

# 酵素の誘導體

大阪大学工学部 ト 部 格

## 1. はじめに

酵素とは生体が生産する触媒である。生物は酵素の有機的な集合体であると考えられることができる。酵素は常温常圧で強い触媒作用を行うことができ、反応および基質の種類が厳格に決っており(酵素の特異性)、可逆的な活性化、不活性化を通じて制御を受ける場合もある。このような他の触媒には見られない酵素特有の性質は、生命体にとっての必要条件なのである。人間は酵素の存在を知って以来、そのすぐれた触媒活性を自由に駆使したいという夢を描いてきた。そして現在米国では、年間500トンの酵素が洗剤以外の用途のために生産されており、その市場価値は約4千万ドルといわれている<sup>1)</sup>。しかし、種類のにはそれもほんの限られたものに過ぎず、またその触媒能力が十分に活用されている例も稀であろう。

我々がまだ酵素を自由に使いこなせていないということは、酵素が生体にとって都合よく設計されているものであって、必ずしも人間にとって都合よくできているわけではないという点に原因があるように思われる。酵素はその置かれた環境に非常に敏感である。酵素の安定性や触媒活性は、環境条件により大きく変化する。そのため酵素は取扱いにくく、苦労して取出してもすぐ失活してしまうことも珍しくない。また生体内では、酵素は繰返し使用されているはずであるが、我々が普通の溶液反応として用いると1回しか使用できず、その利用効率は極めて悪い。したがって、天然の酵素を何らかの方法でその誘導體とすることにより、人間にとって都合のよい酵素に、つまり安定な酵素、繰返

し使用できる酵素、生体内とは異なった条件下でも反応しうる酵素、新しい活性を持った酵素などに自由に変換しうるなら、酵素の利用価値は飛躍的に増大するであろう。

酵素の誘導體に関する研究は、主として酵素の活性発現に対するアミノ酸残基の役割を明らかにする目的で行われてきた。したがって、活性中心に関する情報は相当量蓄積されているが、それ以外の部分のアミノ酸残基の役割に関してはまだほとんど不明のままである。しかし、酵素をもっと使いやすい形に変換する目的で誘導體にする場合には、活性中心以外の部分が重要な鍵をにぎっている。本稿ではその点を中心に、ある目的に応じた酵素の誘導體を得るにはどのような方法がよいかという問題について考えたいと思う。

## 2. 酵素誘導體の作り方

酵素の誘導體とは、元の酵素の一次構造を何らかの方法で変化させた酵素である。タンパク質の一次構造を変化させる方法としては、化学的方法(化学修飾法)、遺伝的方法、酵素作用による方法、化学合成による方法が考えられる。また酵素を不溶化する場合には、イオン結合法、物理的吸着法、包括法なども行われているが、これらも一種の酵素誘導體であろう。これらはそれぞれ特徴ある方法で、場合に応じて自由に使いこなすことが必要であるが、ここでは、最も一般的な方法である化学修飾による誘導體の作り方を述べる。

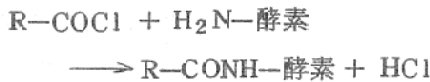
いま、酵素にRなる物質を化学的に結合させたいとする。その場合、一度Rを活性化してそ

の反応性を高めた後、酵素の適当なアミノ酸残基との反応により結合させるのが一般的な手順である。そして、その反応液中からRの結合した酵素を取出し、Rが結合していることの確認を行う。こうしてRの結合した酵素誘導体を得られるのである。タンパク質の化学修飾に関しては多くの文献<sup>2~6)</sup>があるので詳しい議論は省略し、本稿で扱う酵素誘導体を作るのに用いられている代表的な方法のみを以下に述べる。

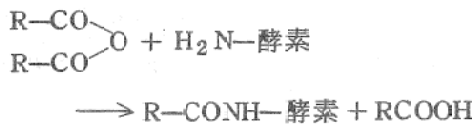
(1) カルボキシル基を持つ物質：R-COOH

脂肪酸、アミノ酸などカルボキシル基を有する物質は数多くあるが、これらを酵素に結合させるには次のような活性型にして反応させる。反応相手の酵素のアミノ酸残基としては、リジンおよびN末端のアミノ基が主である。

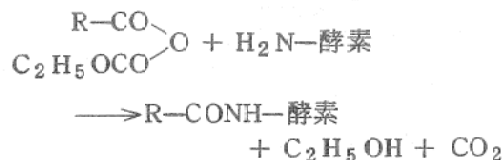
酸塩化物：



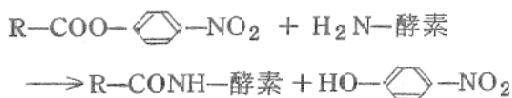
酸無水物：



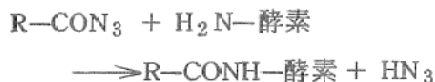
混合酸無水物：



活性エステル：



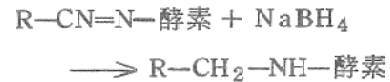
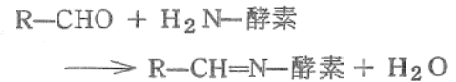
アジド：



(2) アルデヒド基を持つ物質：R-CHO

脂肪族のアルデヒドやケトンは、酵素のアミノ基と可逆的に反応する。この反応の生成物を水素化ホウ素ナトリウムで還元すると、アミノ

基がアルキル化された酵素が得られる。

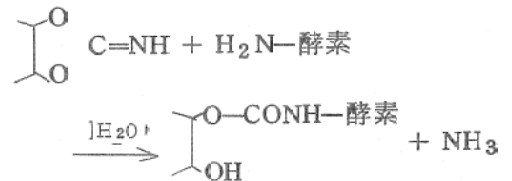
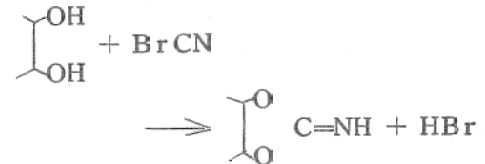


(3) 水酸基を持つ物質：R-OH

アルコール類は、ハロゲン化アルキルまたはハロゲン化アリルとして活性化し、酵素のアミノ基やメルカプト基に結合させることができる。



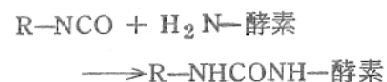
糖類は、臭化シアンで活性化することにより、酵素のアミノ基に結合させる。



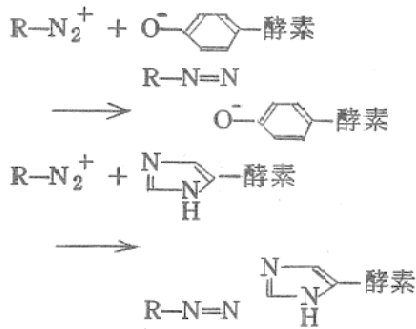
ガラスは、 $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilaneと反応させてその水酸基をアミノプロピル化し、そのアミノ基を更に活性化することにより酵素と結合させることができる。<sup>7)</sup>

(4) アミノ基を持つ物質：R-NH<sub>2</sub>

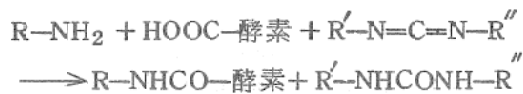
アミン類は、イソシアネートまたはイソチオシアネートとして酵素のアミノ基に結合させることができる。



芳香族アミンは、シアゾ化して酵素のフェニール基やイミダゾル基に結合させることもできる。



脱水縮合剤であるカルボジイミドを用いると、アミンを酵素のカルボキシル基に結合させることができる。



以上、Rなる物質を酵素に結合させ酵素誘導体を作る方法の概略を述べたが、これらは一般に使用できそうな方法のみを選んであるので、酵素の特殊な修飾試薬に関しては上記文献を参照されたい。Rがアミノ酸のように二つ以上の官能基を持つ場合は、反応を限定するために、あらかじめ一方を保護しなければならないこともあるので注意を要する。またRについている官能基は相互に変換が可能であるので、用いる酵素や反応条件に応じて最適の方法を選ぶことも重要である。

### 3. 不溶化酵素

酵素を何度も繰返し使用するには、反応溶液から酵素を容易に分離、回収できるようにしなければならない。この問題は、酵素を水に不溶性の担体に結合させることによりほぼ解決されている。こうして得られた不溶化酵素は、ろ過または遠心分離により回収することができ、またカラムに詰めて連続的に使用することも可能である。

これまでに不溶化された酵素は、プロテアーゼ、アミラーゼなどの加水分解酵素がほとんどで、他にはキナーゼ、脱水素酵素、酸化酵素などが目につく程度である。この傾向は、酵素の

手に入りやすさ、扱いやすさに原因があると思われるので、今後は更に広範囲の酵素が不溶化されるであろう。不溶性の担体としては、セルロース、デキストラン、アガロースなどの多糖類およびそれらの誘導体、アミノ酸の重合体、無水マレイン酸とエチレンの共重合体、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ナイロン、ガラスなどがよく使用されている。これらは主にカラムに詰めて使えるように考えられているが、ポリスチレンやナイロンの場合はチューブにすることができるので、その内壁に酵素を結合し、酵素活性を持ったチューブとして使うこともできる<sup>8,9)</sup>。

不溶化酵素は、実用的な面から基礎的研究に至る幅広い用途を持っている。酵素の工業的利用がこれまであまり行われていなかったのは、酵素が高価な物質であったからであろう。しかし、酵素を不溶化して連続使用ができるになれば酵素の実質的な価格は低下し、更にプロセスの自動化も行えるので、工業的にも十分使用しうるはずである。現在のところまだ実用化された例は少ないが、我が国では不溶化した *aminoacylase* を DL-αアミノ酸の連続光学分割に<sup>10)</sup>、また英国や米国では、不溶化した *penicillina amidase* を天然のペニシリンから合成ペニシリンの原料である β-amino penicillanic acid を作るのに用いている<sup>11)</sup>。不溶化酵素の実用化はこれから急速に増大するであろう。表1に、実用化が考えられている段階のものも含めて工業的に用いられている不溶化酵素とその用途を示す。この表の α-amylase の項にもみられるように、不溶化酵素の利用は工業生産面ばかりでなく廃液処理の面でも研究されている。

酵素の基質特異性を利用した分析化学への応用も盛んに行われている。Hicksら<sup>13)</sup>は、glucose oxidaseあるいはlactic dehydrogenase を不溶化してグルコースあるいは乳酸の

表1 不溶化酵素の工業的利用<sup>12)</sup>

酵 素	担 体	用 途
Amino acid acylase	DEAE-Cellulose	Resolution of DL-amino acids
Penicillin amidase	Triazinyl cellulose	Penicillin modification
Glucoamylase	DEAE-Cellulose, glass	Conversion of starch to dextrose
Glucose isomerase	s-Triazinyl cellulose Polyacrylamide, glass	Glucose syrup manufacture Conversion of glucose to fructose
Steroid-modifying enzymes	Polyacrylamide, glass	Steroid modification
Invertase	DEAE-Cellulose	Hydrolysis of sucrose
Glycolytic enzymes	Polyacrylamide	Production of metabolic intermediates
$\alpha$ -Amlase	Glass	Treatment of white water during paper manufacturing Glucose syrup manufacture
$\alpha$ -Galactosidase	Glass	Removal of flatulence factor from soybean products
$\beta$ -Galactosidase	Cellulose, glass	Hydrolysis of lactose in milk or whey
Proteases	Several	Clarification of beverages
Trypsin	Glass	Increasing shelf-life of milk
Catalase	Glass	Increasing shelf-life of milk
Pepsin	Glass	Cheesemaking

自動定量を行った。Guilbault<sup>14)</sup>は、不溶化 urease を電極の先端につけて尿素の定量を行った。Royer<sup>15)</sup>は、leucine aminopeptidase および aminopeptidase M を不溶化し、タンパク質のN末端の配列順序の決定および全体のアミノ酸組成の決定に有力な武器となることを示した。インシュリンA鎖のN末端配列、Gly-Ileu-Val-Gluが、遊離されてくるアミノ酸の順番として図1にはっきり示されている。またインシュリンA鎖の加水分解率は、表2に示すように93~96%の高収率であった。この方法によれば、塩酸による加水分解に不安定なアミドやトリプトファンなどの定量が行えることが大きな特長である。

医薬品としての不溶化酵素の応用研究も活発に進められている<sup>9,16~18)</sup>。その利用方法としては、代謝系の病気などに対して酵素を生体内に直接投与する方法と、人工肝臓などのような人工臓器として使用する方法とが考えられる。

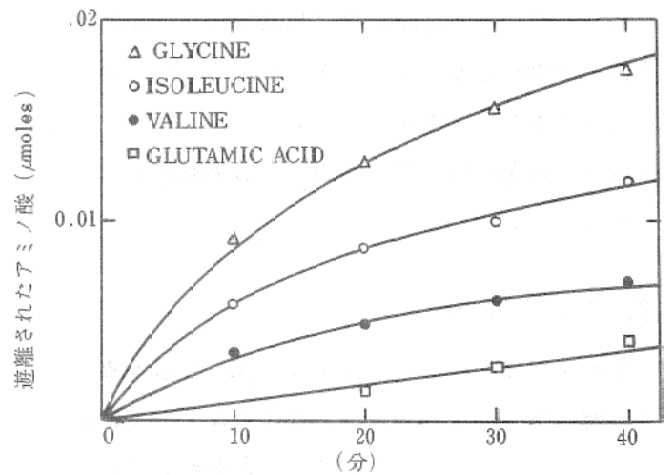


図1 不溶化 aminopeptidase M によるインシュリンA鎖のN末端のアミノ酸配列の測定<sup>15)</sup>

前者の場合は、不溶化することにより、これまで問題となっていた酵素による免疫反応などの副作用を除き、かつ持続性を強めることができるのではないかという点が期待されている。後者の場合は複雑な酵素系を不溶化することになるので、基礎的な段階で解決されるべき問題点

表2 不溶化 leucine aminopeptidase (A欄) および aminopeptidase M (B欄) によるインシュリンA鎖の加水分解<sup>15)</sup>

アミノ酸	1分子当りの残基数	回収率	
		A	B
		%	
Aminoethylcysteine	4	90	93
Serine			
Glutamine	2	100	100
Glycine	1	90	90
Alanine	1	100	100
Valine	2	90	95
Isoleucine	1	90	90
Leucine	2	90	95
Tyrosine	2	100	100
Aspartic acid	0.4	90	103
		平均93	平均96

が多い。

不溶化酵素は、酵素の半永久的使用を可能とすることにより酵素の利用面に新しい道を開いたが、一方では、生体内で酵素がどのように働いているかという点に関して、酵素の性質がその存在する環境や存在状態によってどのような影響を受けるかという問題を考える実験材料を提供した。不溶化による酵素の諸性質の変化に関しては以下の項で述べる。なお、不溶化酵素の製法、性質、利用などに関しては多数の総説<sup>12,19-22)</sup>があるのであわせて参考にしていただきたい。

#### 4. 分子量を大きくした酵素

プロテアーゼやアミラーゼなど高分子基質に作用する酵素では、不溶化によりその酵素活性が大きく低下し、不溶化酵素の問題点の一つになっている。Wykesら<sup>23)</sup>は、不溶化による活性低下を防ぐため、酵素を不溶化せずに連続的に使用する方法を考えた。それは、酵素を可溶性のセルロースやデキストランに結合させてその分子量を大きくし、限外濾過装置を用いて連続酵素反応を行う方法で、これにより50%以上の活性を保持することが可能となった。限外濾過の装置を用いて連続酵素反応を行うには必ずしも酵素の分子量を大きくする必要はないが、このような酵素誘導体とすることにより濾過膜

の穴の大きさを自由に選べることで、酵素の安定性が増大するなど元の酵素よりもすぐれた性質が得られる可能性のある点に特長がある。

#### 5. 活性が上昇した酵素

化学修飾により天然の酵素よりも高い活性を持つ酵素を作りたいというのは古くからの夢であろう。しかし、これまでに得られた酵素誘導体のほとんどが、元より低いかせいぜい同じ程度の活性しか示していない。不溶化酵素の場合では、活性の高いもので元の酵素の50%、数パーセントの活性しか残っていないものも珍しくない。このことは、本来の活性が酵素にとって最大のものであることを示すのかもしれない。

化学修飾により酵素活性が上昇した数少ない例としては、Taka- $\alpha$ -amylase Aをメルカプトナクシニル化すると酵素活性が1.5倍に上昇したという報告<sup>24)</sup>、trypsinをアセチル化すると活性が上昇するという一連の報告<sup>25)</sup>、耐熱性プロテアーゼである thermolysin をその阻害剤の誘導体である  $\beta$ -phenylpropionyl-L-phenylalanine-imidazole ( $\beta$ -PP-IM) でアシル

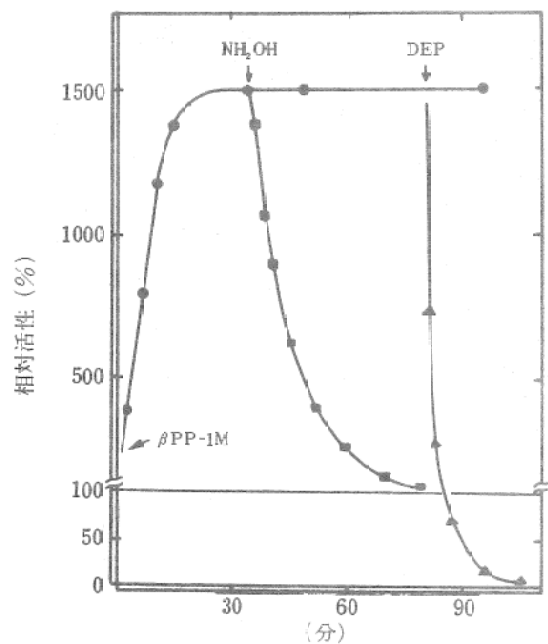


図2  $\beta$ -PP-IMによる thermolysin の可逆的活性化<sup>26)</sup>

化すると、活性が15倍に上昇したという報告<sup>26)</sup>などがあげられる。Thermolysin の場合、その活性化は図2に示すように可逆的で、ヒドロキシルアミンの添加により元の活性にもどった。このような活生の上昇がどのような機構によるものかが明らかになれば、より高い活性を持つ酵素誘導体を作る夢が実現されるかもしれない。

## 6. 特異性が変化した酵素

酵素は一般の触媒とは異なり、その触媒する反応と基質とが厳密に定められている。このような酵素の特異性はその立体構造に由来するものであるため、化学修飾により立体構造が変化すればその特異性にも変化が生じることが期待される。基質に対する特異性は、酵素と基質との親和性を示す定数である  $K_m$  (Michaelis 定数) の値と、触媒反応の速さを示す定数である  $v_m$  (最大反応速度) の値で表わすことができる。良い基質となる物質は酵素と強い親和性があるので小さな  $K_m$  値を示し、また  $v_m$  の値は大きい。基質とならない物質では  $K_m$  の値は無窮大で、 $v_m$  の値はゼロである。小さな  $K_m$  値をもつが  $v_m$  がゼロの物質は阻害剤となる。したがって、ある酵素をその誘導体にしたときの  $K_m$  や  $v_m$  の変化の程度が基質によって異なるなら、それは基質特異性が変化したと考えることができる。

Hatfield ら<sup>27)</sup>は、trypsinのメルカプト基をカルボキシメチル化して得られた S-carboxymethyl trypsin (Cm-trypsin) の活性を元の trypsin と比較した。タンパク質分解活性はカルボキシメチル化により4%に減少するが、分解されたペプチドの種類はほぼ同じであった。しかし表3に示すように、TAMe に対する  $K_m$  が大きく減少する一方、BAA に対する  $K_m$  はほぼ等しく、BAEとTLMeに対する  $K_m$  は大きく増加しており、カルボキシメチル化による基質特異性の変化が示されている。また

表3 S-カルボキシメチル化による trypsin の基質特異性の変化<sup>27)</sup>

基質	$K_m$ (M)		$k_{cat}$ (sec <sup>-1</sup> )	
	Trypsin	Cm-trypsin	Trypsin	Cm-trypsin
TAMe	$1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	100	2.3
BAE	$5.0 \times 10^6$	$5.0 \times 10^5$	28	1.2
TLMe	$4.4 \times 10^5$	$1.8 \times 10^4$	84	5.0
BAA	$2.5 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	0.7	0.015

TAMe :  $\alpha$ -N-tosyl-L-arginine methyl ester

BAE :  $\alpha$ -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester

TLMe :  $\alpha$ -N-tosyl-L-lysine methyl ester

BAA :  $\alpha$ -N-benzoyl-L-argininamide

Sympson ら<sup>28)</sup>は、carboxypeptidase のチロシン残基をアセチル化すると、ペプチダーゼ活性はほぼ完全に失われるが、エステラーゼ活性は逆に上昇したと報告している。

イオン性の担体を用いた不溶化酵素では、イオン性の基質に対する  $K_m$  値が担体と基質との間の静電的相互作用により変化することを、Hornby ら<sup>29)</sup>は示した。表4によれば、酵素が陰イオン性の担体に結合した場合には、陰イオン性の基質に対する  $K_m$  値は増大し、陽イオン性の基質に対する  $K_m$  値は減少している。つまり、担体と基質とが同種の電荷を持てばその間には反発力が働くので、担体に結合した酵素の付近の基質濃度は外部溶液の値よりも小さくなり、みかけ上  $K_m$  が大きくなったと考えられる。そして、担体と基質とが異種の電荷を持てば、逆にみかけの  $K_m$  は小さくなる。このような担体の電荷の影響による特異性の変化の度合は溶液のイオン強度によっても異なり、イオン強度が低いほど大きな変化が得られる。

不溶化されたプロテアーゼでは、低分子基質に対する活性があまり減少していない場合でも、カゼインのような高分子基質に対する活性は非常に小さくなる場合が多い。この現象は、基質が大きくなるにつれて不溶化された酵素分子に近づきにくくなるためであると説明されている<sup>30)</sup>が、これも一種の基質特異性の変化であろう。

$\alpha$ -Amylase によるアミロースの加水分解様式は、図3のように single chain 型、multi-

表4 不溶化酵素の  $K_m$  に対する担体および基質のイオン性の影響<sup>29)</sup>

酵 素	担 体	担体の電 荷	基 質	基質の電 荷	$K_m(M)$
ATP-creatine phosphotransferase	None		ATP	-	$6.5 \times 10^{-7}$
	<i>p</i> -Aminobenzylcellulose	0	ATP	-	$8.0 \times 10^{-4}$
	CM-cellulose-90	-	ATP	-	$7.0 \times 10^{-3}$
Ficin	None		BAEE	+	$2.0 \times 10^{-2}$
	CM-cellulose-70	-	BAEE	+	$2.0 \times 10^{-3}$
Chymotrypsin	None		ATEE	0	$2.7 \times 10^{-4}$
	CM-cellulose-70	-	ATEE	0	$5.6 \times 10^{-4}$
Trypsin	None		BAA	+	$6.8 \times 10^{-3}$
	Maleic acid-ethylene co-polymer	-	BAA	+	$2.0 \times 10^{-4}$
Papain	None		BAEE	+	$1.9 \times 10^{-2}$
	<i>p</i> -Aminophenylalanine-L-leucine co-polymer	0	BAEE	+	元の酵素と同じ

BAEE : N-benzoylarginine ethyl ester

ATEE : N-acetyltyrosine ethyl ester

BAA : N-benzoylargininamide

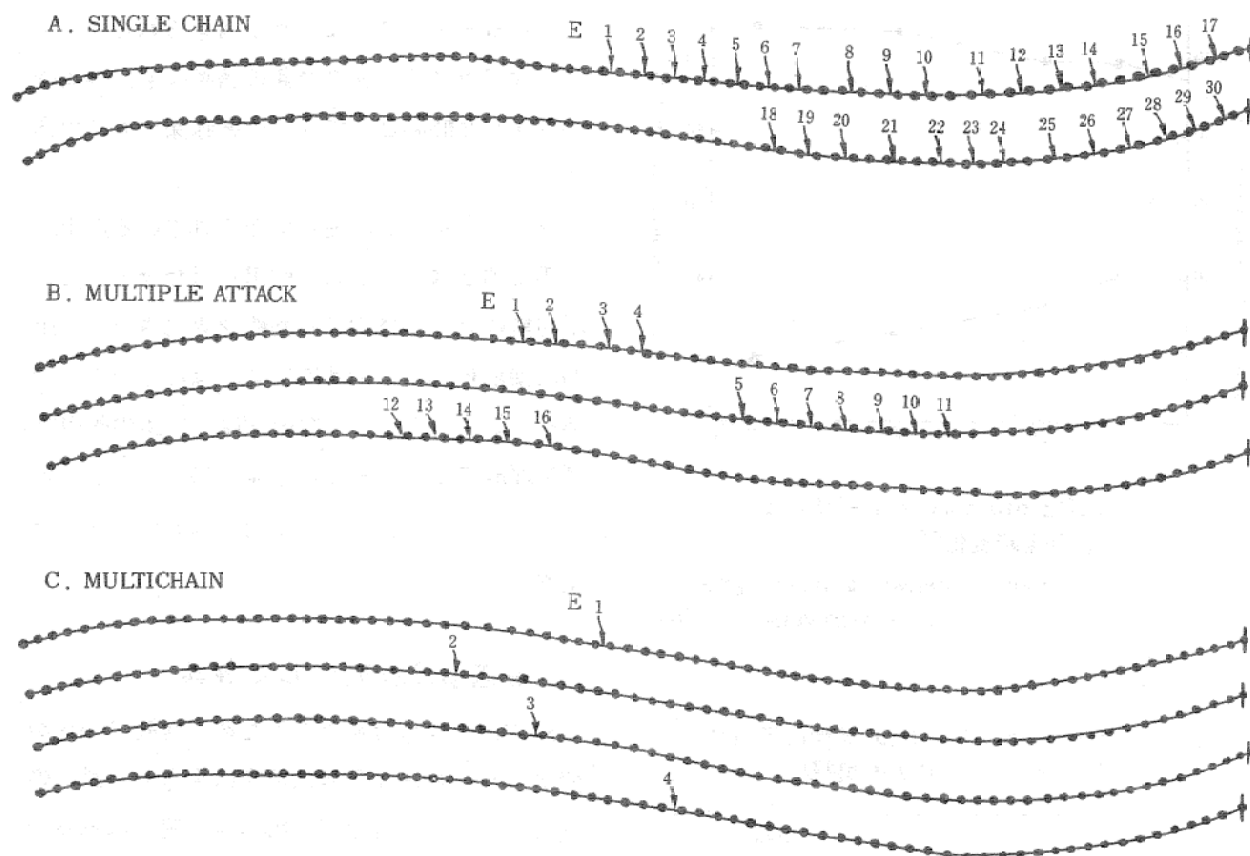


図3  $\alpha$ -Amylase 類によるアミロース分解様式<sup>31)</sup>

● はアミロース中のグルコース単位を、● は還元末端を示す。矢印および数字は、1分子の酵素 (E) による加水分解作用とその順序を示す。

ple attack型、multichain型の3種に大別されている<sup>31)</sup>。枯草菌液化型 $\alpha$ -amylaseはmultichain型の分解様式に属するが、これを不溶化するとmultiple attack型に近づく傾向を示した<sup>32)</sup>。これは、酵素の作用特異性が変化した例であろう。

酵素には、基質との反応に関与している活性中心以外の場所に、ある種の物質(エフェクター)と相互作用を行うエフェクター部位を持っているものもある。このような酵素をアロステリック酵素といい、エフェクターはエフェクター部位に結合して酵素の構造を変化させ、基質との結合や活性に影響を与える。酵素の活性中心を化学修飾するとその活性は全く失われてしまうが、エフェクター部位を修飾した場合には、エフェクターの影響を受けない酵素誘導体が得

られる。Glutamate dehydrogenase (GDH) はこのようなアロステリック酵素の仲間であり、diethylstilbesterol (DES)、グアノシン三リン酸(GTP)、アデノシン二リン酸(ADP)はそのエフェクターである。GDHはX型とY型の2種類の構造をとることができ、X型はglutamate dehydrogenase活性を、Y型はalanine dehydrogenase活性を示す。この酵素にDESやGTPが結合するとY型となり、ADPが結合するとX型になる。Kallosら<sup>33)</sup>は、DESにプロモアセチル基を導入してこの酵素に結合させたところ、図4に示すようにglutamate dehydrogenase活性は20%に減少し、更に表5に示すようにGTPやADPの影響を受けなくなった。つまり、共有結合によりDESが結合したGDH誘導体はその構造がY型に固定されており、アロステリック酵素としての性質を失ってしまったと考えられる。このようなアロステリック酵素の誘導体も、特異性の変化した酵素として非常に興味深いものである。

酵素がある目的に従って作られている以上、その目的とはかけ離れた作用を行わせることは不可能に近く、酵素の特異性を変化させて実用的な要求に応じる段階にはまだほど遠いようである。しかしこのような研究は、酵素の作用機構を理解する上で重要な意味を持っており、新しい酵素を作る鍵もこの中に隠されているはずである。

### 7. 最適pHが変化した酵素

酵素は両性電解質であるため、溶液のpHが酵素活性に及ぼす影響は非常に大きく、最大の活性を与えるpHはごく限られた範囲にあるのが普通であり、そのpHの値はそれぞれの酵素に特有のものである。したがって酵素はその最適pHにおいて使用しなければならないが、その用途によっては最適pHとは離れたpHで使

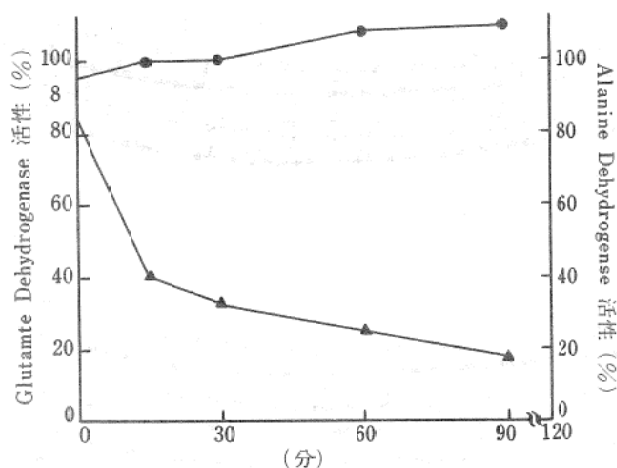


図4 GDHとbromoacetyl-DESとの反応の経時変化<sup>33)</sup>

○ : Alanine dehydrogenase 活性  
△ : Glutamate dehydrogenase 活性

表5 GDHとDES-GDHの活性に及ぼすADPおよびGTPの効果<sup>33)</sup>

酵 素	エフェクター (M)	Alanine 活性 (%)
GDH	----	100
GDH	$5 \times 10^{-5}$ GTP	269
DES-GDH	$5 \times 10^{-5}$ GTP	127
GDH	$1 \times 10^{-4}$ ADP	35
DES-GDH	$1 \times 10^{-4}$ ADP	94



わなければならない場合も多い。そのような場合には、最適 pH が変化した酵素誘導体を使うことができれば非常に好都合であろう。

酵素の最適 pH を変化させる方法として、まず化学修飾により酵素自身のイオン性を変化させることが考えられる。つまり、アミノ基やグアニジノ基の正電荷をなくすかまたは負に変えたり、カルボキシル基の負の電荷をなくすかまたは正に変えることにより酵素の最適 pH が変化することが期待される。そのような化学修飾により最適 pH が変化した例としては次のようなものがある。Trypsin をアセチル化すると、その最適 pH は 9 から 10.5 に上昇した<sup>34)</sup>。Luciferase のアミノ基をナクシニル化すると、最適 pH は約 0.5 上昇した<sup>35)</sup>。Lysozyme のアミノ基をアセチル化すると、グリコールキチンに対する活性の最適 pH は 0.5 上昇した<sup>36)</sup> が、溶菌活性の最適 pH はアセチル化が進むにつれ大きく減少した<sup>37)</sup>。また  $\alpha$ -amylase の pH-活性曲線は、そのアミノ基をパルミチル化するとアルカリ側に移動し、その移動の度合はパルミチル化数が多いほど大きかった(図5)<sup>38)</sup>。以上のような結果より、酵素の正の電荷を減少させるとその最適 pH は上昇すると一般に考えてもよさそうであるが、基質が電荷を持っている場合や、酵素の構造変化が関与する場合は、必ずしもそれだけでは説明できないようであり、更に詳細な研究が必要である。

一方、不溶化酵素で行われているように、イオン性の担体に酵素を結合して酵素のまわりのイオンの環境を変化させる方法によっても酵素の最適 pH を変化させることができる。Goldstein ら<sup>39,21)</sup> は、酵素の最適 pH が陰イオン性の担体に結合した場合には上昇し、陽イオン性の担体に結合した場合には低下することを示した。そして彼らは、このような最適 pH の変化が担体のイオンと水素イオンとの静電的相互作用により生じるみかけの変化であると説明

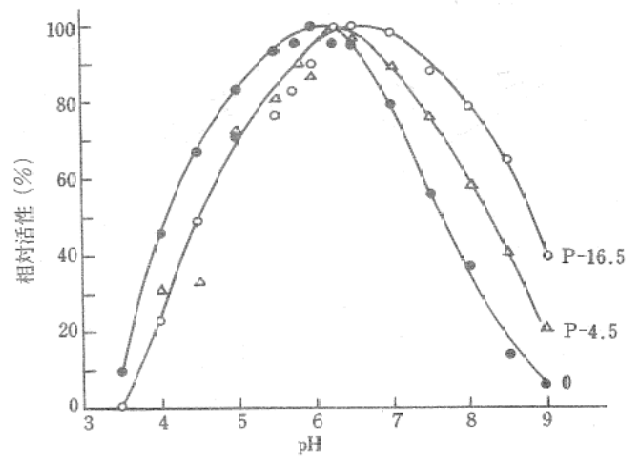


図5 パルミチル化による  $\alpha$ -amylase の pH-活性曲線の変化<sup>38)</sup>

●:元の酵素(○)

△:1分子あたり平均4.5個のアミノ基がパルミチル化された酵素(P-4.5)

○:1分子あたり平均16.5個のアミノ基がパルミチル化された酵素(P-16.5)

した。したがって、イオン性の担体に結合して不溶化することにより酵素の最適 pH を変化させる場合、その変化の度合は溶液のイオン強度が高いほど小さくなることと、基質や反応生成物が電荷を有する場合にはその影響も受けるという点に注意を要する。

## 8. 安定性が増大した酵素

酵素は元来不安定な物質で、温度の上昇、pH の変化、尿素などの変成剤の添加によりすみやかに失活し、低温での保存中にも徐々に失活する。タンパク質の安定性はその立体構造で決められているので、化学修飾によりその安定性を変化させることは可能であるが、より安定な酵素誘導体を得るための方法論はまだ確立されていない。一つの有力な手段として、タンパク質分子内のポリペプチド鎖間に共有結合による架橋を行い、その立体構造を安定化させる方法がある。これは Wold ら<sup>40,41)</sup> により試みられある程度の成功をおさめることができたが、分子内架橋のみを行わしめることは非常にむずかしいようである。

一般の化学修飾により酵素の熱安定性が変化した例は数多く報告されているが、それらの現

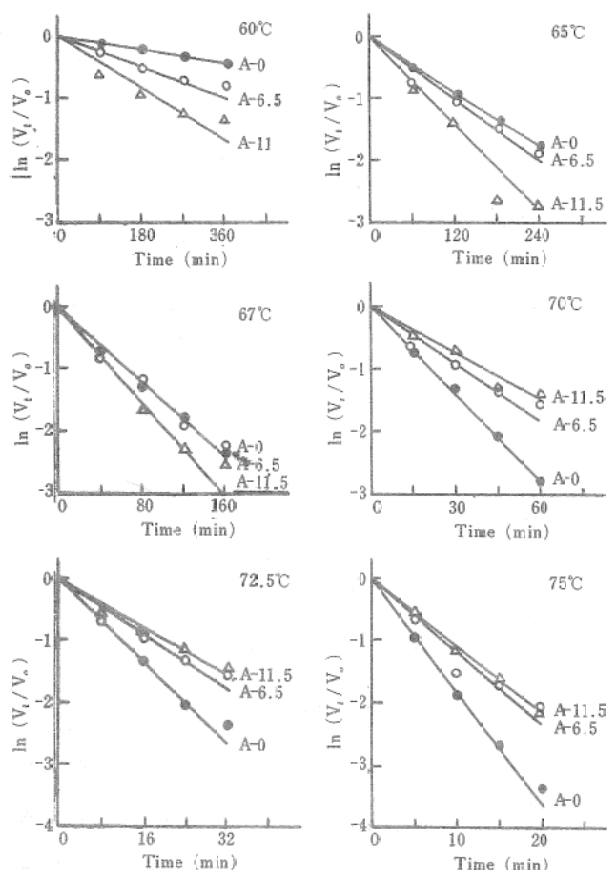


図6 アセチル化  $\alpha$ -amylase の各温度における熱失活の経時変化<sup>42)</sup>

- Vt : 時間 t における残存活性
- Vo : 時間 0 における残存活性
- : 元の酵素 (A-0)
- : 1分子あたり平均 6.5 個のアミノ基がアセチル化された酵素 (A-6.5)
- △ : 1分子あたり平均 11.5 個のアミノ基がアセチル化された酵素 (A-11.5)

表6  $\alpha$ -amylase の熱失活反応の熱力学的パラメーターに及ぼすアセチル化の影響<sup>42)</sup>

酵素	$\Delta H^*$ (kcal/mole)	$\Delta S^*$ (cal/mole deg.)	$\Delta G^*$ (kcal/mole)
A-0	83	168	25
A-1.5	78	153	25
A-6.5	62	107	25
A-9	55	86	25
A-11.5	46	60	25

酵素の記号は、 $\alpha$ -amylase 1分子あたりアセチル化されたアミノ基の平均個数を示している。

象がどのような要因によるものかはほとんど検討されていない。筆者ら<sup>42)</sup>は、 $\alpha$ -amylase の熱安定性が、そのアミノ基をアセチル化することにより 70°C 以上では増大し、67°C 以下では減少するという結果を得た(図6)。そしてこの

現象は、表6に示すように、 $\alpha$ -amylase の熱失活反応の活性化エンタルピー ( $\Delta H^*$ ) および活性化エントロピー ( $\Delta S^*$ ) の値がアセチル化により減少することに由来するものであった。化学修飾による酵素の安定性の変化を検討するにあたっては、このような現象にも十分注意を払わなければならない。

酵素を不溶化するとその酵素の安定性が増大するという報告も数多くある。その要因としては、酵素が担体と結合することによる立体構造の安定化<sup>43)</sup>、プロテアーゼ作用を受けにくくなることによる安定化(特にプロテアーゼを不溶化すると自己消化を防ぐことができる)などがあげられている。また、疎水性の担体よりも親水性の担体に結合させた方が安定であると考えられている。もちろん、不溶化酵素は化学修飾された酵素であるから上述のような化学修飾の影響も受けるであろうし、不溶化により逆に不安定になった例も珍しくないで、これらの経験的な判断だけでは十分な説明を行うことはできない。不溶化酵素においては、その長時間使用のためにも酵素の安定性の問題は特に重要であり、今後は耐熱性酵素や化学修飾を受けた酵素の研究ともあわせ、酵素の安定性を熱力学的数値で定量的に表現してゆかねばならないであろう。

## 9. おわりに

天然の酵素を人間に都合のよい形にするにはどのような方法を用いればよいかという視点から、これまでに得られている酵素誘導体について述べてきた。不溶化酵素ではかなりの成功をおさめているとはいえ、現状は初期の目標にまだほど遠いものである。しかし、ここに述べた以外にも新しい酵素誘導体の可能性は数多くあるであろうし、それらの方法を組合せることによりその応用範囲を広げることでもできるであろう。このような研究はやってみなければわから

ないところが難点であるが、またそれだけに夢と興味があるものである。

## 文 献

- 1) Edwards, V.H. : *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **№3** (1972) 343
- 2) Cohen, L.A. : *Ann. Rev. Biochem.*, **37** (1968) 695
- 3) Vallee, B.L. and Riordan, J.F. : *Ann. Rev. Biochem.*, **38** (1969) 733
- 4) Glazer, A.N. : *Ann. Rev. Biochem.*, **39** (1970) 101
- 5) Spande, T.F., Witkop, B., Degani, Y. and Patchornik, A. : *Advan. Protein Chem.*, **24** (1970) 97
- 6) Stark, G.R. : *Advan. Protein Chem.*, **24** (1970) 261
- 7) Weetall, H.H. and Hersh, L.S. : *Biochim. Biophys. Acta*, **185** (1969) 464
- 8) Hornby, W.E. and Filippusson, H. : *Biochim. Biophys. Acta*, **220** (1970) 343
- 9) Allison, J.P., Davidson, L., Gutierrez-Hartman, A. and Kitto, G.B. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47** (1972) 66
- 10) Tosa, T., Mori, T. and Chibata, I. : *Agr. Biol. Chem.* **33** (1969) 1053
- 11) Self, D.A., Kay, G., Lilly, M.D. and Dunnill, P. : *Biotechnol. Bioeng.*, **11** (1969) 337
- 12) Smiley, K.L. and Strandberg, G.W. : *Advan. Appl. Microbiol.*, **15** (1972) 13
- 13) Hicks, G.P. and Updike, S.J. : *Anal. Chem.*, **38** (1966) 726
- 14) Guilbaut, G.G. : *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **№3**, (1972) 361
- 15) Royer, G.P. and Andrews, J.P. : *J. Biol. Chem.*, **248** (1973) 1807
- 16) Chang, T.M.S. and Poznansky, M.J. : *Nature*, **218** (1968) 243
- 17) Chang, T.M.S. : *Sci. Tools*, **16** (1969) 33
- 18) Weetall, H.H. : *J. Biomed. Mater. Res.*, **4** (1970) 597
- 19) Silman, I.H. and Katchalski, E. : *Ann. Rev. Biochem.*, **35** (1966) 873
- 20) 千畑一郎, 土佐哲也 : *化学と生物*, **7** (1969) 147
- 21) Katchalski, E., Silman, I.H. and Goldman, R. : *Advan. Enzymol.*, **34** (1971) 445
- 22) Carbonell, R.G. and Kostin, M.D. : *AIChE J.*, **18** (1972) 1
- 23) Wykes, J.R., Dunnill, P. and Lilly, M.D. : *Biochim. Biophys. Acta*, **250** (1971) 522
- 24) Suzuki, S., Hachimori, Y. and Matoba, R. : *Biochim. Biophys. Acta*, **167** (1968) 641
- 25) Spomer, W.E. and Wooton, J.F. : *Biochim. Biophys. Acta*, **235** (1971) 164
- 26) Blumberg, S., Holmquist, B. and Vallee, B.L. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51** (1973) 987
- 27) Hatfield, L.M., Banerjee, S.K. and Light, A. : *J. Biol. Chem.*, **246** (1971) 6303
- 28) Simpson, R.T., Riordan, J.F. and Vallee, B.L. : *Biochemistry*, **2** (1963) 616
- 29) Hornby, W.E. and Lilly, M.D. : *Biochem. J.*, **107** (1968) 669
- 30) Cresswell, P. and Sanderson, A.S. : *Biochem. J.*, **119** (1970) 447
- 31) Robyt, J.F. and French, D. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **122** (1967) 3
- 32) Ledingham, W.M. and Hornby, W.E. : *FEBS Letters*, **5** (1969) 118
- 33) Kallos, J. and Shaw, K.P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68** (1971) 916
- 34) Sri Ram, J., Terminiello, L., Bier, M. and Nord, F.F. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **52** (1954) 464
- 35) Meighen, E.A., Nicoli, M.Z. and Hastings, J.W. : *Biochemistry*, **10** (1971) 4069
- 36) Yamasaki, N., Hayashi, K. and Funatsu, M. : *Agr. Biol. Chem.*, **32** (1968) 55
- 37) Yamasaki, N., Hayashi, K. and Funatsu, M. : *Agr. Biol. Chem.*, **32** (1968) 64
- 38) Urabe, I. and Okada, H. : *Fermentation Technology Today (Proc. IV IFS)*, (1972) p. 367

- 39) Goldstein, L., Levin, Y. and Katchalski, E. : *Biochemistry*, **3** (1964) 1918
- 40) Wold, F. : *J. Biol. Chem.*, **236** (1961) 106
- 41) Hartman, F.C. and Wold, F. : *Biochemistry*, **6** (1967) 2439
- 42) Urabe, I., Nanjo, H. and Okada, H. : *Biochim. Biophys. Acta*, **302** (1973) 73
- 43) Gabel, D. : *Eur. J. Biochem.*, **33** (1973) 348