

有機溶媒耐性酵素の開発

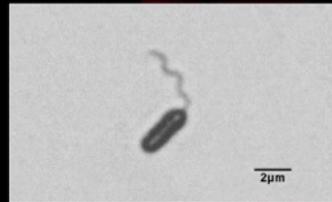
大阪公立大学 大学院 工学研究科

荻野 博康

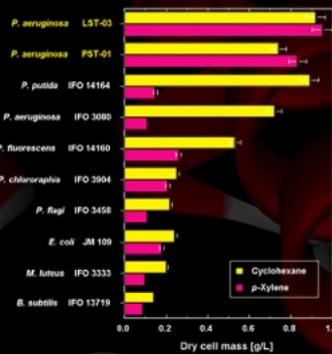
E-mail: ogino@omu.ac.jp TEL・FAX: 072-254-9296

有機溶媒耐性酵素を産生する有機溶媒耐性微生物の探索

- 有機溶媒耐性リパーゼを産生する有機溶媒耐性微生物の探索
油脂を唯一の炭素源とする培養液に有機溶媒を添加して集積培養することにより有機溶媒耐性リパーゼを産生する有機溶媒耐性微生物 *Pseudomonas aeruginosa* LST-03株を取得した。
- 有機溶媒耐性プロテアーゼを産生する有機溶媒耐性微生物の探索
プロテアーゼ生産株の中から有機溶媒耐性微生物を選択し、プロテアーゼを産生する有機溶媒耐性微生物 *P. aeruginosa* PST-01株を取得した。



有機溶媒耐性微生物LST-03株



有機溶媒存在下での微生物の増殖

有機溶媒耐性微生物の増殖と有機溶媒耐性酵素の産生

LST-03株とPST-01株は他の微生物に比べ、有機溶媒耐性に優れている。また、LST-03株は有機溶媒存在下で培養した場合でもリパーゼを分泌産生し、リパーゼを触媒とする有機溶媒存在下での発酵においても有用であることが示唆された。

有機溶媒耐性酵素の性質

- 有機溶媒耐性LST-03リパーゼの性質
LST-03株が産生するLST-03リパーゼは、種々の有機溶媒存在下でも高い活性を示し、有機溶媒が存在する方が安定である。
- 有機溶媒耐性PST-01プロテアーゼの性質
PST-01株が産生するPST-01プロテアーゼは、水溶性の有機溶媒やアルコール存在下で安定性がより高く、サーモライシン、 α -キモトリプシン、およびスブチリシンより概して有機溶媒耐性に優れている。

25% (v/v)有機溶媒存在下での種々のプロテアーゼの半減期

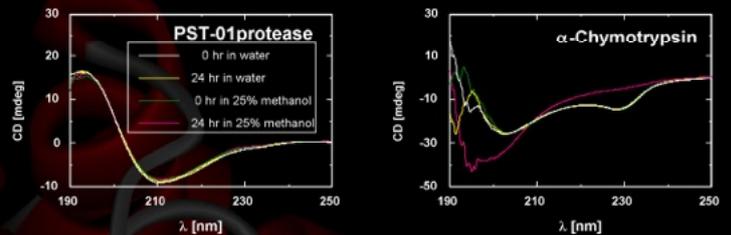
Organic solvent	Half-life [day]			
	PST-01 protease	Thermolysin	Chymotrypsin	Subtilisin
Ethylene glycol	> 100	> 50	6.9	14.3
1,4-Butanediol	> 100	4.4	0.7	25.0
1,5-Pentanediol	> 100	1.7	0.4	> 50
Ethanol	> 100	3.0	27.0	> 50
1-Hexanol	> 50	18.2	14.2	13.7
Methanol	> 50	4.6	6.0	26.2
DMSO	> 50	2.6	33.6	6.4
2-Propanol	> 50	1.2	0.6	47.6
Triethylene glycol	> 50	5.1	11.1	39.7
tert-Butanol	> 50	0.8	0.5	41.6
1-Heptanol	> 50	13.1	3.8	8.6
DMF	25.3	0.9	2.2	39.8
1-Butanol	24.2	0.7	0.3	47.6
Acetone	23.1	0.7	0.6	24.8
1,4-Dioxane	17.7	0.8	0.5	29.3
Toluene	12.0	22.5	> 100	5.7
None	9.7	10.8	13.2	0.3

酵素の有機溶媒耐性の原因解明

タンパク質工学的手法による酵素への有機溶媒耐性付与を目指し、分子生物学的手法による酵素の有機溶媒耐性の原因解明に取り組んでいる。

●有機溶媒存在下での酵素の構造変化

α -キモトリプシンやサーモライシンはメタノール存在下で構造変化を起こし失活するが、PST-01プロテアーゼはメタノール存在下でも構造が変化せず、安定である。有機溶媒耐性PST-01プロテアーゼは β シート構造が少なく、 α ヘリックス構造が多く、有機溶媒存在下でも構造が変化しない。



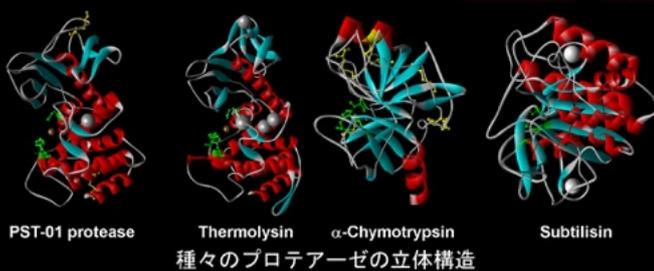
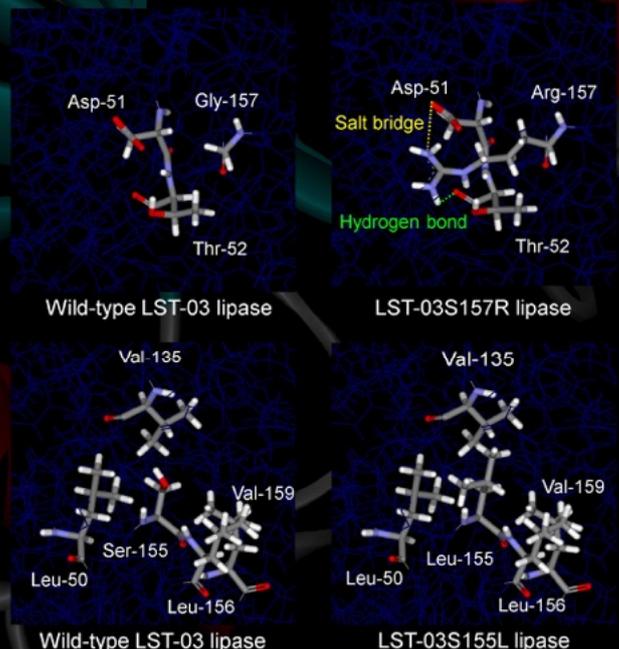
有機溶媒存在下での酵素の立体構造変化

●比較生物学的手法による有機溶媒耐性の原因解明

複数の酵素の構造の違いを見出し、部位特異的変異導入により、特定のアミノ酸残基を置換した変異酵素を作成し、酵素の有機溶媒耐性に及ぼすアミノ酸置換の影響を調べている。例えば、PST-01プロテアーゼとサーモライシンの立体構造は、非常によく似ているが、有機溶媒耐性は大きく異なる。シスルフィド結合はPST-01プロテアーゼの有機溶媒耐性の一要因である。

●進化分子工学的手法による有機溶媒耐性の原因解明

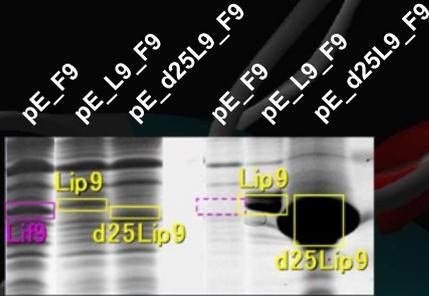
酵素の遺伝子にランダム変異を誘発して作製した変異酵素ライブラリより有機溶媒耐性が変化した酵素を選択する進化分子工学的手法を用いて有機溶媒耐性が向上した変異酵素の取得や酵素の有機溶媒耐性の原因を調べている。有機溶媒耐性が変化したPST-01プロテアーゼや有機溶媒耐性がさらに向上したLST-03リパーゼの構造を調べたところ、酵素表面のアミノ酸残基が親水性側鎖を有するアミノ酸残基に置換、アミノ酸置換による新たな塩橋や水素結合の形成や疎水性コアの充填などにより、酵素の有機溶媒耐性が向上する。



有機溶媒耐性酵素の多量取得法の開発

●LST-03リパーゼの過剰発現と分子シャペロンによる活性化

シングル配列を除いたLST-03リパーゼ (d25Lip9) 遺伝子を大腸菌で発現するとインクルージョンボディを形成し、発現量は大幅に向上した。インクルージョンボディは細胞破碎と遠心分離により高度に精製でき、尿素で容易に可溶化できる。可溶化後、リパーゼ特異的分子シャペロンで活性化した後に、カルシウムイオンを添加する工学的手法により、本来の3倍の比活性を示す超高活性酵素が調整でき、培養液あたりのリパーゼ生産性は1000倍以上に向上した。



Soluble fraction Insoluble fraction
組換え大腸菌の可溶性・不溶性画分のSDS-PAGE分析

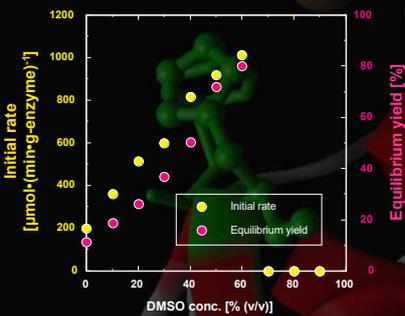
種々のリパーゼの活性

Order of addition	Lipase activity [kU/g]
Lipase	0
Lipase → Ca ²⁺	0
Lipase → Chaperone	228.1 ± 3.5
Lipase → (Chaperone + Ca ²⁺)	173.4 ± 1.0
Lipase → Ca ²⁺ → Chaperone	25.1 ± 0.8
Lipase → Chaperone → Ca ²⁺	359.5 ± 19.3
Original LST-03 lipase	109.9

有機溶媒耐性酵素を用いた非水系酵素反応

●有機溶媒耐性プロテアーゼを用いたペプチド合成

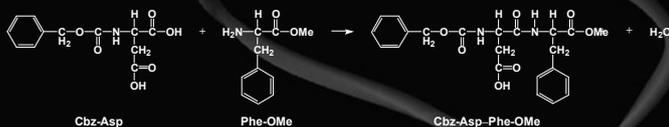
プロテアーゼは本来、ペプチド結合の加水分解反応を触媒するが、有機溶媒存在下では、脱水縮合反応が支配的となり、ペプチド合成反応を触媒する。PST-01プロテアーゼを用いて水-有機溶媒均相系でペプチド合成を行ったところ、60% (v/v) シメチルスルホキシド (DMSO) 存在下での合成反応速度は、有機溶媒を含まない場合より約5.1倍速く、平衡収率は80.2%に達した。本酵素は、種々の有機溶媒存在下で高い平衡収率を与えるだけでなく、反応速度も増大する。



PST-01プロテアーゼを用いたペプチド合成

●有機溶媒耐性酵素を用いたアスパルテーム前駆体の合成

砂糖の200倍甘く、砂糖の200分の1のカロリーである合成甘味料アスパルテームはアスパラギン酸とフェニルアラニンメチルエステルがペプチド結合したシペプチドであり、年間約2万トン生産されている。50% (v/v) DMSOを含むアスパルテーム前駆体の合成反応溶液中のPST-01プロテアーゼの半減期はサーモライシンより約16倍長いが、合成活性はサーモライシンの半分程度である。

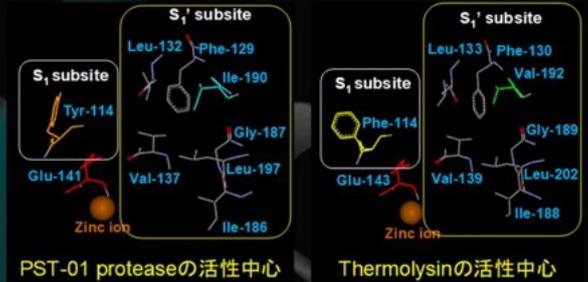


アスパルテーム前駆体の合成反応

有機溶媒耐性アスパルテーム前駆体合成酵素の開発

●活性中心付近の立体構造比較

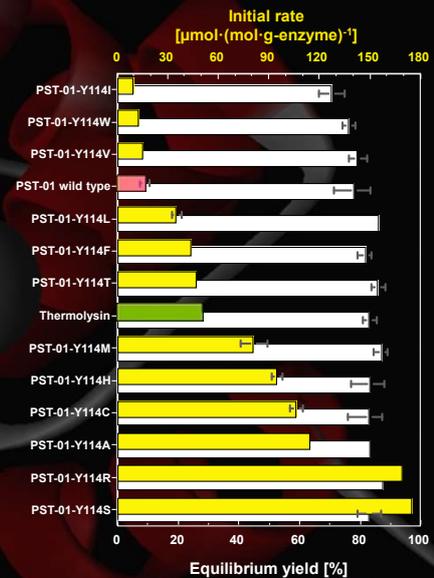
有機溶媒耐性PST-01プロテアーゼとサーモライシンの活性の違いは、活性中心付近の構造に依存すると考えられる。両酵素の基質結合部位を比較したところ、PST-01プロテアーゼの114番目と190番目のアミノ酸残基がサーモライシンと異なっていた。



PST-01プロテアーゼとサーモライシンの活性中心のアミノ酸残基の配位

●有機溶媒耐性プロテアーゼのアスパルテーム合成活性の向上

PST-01プロテアーゼの114番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したところ、サーモライシンと同等の活性を示した。さらに、114番目のアミノ酸残基をメチオニン、ヒスチジン、システイン、アラニン、アルギニン、あるいはセリン残基に置換した変異酵素は、サーモライシンより高いアスパルテーム前駆体合成活性を示した。セリン残基に置換したPST-01プロテアーゼは、サーモライシンの約3.4倍のアスパルテーム前駆体合成活性を示した。

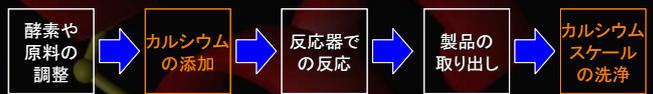


114番目のアミノ酸残基を置換したPST-01プロテアーゼを用いたアスパルテーム前駆体の合成

●アスパルテーム前駆体合成触媒としてのプロテアーゼ

変異型有機溶媒耐性PST-01プロテアーゼは有機溶媒存在下でも高い活性と安定性を示し、サーモライシンのように安定化剤としてカルシウムイオンを添加する必要がない。カルシウムイオンの添加が必要でないため、合成プロセスの触媒として用いてもカルシウムスケール(垢)によるトラブルがなく、流通反応器での合成も可能である。

サーモライシンを用いた場合



PST-01プロテアーゼを用いた場合



プロテアーゼを用いたアスパルテーム前駆体合成プロセスの比較