



実用化酵素の開発と応用

山下 光雄*

Development and application of feasible enzymes

Key Words : cholesterol, xylitol, oxidase, expression, protein engineering

1. はじめに

1970年代に始まった遺伝子工学はバイオテクノロジー産業発展の導火線となり、多数の遺伝子がクローニングされた。この結果、それらの遺伝子産物自体は種々の目的のために大量に生産された。生産に利用された細胞は一般的に大腸菌が用いられた。大腸菌は遺伝子操作が容易で増殖も速い等の特徴がある。しかしこの発現系にも翻訳後の修飾を欠いている点と発現されたタンパク質が細胞内で不溶性に成りやすいという点がある。昨今技術進歩によってある種の翻訳後の修飾も大腸菌において実行出来るようになり、シャペロニンと共存させることによって不溶性タンパク質が可溶される場合もある。また培養の温度、pHなどの条件を変化させて、可溶化する場合もある。細胞内での異種タンパク質の蓄積は蛋白質分解によっても影響される。この問題を克服するためにタンパク質分解酵素を生成しない宿主菌を用いたり、融合タンパク質として発現後、特異的な親和性クロマトグラフィーを用いて容易に精製される。

1980年代後半には、タンパク質工学という理論的な技術が発展し、既存のタンパク質を改変する試みがなされている。タンパク質の安定性、触媒機能を含めた生物学的な理解が増えてきている。実際にコンピューターのシュミレーション方法によって複雑な分子構造のモデル化も研究されており、実用的な酵素が創製されてきている。

そこで本稿においては、工業的レベルにまで利用できるようになった2種類の酸化酵素の成果について簡潔に紹介する。

2. コレステロール酸化酵素

コレステロール酸化酵素は、cholesterolを酸化して4-cholesten-3-oneを生じる反応を触媒する酵素で、血中コレステロールを定量するための臨床検査試薬でもある。一般的な血中コレステロール値の検査には、本酵素でコレステロールを酸化し、生じた過酸化水素をペルオキシダーゼと色原体で発色定量する方法が用いられている¹⁾。ここ最近酵素的測定法の分野は成熟した感があり、薬価や検査項目の見直しもあって市場は縮小し、新技術、商品開発の話題が少なくなっている。その中でコレステロールの測定については、米国でホームキットが販売されたり、前処理無しに直接定量するキットが商品化されるなど話題が多い。ここではコレステロール測定用酵素として臨床検査薬に供してきた放線菌由来のコレステロール酸化酵素を、遺伝子工学的技術及びタンパク質工学的により改良し、工業生産するに至った過程と応用を紹介する。

コレステロール酸化酵素の生産性向上のため本酵素をコードする遺伝子(*choA*)のクローニングを放線菌より行った²⁾。得られたDNA塩基配列から、本酵素は546アミノ酸からなり、42個のシグナル配列があることもわかった。*choA* 遺伝子を含む断片の入ったクローンは、元の生産菌の約9倍の酵素生産性を示し、その40%以上を細胞外に分泌した³⁾。*choA* 遺伝子の上流部分を削除することにより、*Streptomyces lividans*を宿主にして、元の生産株の70倍の生産量を示し、その99%を培地中に分泌させた⁴⁾。今回のように、放線菌の宿主ベクター系は、容易に大量の酵素タンパク質を培養液中に分泌生産させることが出来るという利点がある。



* Mitsuo YAMASHITA
1958年3月24日生
1983年大阪大学工学部醸酵工学科修士課程修了
現在、大阪大学・大学院工学研究科・応用生物学専攻、助教授、工学博士、遺伝子工学
TEL 06-6879-4170
FAX 06-6879-7418
E-Mail yamashita@bio.eng.osaka-u.ac.jp

生産性の向上を目指して大腸菌を宿主ベクター系に用いた。最初 *choA* 遺伝子は大腸菌で発現出来なかった。そこで構造遺伝子のアミノ末端の一部を大腸菌が好むコドンに置換し、リーダー配列を工夫したところ、放線菌を宿主とした場合の最高値に比較して大腸菌では2倍の向上が見られた。また培養時間も約1/5に短縮された。アミノ末端のプロセッシングが放線菌のそれよりもさらに上流で起こることより、熱安定性が向上することも発見した⁵⁾。

コレステロール酸化酵素は非常に反応性の良い酵素 ($K_m = 13 \mu M$) で、測定用酵素としてすぐれているが、安定性があまり良くなく弱アルカリ性における相対活性も低い。基質結合部位や補酵素結合部位を避けてランダム変異方法を用い、熱安定性が向上した変異株をスクリーニングした。その結果4つの効果的な変異株が得られた⁶⁾。これらの変異部位を組み合わせた多重変異を作成することにより、さらに熱安定性の向上した変異酵素が取得できた。また、変異の波及効果として、弱アルカリ性における相対活性も向上した⁶⁾。このようにして工業化レベルに対応した酵素を創製した。

3. コレステロール酸化酵素の応用

米国農務省より本 *choA* 遺伝子の問い合わせがあり、コレステロール含有量のコントロールを目的に、本遺伝子を食品微生物で発現する研究の協力することになった。その結果乳酸菌での発現が確認されて、現在では発酵食品や健康食品・飲料に応用しようとしている⁷⁾。

一方本酵素が綿花栽培に重大な被害を及ぼすワタノハナゾウムシ (*boll weevil larvae*) に対する殺虫効果が報告されている⁸⁾。時同じ頃、作物中のステロイド量を調節できるかもしれないと思い、タバコ細胞に *choA* 遺伝子を形質転換した。 *choA* 遺伝子産物と遺伝子産物の酵素活性を検出し、タバコ細胞での発現に成功した⁹⁾。本酵素は、昆虫の腸上皮細胞を溶かすことにより、殺虫活性を示すと考えられている。また数種の昆虫に対して、*Bacillus thuringiensis* の生産する殺虫タンパク質と同等の活性を示したこともあって、農業に応用しようとする研究も進んでいる。

元来コレステロール酸化酵素は連続する二つの独立した反応、つまり酸化反応と異性化反応から成っている。本酵素の三次構造を *Brevibacterium* 由来の

コレステロール酸化酵素のX線結晶構造解析より推定し、触媒作用に関与すると思われるアミノ酸を推定し、部位特異的変異方法によって変異酵素を作成した。その結果356番目のグルタミン酸を変異させた酵素は酸化反応のみを触媒し、480番目のアスパラギンを変異させた酵素は異性化反応のみを触媒した。つまり一方だけの反応を触媒する変異酵素の取得に成功した¹⁰⁾。これらの変異酵素を用いて新しいステロイドの合成への応用が期待されている。

4. キシリトール酸化酵素

五単糖アルコールであるキシリトールは、ウロン酸経路の中間代謝産物であり、ヒト血中にも存在し、その濃度は肝疾患で上昇することが知られている。また、キシリトールの経口負荷試験は、肝機能、とくに重症度の判定や肝予備機能の判定に役立つとして、肝臓病の診断へ利用が期待されている¹¹⁾。従来のキシリトールの測定方法としては、化学的発色法、ガスクロマトグラフ法、液体クロマトグラフ法、そして酵素法などが知られているが、何れの方法もキシリトールの臨床分析方法としては問題がある。そこで肝疾患等の診断薬として有用性の高いキシリトール酸化酵素の開発を試みたのでここに紹介する。

これまでの酵素法的測定で用いられたキシロース還元酵素は反応性も安定性も悪いことから、酵素の存在下でキシリトールを酸化し、過酸化水素とキシロースを生成するキシリトール酸化酵素を含有する微生物の取得から着手した。今回は最初から熱安定性な酵素の取得を考慮してスクリーニングした結果、宮城県の温泉土壌よりキシリトール酸化酵素を生産する好温性放線菌を発見した。同定の結果、*Streptomyces* sp. IKD472と名付けた。キシリトール酸化酵素を精製した結果、分子量43kのモノマーで、1モルのキシリトールを酸化して、1モルのキシロースと1モルの過酸化水素を生じることを明らかにした。本酵素の性質は、広範囲にpH安定であり(5.5-10.5)、65℃まで熱安定であった。本酵素のアミノ末端及び内部のペプチドのアミノ酸配列の一部を決定し、それを基にオリゴヌクレオチドプローブを化学合成し、放線菌IKD472の染色体DNAを鋳型にしてPCRを行った結果、66bpの増幅断片が取得できた。これを再度プローブにして、サザンハイブリダイゼーション及びコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、キシリトール酸化酵素遺伝子

を含む約2.8kbpのDNA断片を取得した。遺伝子解析より、本酵素遺伝子は1245塩基対からなり、415個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた。ハイコピープラスミド上にクローニングされた本遺伝子は、大腸菌内でほとんど発現しなかった。そこで適当なプロモーターとリボソーム結合領域下に本遺伝子を遺伝子操作することによって、元株の放線菌IKD472と比較して生産量が100倍向上した。大腸菌で合成させた組換えキシリトール酸化酵素を精製した結果、放線菌IKD472由来の酵素と全く同じものであった。元株において大量培養した後に多段階の精製ステップを費やしていたものが、組換え菌を使用することによって培養量も精製ステップも少なくなった¹²⁾。現在肝疾患の診断薬としての有用性を検討中である。

5. お わ り に

高齢化社会が到来している昨今、予防医学分野が果たす役割の重要度は今後ますます高まると予想される。2003年にはヒトの染色体DNAの全塩基配列が解明されるという。その結果を基に種々な病気に関する遺伝子が特定され、創薬への応用が期待されている。早期診断に効果的な新規検査項目を開発すると共に、新規検査項目の測定試薬を簡便、安価に供給し、正確な検査薬として出来る限り短期間に世の中に送り出すことも大切である。社会への貢献に対する期待を背景に科学的知見に基づいた酵素の選択・機能改変技術の向上も今後要求されるだろう。

謝 辞

本研究は、広島大学工学部第3類発酵工学科、大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻において行われた研究である。終始ご指導いただきました大阪大学大学院工学研究科室岡義勝教授および共同研究した東洋紡績(株)、池田糖化工業(株)の方々にお礼申しあげます。また本研究に関わられた皆様に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C.G.S.,

- Richmond, W., and Fu, P.C. : *Clin. Chem.*, 20, 470-475 (1974).
- 2) Ishizaki, T., Hirayama, N., Shinkawa, H., Nimi, O., and Murooka, Y. : *J. Bacteriol.*, 171, 596-601 (1989).
- 3) Murooka, Y., Ishizaki, T., Nimi, O., and Maekawa, N. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1382-1385 (1986).
- 4) Molnar, I., Choi, K.-P., Hayashi, N., and Murooka Y. : *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 368-372 (1991).
- 5) Nomura, N., Choi, K.-P., Yamashita, M., Yamamoto, H., and Murooka, Y. : *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 410-416 (1995).
- 6) Nishiya, Y., Harada, N., Teshima, S., Yamashita, M., Fujii, I., Hirayama, N., and Murooka, Y. : *Protein Eng.*, 10, 231-235 (1997).
- 7) Somkuti, G.A., Solaiman D.K.Y., and Steinberg D.H. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 330-334 (1992).
- 8) Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Jennings, M.G., Ryerse, J.S., Pershing, J.C., Sims, S.R., Prinsen, M.J., Corbin, D.R., Tran, M., Sammons, R.D., and Stonard, R.J. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 1406-1412 (1993).
- 9) Cho, H.-J., Choi, K.-P., Yamashita, M., Morikawa, H., and Murooka, Y. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 133-138 (1995).
- 10) Yamashita, M., Toyama, M., Ono, H., Fujii, I., Hirayama, N., and Murooka, Y. : *Protein Eng.*, 11, 1075-1081 (1998).
- 11) 沢田 浮, 木崎善郎, 日本臨床 47 巻増刊号 450-452 (1989).
- 12) Yamashita M., Omura H., Okamoto E., Furuya Y., Yabuuchi M., Fukahi K., and Murooka Y. : *J. Biosci. Bioeng.*, 89, 350-360 (2000).