

## サーモライシンの構成アミノ酸の置換による機能改変

半 澤 敏

## Improvement of Thermolysin by Amino Acid Replacement

Satoshi HANZAWA

Improvement of protein function by the site directed mutagenesis was studied using thermolysin as a target protein. Thermolysin is a microbial metalloprotease used as the catalyst for the coupling of Z-Asp and PheOMe in the production of Z-aspartame (Z-APM). Based on several strategies, such as influencing electrostatic field around an active site or increasing molecular flexibility, about 100 mutants were constructed to enhance the catalytic activity for the above coupling reaction. Three mutants, whose amino acids were replaced by serine at 144th leucine (L144S), by tryptophan at 150th aspartic acid (D150W), or by histidine at 227th asparagine (N227H), respectively, were found out to exhibit 1.5, 4 and 1.5 times higher activity than the wild type thermolysin, respectively, and by combining these three types of mutants the activity was further enhanced up to 10 times as high as the wild type enzyme. An outline of the construction of a highly active mutant, named TZ-5, is also described.

## 1. 緒 言

酵素や抗体などの生理活性を有する蛋白質は、その高い反応選択性や室温程度の温和な条件で反応を進行させることから、化学プロセスでの触媒や臨床検査でのプローブとして実用化される例が増えてきている。当社においてもアスパルテーム (APM) 製造に蛋白質分解酵素 (プロテアーゼ) を利用しており、また、抗原-抗体反応を利用した臨床検査事業が行われている。しかしながら、現在入手可能な酵素や抗体は必ずしも十分に満足して使用できるものとは限らない。例えば反応収率を向上させようとする、蛋白質の安定性が低く反応中に失活することが問題になってきたり、分析の感度を上げようとする、より高い触媒活性や抗原との結合性、或いはより高い反応選択性が望まれる事があった。即ち、その機能の改良が求められる事

が多かった。

一方、これまでにX線結晶解析法やNMR法が進歩し、非常に多くの蛋白質の構造が解析されてきて、それらの蛋白質を構成するアミノ酸残基のうち、どの残基がどのような役割を果たして機能が発現されるのかという、機能発現のメカニズムに関する知見が蓄積されてきている。また、1980年代に精力的に行われた遺伝子工学の進歩により、蛋白質を構成する任意のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換することが可能となった。この様な技術的背景の下に、1990年代に入ってから、人為的に蛋白質のアミノ酸組織を組み替える事により高機能性蛋白質を創製しようとする試みがなされるようになった。この試みは蛋白質工学と呼ばれる。

筆者等はAPM合成酵素であるサーモライシンを題材とし、蛋白質工学的的手法による酵素機能の改良を検討してきた。本研究は相模中央化学研究所の城所俊一

博士のグループとの3年間の共同研究で行われ、最終的に酵素活性が約10倍に向上した変異体サーモライシンTZ-5の構築に成功した。ところで蛋白質の活性を向上させるための一般的な理論は未だ存在しない。そこで本研究は分子設計、変異体構築、そしてその評価を繰り返すことによって進められた。TZ-5が構築されるまでに作製した変異体サーモライシンは約150種類に及ぶ。この間に蓄積されたデータは、今後同様の研究を行う上で、或いは蛋白質の機能発現のメカニズムを知るために、重要な知見を提供するものと考えている。本稿ではTZ-5の構築に至るまでに用いられた設計のストラテジー、変異体酵素の構築、活性評価について概論的に述べたい。

## 2. サーモライシン

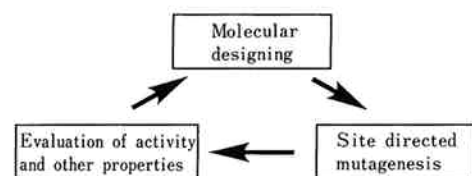
まず始めにサーモライシンについて簡単に説明する。サーモライシンは70℃付近に最適生育温度を示す好熱菌 *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko の生産する耐熱性プロテアーゼである<sup>1)</sup>。本酵素は酵素分子に亜鉛イオンが結合する事で活性を発現する金属プロテアーゼと呼ばれる一群のプロテアーゼの一つである。本酵素の三次元構造についてはX線結晶解析から詳細に解析されており<sup>2)</sup>、また、ペプチド結合を加水分解するメカニズムについても幾つかの仮説が提案されている。即ち、N末端から143番目のグルタミン酸残基 (E143) が付近の水分子を活性化して、その活性化した水分子がペプチド結合を攻撃して加水分解を引き起こすとする説<sup>2)</sup>と、水分子を活性化するのはN末端から231番目のヒスチジン残基 (H231) であるとする説<sup>3)</sup>である。いずれの仮説においてもE143とH231は活性発現に必須とされている。サーモライシンの全アミノ酸配列はTitaniら<sup>16)</sup>により、サーモライシンの部分分解ペプチドのアミノ酸配列分析によって初めて明らかにされたが、後に遺伝子がヘキスト社のグループによりクローニングされ<sup>4)</sup> DNAの塩基配列からも分析された。一方、当社においても、かつて独自のスクリーニングが行われ、上記微生物に類似した別の好熱菌 *B. stearothermophilus* MK232からサーモライシン遺伝子nprMが取得されていた<sup>5)</sup>。なお、当社のサーモライシンは当初はトヨザイムと命名され、サーモライシンと類似してはいるものの、アミノ酸残基が2箇所異なる全く別の酵素であると考えられていた。しかし、当時公開されていたサーモライシンの配列は2箇所誤りがあった事が最近指摘されて<sup>4) 6)</sup>、トヨザイム

と同じアミノ酸配列に修正された。即ち、トヨザイムは実はサーモライシンその物であった。

当社のAPM製造技術は、2種類のアミノ酸誘導体であるベンジルオキシカルボニルアスパラギン酸 (Z-Asp) とフェニルアラニンメチルエステル (PM) を、サーモライシンを触媒として脱水縮合し、APM前駆体であるZ-APMを合成する事を特徴とする<sup>7)</sup>。この技術を用いて、オランダのDSM社との合弁会社である Holland Sweetener Company (HSC) でAPMが生産されている。本プロセスでは、この酵素的縮合工程は非常に重要な工程であるので、この反応が効率よく進行するようにサーモライシンを改変することはAPM事業の効率化にも貢献しようと考えられた。以上のように、高次構造や反応の機構が良く解析され、当社がその酵素遺伝子を所有し、かつ当社の事業に関連が深い事から、サーモライシンが研究のターゲットとして選択され、その触媒活性の向上に向けて機能改変への探索が開始された。

## 3. 分子設計

酵素の触媒機能を向上させるための一般的な指針は存在しない。そこで、まず機能向上のための作業仮説を設定し、それに基づく分子設計を行い、サーモライシン遺伝子に変異を導入し、変異体サーモライシンの活性評価をして作業仮説の検証を行い、作業仮説を更新して新規な分子設計を行う、というサイクルが繰り返された (Scheme 1)



Scheme 1

作業仮説の設定・分子設計は相模中央化学研究所の城所博士により行われ、また遺伝子への変異の導入は当社において実施した。構築された変異体酵素の評価は、主に学術的な部分は相模中研が、Z-AspとPMの縮合に関する応用的な部分は当社が担当して実施された。この蛋白質工学のサイクルの中で、アミノ酸置換が行われたサイトをFig. 1に示した。Fig. 1 Aはサーモライシンの活性中心を正面から見た図であり、Bは側面図である。以下、その作業仮説と分子設計を説明

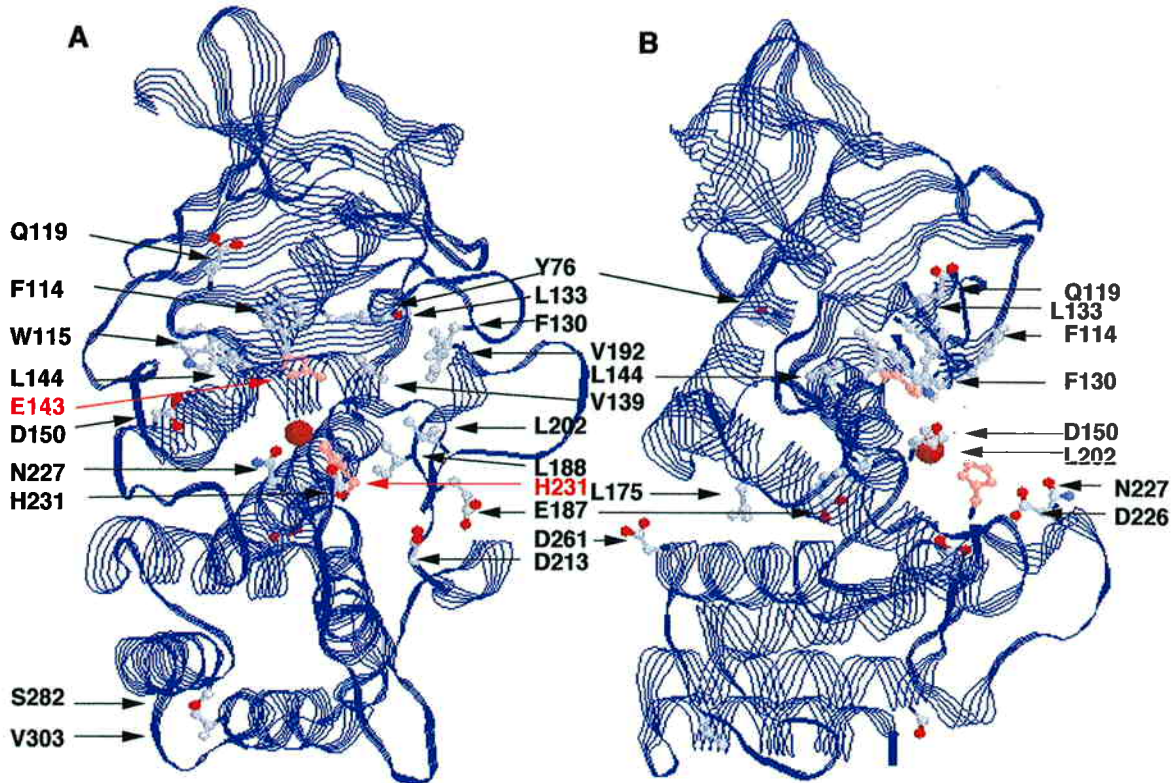


Fig. 1 The three dimensional structure of thermolysin and the remarked sites for the activity improvement.

Backbones of thermolysin is expressed by the strand model from in front of the active site (A) and the side view (B). The target amino acid residues are expressed by ball and bar model on the strand. The residues drawn in red are the residues required to express thermolysin activity.

する。

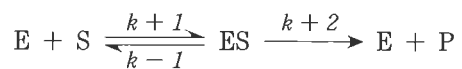
〔1〕 解離状態の調節

APMは酸性pHにおいて安定だが、中性からアルカリ性では不安定である。そのため、サーモライシンは中性で最も高い活性を示すにもかかわらず、弱酸性で使用される。サーモライシンが酸性領域で最も高い活性を示すように改変されれば、より少ない酵素用量でのAPM合成が期待できる。ところで、サーモライシンが中性付近のpHで最も高い活性を示すのは、pH 7 付近で上に述べたH231とE143が適切な解離状態になるためと考えられる。両残基のpKaが酸性側にシフトされれば、サーモライシンの最適pHも酸性側にシフトする。そのためには両残基の周辺の静電場に影響を与えれば良いと考えられた。静電場に影響を与える変異としてTable 1 に示されたアミノ酸残基の置換が考案された。

〔2〕 基質結合部位の改変

酵素反応は一般的に、まず酵素 (E) と基質 (S)

が複合体を形成し (ES 複合体)、その後に基質が生成物に変換すると言う、二段階の反応として考えられる (Scheme 2)。



Scheme 2

基質と酵素の親和性が向上され、反応系中のES複合体濃度が上昇すれば、反応速度も向上する。サーモライシンのES複合体はX線結晶解析の結果から既にモデルが提案されている<sup>8)</sup>。それに基づいて、基質結合部位に存在する残基が選択され、Table 1 の変異が提案された。

〔3〕 アニオン結合部位の改変

サーモライシンの分子表面には正電荷が集中したクラスターが存在し、酸性pHではそこにアニオンが結合

Table 1 Thermolysin mutants constructed for the activity improvement

Strategy	Site	Amino acids	Activity	
			for ZAPM	for Casein
Effect for the electrostatic field	Y76	H,K,R	no effect	no effect
	Q119	18	no effect	decreased
	D150	19	increased	no effect
	L175	H,K,R	decreased	no effect
	E187	Q	no effect	no effect
	D213	N,H,K,R	decreased	increased
	D226	A,E,N	decreased	decreased
	N227	10	H;increased	H;no effect
			others;decreased	others;decreased
Subsites	L202	A,V,Q	no effect	no effect
	F114	A,L,K	no effect	no effect
	W115	K,E	decreased	decreased
	F130	A,I,W,E,N,H	decreased	decreased
	L133	A	decreased	decreased
	I188	Q	decreased	decreased
	V192	G,A,L,I,F,E,K	decreased	no effect
Anion binding	S282	D	no effect	no effect
	V303	E	no effect	no effect
Molecular flexibility	L144	11	increased	decreased
	S103	G,A	no effect	decreased

して活性低下がおきている可能性が考えられた。この正電荷クラスターを中和した抗アニオン結合活性低下変異体としてS282とV303に負電荷を導入した変異体が考案された (Table 1)

#### [4] 酵素の柔軟性の改変

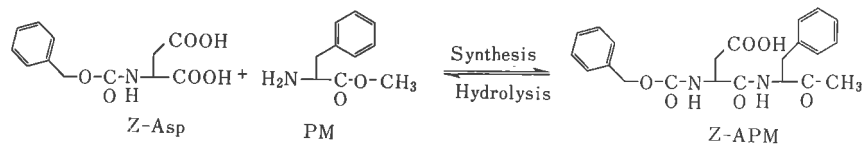
後述するが、119番目のグルタミン (Q119) に変異を導入するとサーモライシンは活性が向上する。その活性上昇機構を解析すると、それは活性中心近傍の分子の柔軟性が向上したためと推定された<sup>9)</sup>。そこで、同様なサイトとして144番目のロイシン (L144) が注目された。この残基はサーモライシン分子の中心部の疎水性環境に存在し、かつ触媒残基のE143に隣接する。これを、より親水性で嵩の小さい残基に置換すれば、活性中心の柔軟性を効率的に向上しうると考えられた。

#### 4. 変異体酵素の構築と調製

サーモライシン遺伝子としてnprM遺伝子を使用した。本遺伝子は当社と大阪大学の今中教授 (現京都大学) との共同研究によってクローニングされた物である<sup>5)</sup>。この遺伝子への変異はポリメラーゼチェーンリ

アクション (PCR) またはM13ファージを用いる方法によって導入された。何れの方法も、遺伝子複製のプライマーとして、nprM遺伝子上の目的のサイト周辺の塩基配列に相補的であり、さらに目的サイトが任意のコドンに置換された合成オリゴDNAを用いて、nprM遺伝子を複製させ、その際に変異を導入する方法である。また、同一のサイトを幾つかのアミノ酸に置換したい場合は、目的のサイトがランダムな塩基配列になったオリゴDNAの混合物をプライマーとすることにより、複数の変異を同時に導入した。これらの方法の詳細は原著論文<sup>9)</sup> や特許<sup>10) 11)</sup> に詳しく述べられているので参照されたい。変異が導入されたnprM遺伝子の単離は、大腸菌と枯草菌の間のシャトルベクターであるpUBTZ2<sup>9) 10)</sup> に再クローニングした後、大腸菌に形質転換して、平板培地上で目的の変異体nprM遺伝子を保持するコロニーを単離することによって行った。さらに単離したpUBTZ2を枯草菌MT-2株に再度形質転換し、変異体サーモライシンの生産菌株とした。

変異体サーモライシン生産菌株を2L培地 (培地1リットル当り、酵母エキス10g、ペプトン20g、



Scheme 3

NaCl 5 gを含む培地)に植菌し、37℃で約20時間培養を行った後、遠心分離にて培養上清を回収した。培養上清に硫酸を60%飽和(約40重量%)になるように添加し、沈殿物を遠心分離で回収した後、ブチルトヨパール及びTSKgel G2000SWXLの2本のカラムクロマトグラフィーにより均一にまで精製した。

## 5. 変異体酵素の反応解析

### [1] 活性測定方法

活性はZ-APMの合成反応に対する活性と加水分解反応に対する活性(Scheme 3)について評価された。両反応は正反応と逆反応の関係にある。

合成活性は小山ら<sup>7)</sup>により報告された方法を改変し、0.1M Z-Asp及び0.1M PMを含む0.1M トリスマレイン酸緩衝液(pH6.0)を基質溶液として、その1 mlに酵素液0.1 mlを加えて反応を開始し、35℃で30分反応を行った後に生成するZ-APMを逆相高速液体クロマトグラフィーで定量することにより測定した。分解活性は井上の方法<sup>12)</sup>を改変し、1 mMのZ-APMを基質としてpH7.0、35℃で反応を行った際の、ペプチド結合の解裂に伴う224nm又は257nmの吸光度の減少を追跡することにより測定した。また、プロテアーゼに一般的な活性測定法であるカゼインの分解活性についても遠藤の方法<sup>1)</sup>に従って測定した。即ち、0.5%ミルクカゼインを基質としてpH7.2、35℃で10分間反応した後にトリクロロ酢酸で未分解の蛋白質を沈殿させ、上清の酸可溶性画分に遊離するペプチドをフェノール試薬で定量することにより測定した。

### [2] 変異体の活性

Table 1に示した変異体を順次評価を行う中で、最初に活性上昇効果が認められたのは、Q119における変異体であった。残念ながら、この変異はペプチドの分解活性の上昇効果は示すものの、合成反応に対しては活性上昇効果を示さなかった。とはいえ、サーモライシンの活性を向上させることが不可能ではないことを証明するものであった。このシリーズの中ではQ119をグルタミン酸(E)に置換した変異体Q119E

が最も高い活性を示したが、これ以外の何れのアミノ酸残基を導入した場合でも活性は上昇した。

活性上昇の機構は相模中研において解析された。Q119は活性中心の静電場に影響を与える残基として選択されたが、導入したアミノ酸の静電的な性質は活性上昇には寄与が小さく、むしろ酵素の耐熱性と活性とに負の相関がある事が見出された<sup>9)</sup>。Q119はS103等のアミノ酸残基と水素結合を形成している可能性が指摘されている<sup>5)</sup>。このサイトでアミノ酸置換を行うと、その水素結合が無くなり、酵素分子はより柔軟になると考えられる。柔軟性が増して変性しやすくなると同時に、酵素は柔軟に基質を取り込むようになり、その結果、基質との親和性が向上して活性が上昇したものと推測された。なお、この変異によって酵素の熱安定性が低下したと言っても、それは示差熱分析での熱変性温度が数度低温側へシフトする程度のものであり、本酵素の耐熱性は、この変異が導入されても、通常の酵素に比べれば十分に高いものであった。

この変異体のペプチドの加水分解活性を、合成ペプチドであるfurylacryloyl-Asp-Phe-OMeを基質として解析するとKm値が低下していることが判明した。Km値はES複合体の解離定数に近似できる数値である。即ち、酵素と基質の親和性が向上していることが実験的に確認された。また水素結合のもう一方のアミノ酸残基であるS103をアラニンやグリシンに置換した変異体(S103A、S103G)が構築され、これらの変異でも活性が向上することが確認された。

以上が相模中研で行われた解析の結果であるが、この結果から、分子の柔軟性を向上させる事が新たな分子設計の方針として採用され、L144が新たなサイトとして選択されたことは上に述べた。

さらに探索を進める中で、D150及びN227での変異による活性上昇が見出された。D150では導入したアミノ酸残基の疎水性と活性の間に相関がある事が見出され、また最も疎水性の高いトリプトファン(W)が導入された変異体(D150W)は野生型酵素の4倍と、単一のアミノ酸置換体としては最も高いZ-APM合成

活性を示した。D150での変異による活性の上昇の原因は、当初の分子設計のコンセプトであった活性中心近傍の静電場が影響を受けたためでなく、基質が酵素にはまり込むためのポケットの疎水性が向上し、基質と酵素がより強く結合する様になったために活性が向上したものと考えられる。またN227ではヒスチジンを導入した場合(N227H)のみ活性向上が認められた。その活性は野生型酵素の約1.5倍であった。N227Hの活性化機構についてのより詳細な解析は現在進行中であるが、設計コンセプトの通り、第227番目のサイトに導入したヒスチジンの正電荷がH231近辺の静電場に影響を与えたものと考えている。

また、分子の柔軟性を向上させる目的でL144を親水性アミノ酸であるセリンに置換した変異体(L144S)も合成活性を約1.5倍に向上させた。この部位の場合は、Z-APM合成活性で評価すると、何れのアミノ酸を導入した場合でも活性の上昇の程度に顕著な差は認められなかった。しかし、Z-APM分解活性で評価すると、導入したアミノ酸残基の疎水性と活性との間に負の相関が認められた。L144Sの熱変性温度は示差熱分析で評価すると野生型酵素より1℃程度低く、また後述するようにペプチドの分解に対するKm値も減少する。以上の結果はL144Sの変異により分子内部の疎水性相互作用が弱められて酵素の柔軟性が増し、基質と酵素の親和性が向上して、活性が上昇したと考えられる。即ち当初の分子設計を支持する解析結果が得られた。

以上の他に顕著に活性を上昇させるサイトは見出せなかった。むしろ多くの変異は活性を低下させた。Table 1には大まかな評価結果も示した。以上述べた変異の他に、この中で注目したいのはD213における変異である。これはZ-APMに対する活性は低下させたが、カゼイン分解活性を30~80%向上させた<sup>13), 14)</sup>。今回の探索においては、これはカゼイン分解活性を向上させる唯一の変異体であった。本変異体は、サーモライシンを本来の蛋白質分解酵素として蛋白質の分解に利用する場合には有用であると考えられる。なお、Z-APMの様な低分子量のペプチドに対する活性とカゼインの様な高分子量の蛋白質の分解活性との間に明確な関係は現在のところ見出せていない。この関係を解析するためにはさらに研究を進める必要があるが、いずれにせよ、酵素蛋白質の機能改良を行う場合は、その酵素を利用する目的に適した条件で評価しなければならないことが示された。例えば、カゼインの分解活

性を指標に酵素活性を向上させた変異体を得ても、それはAPM合成の効率向上の目的のためには全く役に立たないし、また逆にAPM合成効率を向上させた変異体は、むしろ蛋白質を分解する様な用途にはあまり有用であるとは言えない。

### 〔3〕 多重変異体

上記のようにサーモライシンのZ-APM合成活性を向上させる3つの変異が見出されたが、次いで、これらの組み合わせによる酵素活性の向上を試みた<sup>10), 11)</sup>。これら3つのアミノ酸残基の配置をFig. 2に示す。Fig. 2-Aはプロテインデータベースに登録されていた野生型酵素の構造を元に描いたものであり、Fig. 2-Bは三重変異体酵素の構造をコンピュータープログラムQuanta Charmを用いて推定したものである。図中、変異の対象となったサイトは黄色で、また活性発現に必須であるE143とH231はピンク色で示した。また、図中央の茶色の球は活性発現に必須の亜鉛イオンを示す。多重変異体酵素の活性評価の結果はTable 2に示した。Km値やkcat値は、様々な基質濃度下で反応速度を測定した後、Lineweaver-Burk plotによって解析した。なお、合成活性についてはPM濃度を900mMで固定し、0.001-0.1Mの種々のZ-Asp存在下で活性測定を行った。Km値は先述したようにES複合体の解離定数に近似できる値であり、kcat値は基質大過剰下での単位酵素当たりの反応速度を示す値である。それぞれの変異の影響は合成反応より、分解反応で解析した場合に顕著に現れている(Table 2)。何れの変異もkcat値を向上させたが、最も効果が大きい変異はD150Wであり、次いでN227H、L144Sの順であった。L144SはZ-APMの分解反応に体するKm値を減少させる特徴があった。これに対し、D150W及びN227HはKm値には大きな影響を与えなかった。なお、合成ペプチドfurylacryloyl-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>を基質とした反応解析が相模中研で行われたが、その結果としてD150での変異はKm値を上昇させる傾向ある事が報告されている。また当社において行ったtert-butoxycarbonyl-APMやformyl-APM等のAPM誘導体の加水分解反応の解析でもD150WのKm値は野生型より若干高い傾向が認められた。Z-APM以外の基質に対してはD150での変異は基質との親和性を若干低下させる模様であった。

以上に述べた各変異の特性は、これらを組み合わせた二重変異体や三重変異体においても保持されていた。即ち、L144Sを含む変異体はD150WやN227Hと組み合

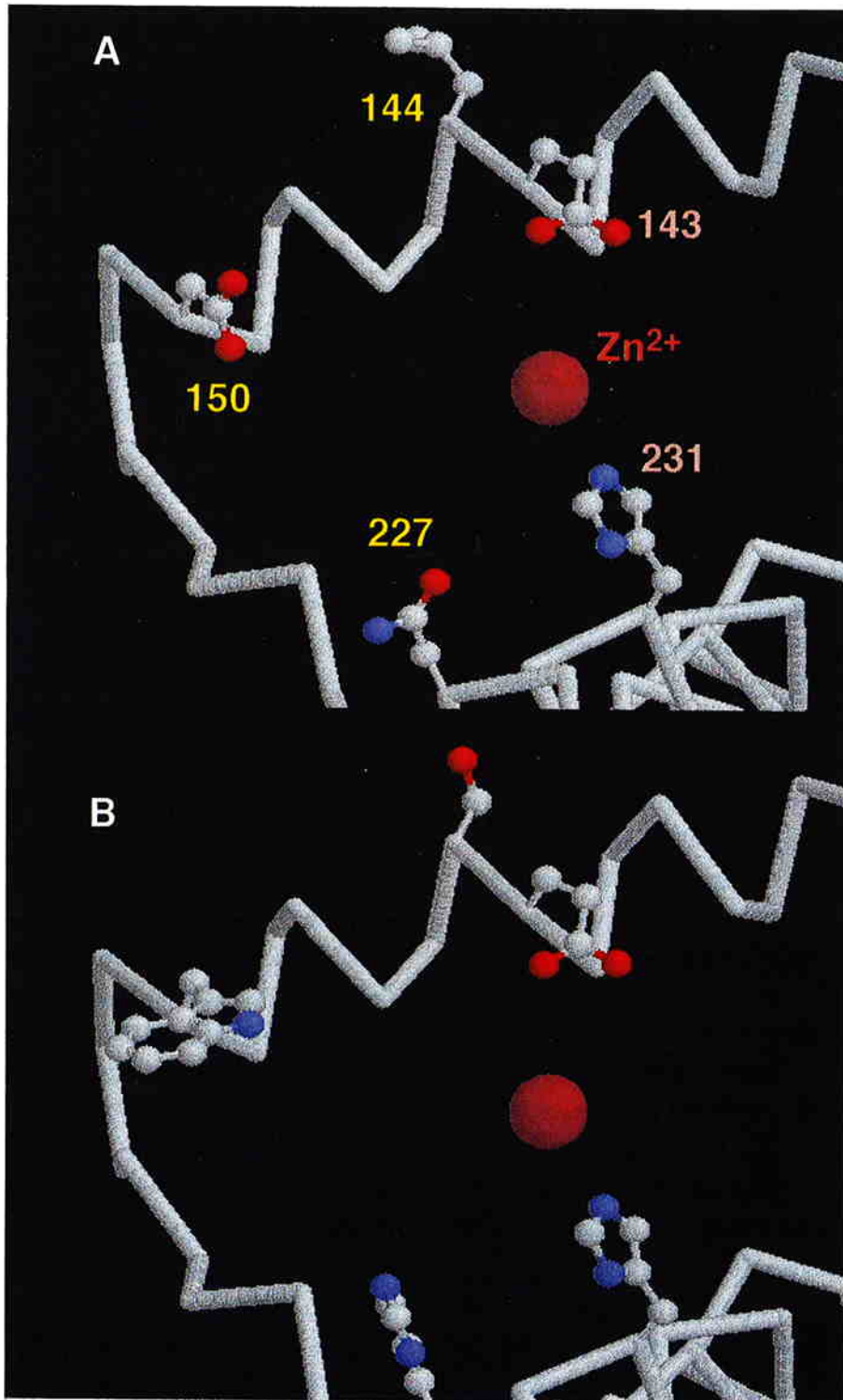


Fig. 2 Structures of wild type (A) and triple mutant (B) thermolysin around their active sites.

The residues drawn in yellow are remarkable residues for the activity enhancement and drawn in pink are the residues required to express activity. Other residues are not drawn. The red large ball is a zinc ion which is prerequisite to the enzyme activity.

Table 2 Activity of the thermolysin mutants

	Z-APM						Casein hydrolysis %
	Hydrolysis			Synthesis			
	kcat [sec <sup>-1</sup> ]	Km [mM]	kcat/Km [sec <sup>-1</sup> •mM <sup>-1</sup> ]	kcat [sec <sup>-1</sup> ]	Km [mM]	kcat/Km [sec <sup>-1</sup> •mM <sup>-1</sup> ]	
Wild Type	5.7	0.68	8	0.43	12.7	0.03	100
L144S	6.5	0.20	33	0.40	9.0	0.04	50
D150W	15.0	0.68	22	1.45	11.9	0.12	80
N227H	11.3	0.67	17	0.60	13.0	0.05	100
L144S-D150W	17.0	0.16	106	1.33	10.5	0.13	40
D150W-N227H	28.6	0.68	42	2.18	13.0	0.17	90
L144S-D150W-N227H	40.4	0.10	400	3.00	9.0	0.33	20

わされてもKm値を低下させる傾向があった。なお、Km値はL144Sの単独の場合よりD150WやN227Hと組み合わせられた場合の方が低い値を示す傾向が認められた。また、kcat値は複数の変異の組み合わせにより相乗的に増加した。合成活性に対するパラメーターにも、分解活性に対するそれに比べて変化は小さかったものの、同様な傾向が認められた。

なお、L144Sはカゼイン分解活性を低下させるが、変異を組み合わせることによりカゼイン分解活性もより低下した。データは示さないが、Q119での変異体も低分子ペプチドの加水分解に対するKm値を低下させると同時に、カゼイン分解活性を低下させる。カゼイン分解活性の低下と低分子ペプチドの加水分解に対するKm値の低下には何らかの関係があるのかもしれない。先にカゼインに対する活性と低分子ペプチドに対する活性には相関が認められなかったと述べたが、L144での変異体とQ119での変異体は、両活性の関係を解析するための手がかりとなると考えている。

三重変異体サーモライシンは、酵素の触媒効率を表すkcat/Km値で比べると、Z-APMの合成反応では野生型酵素の11倍の触媒効率を示し、分解反応では約50倍もの高い触媒効率を示した。我々は本三重変異体サーモライシンをTZ-5と命名し、16Lの発酵槽を利用して酵素の試作も行った。この酵素標品を用いて南陽事業所のプロセス開発室においてAPM製造への有用性が評価された。この評価により、本酵素を使用すれば酵素量を削減できる他は、従来の市販酵素を利用した場合と全く同様にAPM合成に使用できることが示された。

## 6. まとめ

著者らはAPM合成酵素であるサーモライシンを題材として、蛋白質工学的手法による酵素機能の改良を検討してきた。この間に数多くの変異体が作製され、その中からZ-APM合成活性を向上させる3個所のサイトが見出された。変異体酵素の活性上昇の機構は必ずしも当初の分子設計通りの物ではなかったが、これを通して酵素蛋白質の活性を調節する幾つかのメカニズムを知ることが出来た。今回はサーモライシンの活性を向上させるために構築した約100種類の変異体を紹介したが、これらの他にサーモライシンの安定性を向上させたり、基質特異性を改変させたりすることを目的に設計・作製された変異体も存在する。それらについては、別の機会があれば紹介したい。今回得られた様な知見を積み重ねて行けば、将来的には酵素活性などの蛋白質機能を自由に調節することが可能になり、さらには全く新規な反応を触媒する酵素も創製できるようになることと信じている。とはいえ、現状では未だ試行錯誤が必要であり、高機能化された蛋白質を単に入手したいという目的のためには、従来から行われてきたランダムに変異を導入する方法と、今回の分子設計による方法のどちらが効率が良いか判断することは難しい。特に耐熱性を向上させるのが目的の場合は、酵素を精製することなく評価することが可能なので、ランダムな変異の方が効率は良いかもしれない。しかしながら、触媒活性向上が目的の場合は、酵素を精製して評価しないと、微生物が生産する酵素の量が増えたのか、或いは酵素分子の活性が上昇したのか判断できない。ランダムに得られた変異体を一つ一つ微生物に生産させて精製し、評価していく事には非常に労力



が要求されることである。従って現在の段階でも、今回のように分子設計によって候補を絞り込む方法の方が効率は良いであろう。とはいえ、本研究においてもランダム変異による探索も試みており、それにより活性が上昇した変異体が一つ取得されている<sup>10)</sup>。ところがその変異体は分子設計からも得られていたL144がセリンに置換された変異体(L144S)であった。奇しくもランダム変異で得られた変異体が分子設計された物の一つと同じ物であった事は興味深い。

今後、化学企業の製品がコモデティケミカルからファイン・スペシャリティに重点が移っていくと、酵素・抗体等の機能性蛋白質を利用することの重要性はますます増大していくと予想される。今後は酵素の応用の範囲の拡大を求めながら、酵素機能調節のメカニズムの探索を進めていきたい。

## 7. 謝 辞

本研究の成果である高活性変異体サーモライシンTZ-5は非常に多くの研究員の努力によって完成された。著者はその最後の担当者として本稿を執筆させていただいた。変異体の設計に携わられた相模中央化学研究所の城所俊一博士、当初の担当者であった長尾博昌主任研究員及び前任者の三宅俊男主任研究員には特別の感謝を申し上げます。また、変異体遺伝子の構築と評価に携わった青山淳夫、大江正剛、米谷 隆、田中良和各研究員、及び相模中央化学研究所の遠藤きみ子、三木洋一郎(現長岡技大)両研究員に感謝を申し上げます。また、本稿では触れなかったが、TZ-5の発酵生産法を検討した甲斐健一、家亀晴字、田崎誠一各研究員に感謝致します。また、本研究を支援下さった、相模中央化学研究所の和田昭允先生を始め、DSM社、HSC社、及び当社においてAPM事業に携わられた多くの方々に感謝致します。

## 8. 参考文献

- 1) 遠藤滋俊, 醸工 40, 346-353, (1962)
- 2) B.W.Matthews, *Acc.Chem.Res.*, 22, 333-340 (1988)
- 3) W.L.Mock and M.Aksamawati, *Biochem.J.*, 302, 57-68 (1994)
- 4) R.Marquardt, R.Hilgenfeld and R.Keller, *EP PAT 0418625A1*, (06.Sep.1991)
- 5) 久保 幹, 肥後裕仁, 東ソー研究報告, 33, 101-112 (1988)
- 6) Y.Miki, *J.Ferment. Bioeng.*, 77, 457-458 (1995)
- 7) K.Oyama, K.Kihara & Nonaka, *J.C.S. PerkinII*, 356-360 (1981)
- 8) H.M.Holden, D.E.Tronrud, A.F.Monzingo, L.H.Weaver and B.W.Matthews, *Biochemistry*, 26, 8542-8553 (1987)
- 9) S.Kidokoro, Y.Miki, E.Endo, A.Wada, H.Nagao, T.Miyake, A.Aoyama, T.Yoneya, K.Kai and S.Ooe, *FEBS Lett.*, 367, 73-76 (1995)
- 10) H.Nagao, T.Yoneya, T.Miyake, A.Aoyama, K.Kai, S.Kidokoro, Y.Miki, K.Endo and A.Wada, *EP PAT 0616033A1*, (17, May, 1993)
- 11) Y.Tanaka, T.Miyake, S.Hanzawa, S.Ohe, S.Kidokoro, Y.Miki, E.Endo and A.Wada, *WO PAT 9516029* (15, June, 1995)
- 12) K.Inoeye, *J.Biochem.*, 112, 335-340 (1992)
- 13) 米屋 隆, 青山淳夫, 三宅俊夫, 長尾洋昌, 城所俊一, 三木洋一郎, 遠藤きみ子, 和田昭允, 特開平 05-199873
- 14) Y.Miki, S.Kidokoro, K.Endo, A.Wada, T.Yoneya, A.Aoyama, K.Kai, T.Miyake and H.Nagao, *J.Mol.Catalysis B:Enzymatic*, 1, 191-199 (1996)
- 15) 半澤 敏, 大江正剛, 三宅俊男, 城所俊一, 遠藤きみ子, 三木洋一郎, 和田昭允, 農化71(臨時増刊), 162 (1996)
- 16) K.Titani, M.A.Hermodson, L.H.Ericsson, K.A.Walsh and H.Neurath, *Nature New Biology* 238, 35-37 (1972)



著 者

氏名 半 澤 敏

Satoshi HANZAWA

入社 昭和60年4月1日

所属 東京研究所

バイオ分野

主任研究員