でも良好に生育し、有機溶媒耐性酵素を生産するため有機溶媒存在下での微生物反応にも有用である<sup>6)</sup>。

## 【有機溶媒耐性微生物が産生する有機溶媒耐性酵素】

*P. aeruginosa* LST-03 株が産生するリパーゼ (LST-03 リパーゼ) を精製し、有機溶媒耐性や有機溶媒存在下での活性を調べたところ、本酵素はジメチルスルホキシド等の極性有機溶媒やデカン等の非極性有機溶媒存在したでも高い活性を保持していた<sup>7)</sup>。また、本酵素の遺伝子をクローニングしたところ、本リパーゼ遺伝子の下流にはリパーゼ特異的分子シャペロンの遺伝子が存在していた<sup>8)</sup>。本リパーゼのシグナル配列を削除し、大腸菌で発現させると、封入体を形成し、多量発現が達成できた。封入体は細胞破砕液から遠心分離等で容易に回収でき、純度は 85%以上であった。この封入体は尿素等のタンパク質変性剤で可溶化でき、さらに先のリパーゼ特異的分子シャペロンが作用すると、容易に活性化することが可能であった<sup>9)</sup>。特に、可溶化、リパーゼ特異的分子シャペロンによる活性化を行った後に、カルシウムイオンを添加すると、高い比活性を有する酵素を作成することができた。

一方、*P. aeruginosa* PST-01 株が産生するプロテアーゼ (PST-01 プロテアーゼ) の 30°C、水溶液中での活性の半減期は 9.7 日であったのに対し、種々の有機溶媒を添加したときの半減期は 9.7 日以上であり、有機溶媒が存在した

方が安定性に優れていた。また、本プロテアーゼはサーモライシン、ズブチリシン、および  $\alpha$ -キモトリプシンより概して有機溶媒存在下での安定性に優れていた<sup>10)</sup>。

## 【有機溶媒耐性酵素の特徴】

種々の酵素の有機溶媒存在下での構造変化を調べたところ、有機溶媒耐性酵素は有機溶媒存在下でもほとんど構造が変化しなかった。また、 $\alpha$ ヘリックスの割合が比較的高く、 $\beta$ シートの割合が低いために有機溶媒存在下での構造安定性に優れていることが示唆された<sup>11)</sup>。

また、ジスルフィド結合は酵素の有機溶媒耐性に重要な役割を担っていることが部位特異的変異誘発により明らかとなった<sup>12)</sup>。

さらに、分子進化工学的手法より有機溶媒耐性が異なる変異酵素の取得を試みたところ、溶媒に接する酵素表面に存在するアミノ酸残基は酵素の有機溶媒耐性にとって重要であり<sup>13)</sup>、有機溶媒耐性が向上した変異酵素ではいくつかのアミノ酸が塩基性にシフトしており、塩橋や水素結合の形成により高次構造が安定化されていた<sup>14)</sup>。

## 【有機溶媒耐性酵素を基にした新規酵素の開発】

有機溶媒耐性酵素の基質特異性、あるいは活性を向上させることにより新規な有機溶媒耐性酵素が作成可能である。例えば、PST-01 プロテアーゼは有機溶媒存在下でも高い安定性を示し、ペプチド合成反応を触媒した<sup>15-17)</sup>。しかし、アスパルテーム前駆体合成活性はサーモライシンより低い<sup>18)</sup>。PST-01 プロテアーゼの活性中心付近のアミノ酸を置換することにより、10 倍高活性化したアスパルテーム前駆体合成酵素の開発に成功した<sup>19)</sup>。

## 【引用文献】

- 1) H. Ogino and H. Ishikawa, *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 109-116 (2001).
- 2) H. Ogino, *Protein Adaptation in Extremophiles*, Nova Science Publishers, pp. 193-236 (2008).
- 3) N. Doukyu and H. Ogino, *Biochem. Eng. J.* (2010) in press.
- 4) H. Ogino et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3884-3886 (1994).
- 5) H. Ogino et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4258-4262 (1995).
- 6) H. Ogino et al., *Biochem. Eng. J.*, **4**, 1-6 (1999).
- 7) H. Ogino et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 451-457 (2000).
- 8) H. Ogino et al., *Extremophiles*, **11**, 809-817 (2007).
- 9) H. Ogino et al., *Biochem. Eng. J.*, **40**, 507-511 (2008).
- 10) H. Ogino et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 61-68 (1999).
- 11) H. Ogino et al., *Biotechnol. Prog.*, **23**, 155-161 (2007).
- 12) H. Ogino et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 942-947 (2001).
- 13) H. Ogino et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 1028-1033 (2007).
- 14) T. Kawata and H. Ogino, *Biotechnol. Prog.*, **25**, 1605-1611 (2009).
- 15) H. Ogino et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 513-518 (1999).
- 16) H. Ogino et al., *Biochem. Eng. J.*, **5**, 219-223 (2000).
- 17) I. M. Bobe et al., *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 365-373 (2004).
- 18) S. Tsuchiyama et al., *Biotechnol. Prog.*, **23**, 820-823 (2007).
- 19) H. Ogino et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, (2010) in press.

\*ogino@chemeng.osakafu-u.ac.jp