

学 位 論 文 題 名

酸化剤耐性とキレート剤耐性を有する

α -アミラーゼに関する研究

学位論文内容の要旨

洗剤には、衣類や食器類に付着した澱粉系汚れを除去する目的で液化型 α -アミラーゼが配合されている。しかし、洗剤のpHはアルカリであり、酸化剤およびキレート剤などを含むため、既存の液化型 α -アミラーゼには安定性およびコスト面で問題があった。

本研究は洗剤配合に適した新規な液化型 α -アミラーゼの構築を目的に、蛋白質工学による既存アルカリ液化型 α -アミラーゼの改良を試みた。しかし、十分な目的酵素が得られないことが判明したので、新たに目的に適う酵素を自然界よりスクリーニングし、その酵素学的特性を明らかにした。また、シークエンスとモデリングによる本酵素の構造的特性を解析するとともに、分子系統学的解析を行った。さらに、実用化に向けた蛋白質工学による本酵素の耐熱化を検討した。

1. 蛋白質工学による既存アルカリ液化型 α -アミラーゼの改良

好アルカリ性 *Bacillus* sp. KSM-1378 株由来アルカリ液化型 α -アミラーゼ (AmyK) の酸化安定化を蛋白質工学的手法により試みた。その結果、AmyK 分子中の Met202 を非酸化性アミノ酸残基に置換することにより、過剰の H_2O_2 に対しても耐性を有する変異 AmyK の構築に成功した。しかしながら、変異導入により AmyK の保持するアルカリ pH での高い酵素比活性が低下し、実用面には至らなかった。

2. 新規酵素のスクリーニングと酵素特性解析

そこで次に、洗剤配合に適した新規の α -アミラーゼを生産する微生物の探索を行い、KSM-K38 株を土壌より分離した。本菌株は同定の結果、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌であることが判り、さらに発生系統学的解析により新種 *Bacillus* 属細菌と判断した。

本菌株の培養液から本酵素 (AmyK38) を電気泳動的に単一になるまで精製して、物理化学的および酵素化学的特性を明らかにした。分子量は 55 kDa (SDS-PAGE)、活性の最適作用 pH は 8.0~9.5 であり、糖分解様式などから液化型 α -アミラーゼであると考えられた。また、AmyK38 は比活性が高く、洗剤配合成分である酸化剤およびキレート剤に対して非常に安定であった。

既存の洗剤用液化型 α -アミラーゼは酵素構造の維持に必要なカルシウムを分子内に保持しており、キレート剤の存在下で安定性が低下することが知られている。これに対して

AmyK38 は、酵素分子中の金属分析より、カルシウムを保持していない全く新しいタイプの α -アミラーゼであることが明らかとなった。

3. シーケンスとモデリングによる AmyK38 の構造的特性解析

好アルカリ性 *Bacillus* sp. KSM-K38 株より、AmyK38 遺伝子を PCR 法および逆 PCR 法等により取得した。取得遺伝子断片には 501 アミノ酸残基をコードする ORF が存在し、480 アミノ酸残基からなる成熟酵素をコードしていることが明らかになった。推定アミノ酸配列には、 α -アミラーゼファミリーに共通な活性中心を形成する4つの保存領域が存在し、3つの触媒残基も保存されていた。また、*Bacillus licheniformis* α -アミラーゼ (BLA) の X 線結晶構造から予想される A、B および C のドメインを有し、液化型 α -アミラーゼに特有のループ領域も存在した。

組換え枯草菌による生産および生産酵素の特性を検討した。AmyK38 構造遺伝子を含むプラスミド pHSP-AmyK38 を *B. subtilis* ISW1214 株に形質転換して培養した結果、約 7,000 U/ml の組換え酵素の大量生産が可能となった（野生株での生産性は 約 0.6 U/ml）。また、酵素特性は野生型酵素とほぼ同様であった。

AmyK38 の保持する優れた特性、すなわち、酸化剤耐性および高度なキレート剤耐性を考察する目的で、BLA の立体構造を鋳型にして AmyK38 の分子モデリングを行った。BLA とモデリングにより構築した AmyK38 との活性中心領域での比較を行った結果、AmyK38 の酸化安定性は BLA の Met197 に相当するアミノ酸残基が非酸化性のロイシン残基であることが大きな要因と推定された。また、BLAとカルシウム結合領域の比較を行ったところ、AmyK38 ではカルシウムとの配位が困難な構造を有していることが判明した。

4. AmyK38 の分子系統学的解析

AmyK38の種々由来 α -アミラーゼあるいは澱粉関連酵素における進化系統樹を構築した。その結果、活性発現にカルシウムイオンを必要とせず、また結合残基の保存性も低い超高熱始原菌由来 α -アミラーゼとも進化論的に遠く離れており、分子系統学的にも新規な酵素であることが示唆された。また、系統樹構築に当たり、アルカリプルラーゼ遺伝子のクローン化に成功した。

5. 蛋白質工学による AmyK38 の耐熱化

AmyK38は、洗剤用として適した酸化剤・キレート剤耐性のアルカリ液化型 α -アミラーゼであるが、熱に対しては比較的不安定である。そこで自動食器洗浄機専用洗剤 (ADD) 配合におけるパフォーマンス向上を目的に、その洗浄条件 (50~60℃) に適応した熱安定性AmyK38 の構築を蛋白質工学により試みた。アプローチとしては、既知酵素との間でのキメラ酵素の構築および分子動力学 (MD) 計算による不安定因子探索の2つを行った。キメラ酵素の検討からは、N 末端側 19 アミノ酸残基を MTRG (蛋白質工学により酸化剤耐性および耐熱性を改良した AmyK 変異酵素) 型とすることによって耐熱性の向上が可能であることを見出した。MD法による熱振動によって、モデリング構造の変化を引き起こすと思われる部位の推定を試みた結果、AmyK38のドメインBの構造が大きく壊れることが判った。また、本ターン部位に Q167E/Y169K 変異を導入することにより、耐熱性が飛躍的に

向上することが明らかとなった。

さらに、上記2つのアプローチにより見出された安定化因子を組み合わせることにより、他の優れた酵素特性を失うことなく、耐熱性はさらに向上し、特に ADD 用として十分な特性を有する改良 AmyK38 の大量供給が可能となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之

学 位 論 文 題 名

酸化剤耐性とキレート剤耐性を有する

α -アミラーゼに関する研究

本論文は、図48、表13、引用文献109を含み、8章からなる総頁132の和文論文である。別に参考論文12編が添えられている。

洗剤には、衣類や食器類に付着した澱粉系汚れを除去する目的で液化型 α -アミラーゼが配合されるが、洗剤のpHはアルカリであり、酸化剤やキレート剤などを含むため、既存の酵素には安定性およびコスト面で問題があった。本研究は洗剤配合に適した液化型 α -アミラーゼの開発を目的に、蛋白質工学による既存アルカリ液化型 α -アミラーゼの改良を試みたが、十分な目的酵素が得られないことから、新たに目的に適う酵素生産菌を自然界よりスクリーニングし、酸化剤やキレート剤耐性の新規アルカリ液化型 α -アミラーゼを取得した。さらに、これに遺伝子工学的改変を加え、産業上応用可能な酵素の大量発現に成功した。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 蛋白質工学による既存アルカリ液化型 α -アミラーゼの改良

好アルカリ性 *Bacillus* 株由来アルカリ液化型 α -アミラーゼの酸化安定化を蛋白質工学的に試みた結果、酵素分子中のMet202を非酸化性アミノ酸残基に置換することにより、過剰の H_2O_2 に対しても耐性を有する変異酵素を作成することができた。しかし、変異による酵素活性の低下が大きく実用面には至らなかった。

2. 新規酵素のスクリーニングと酵素特性解析

そこで、洗剤配合に適した新規の α -アミラーゼを生産する微生物の探索を行い、新種の好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌、KSM-K38 株を土壌より分離した。電気泳動的に単一の酵素 (AmyK38) を精製し、各種性質を明らかにした。分子量は 55 kDa、最適 pH は 8.0~9.5、糖分解様式から液化型 α -アミラーゼと判

断した。AmyK38 は比活性が高く、洗剤配合成分である酸化剤およびキレート剤に対して安定であった。

既存の洗剤用液化型 α -アミラーゼは酵素構造の維持に必須なカルシウムを分子内に保持しており、キレート剤の存在下で安定性が低下することが知られているが、本酵素はカルシウムを保持しない全く新しいタイプの α -アミラーゼであることを明らかにした。

3. シークエンスとモデリングによる AmyK38 の構造的特性解析

AmyK38 遺伝子を取得し、480アミノ酸残基からなることを明らかにした。この配列には α -アミラーゼファミリーに共通な活性中心を形成する4つの保存領域が存在し3つの触媒残基も保存されていた。また、他の *Bacillus* α -アミラーゼのX線結晶構造から予想される A、B および C のドメインを有し、液化型 α -アミラーゼに特有のループ領域も存在した。

組換え枯草菌による酵素の生産を検討した結果、約 7,000 U/ml の大量生産が可能となった。また、酵素特性は野生型酵素とほぼ同様であった。

本酵素の持つ優れた特性、すなわち、酸化剤耐性および高度なキレート剤耐性に関与するアミノ酸残基を分子モデリングの手法により推定した。

4. AmyK38 の分子系統学的解析

AmyK38 および種々の起源由来の α -アミラーゼや澱粉関連酵素の進化系統樹を構築し、本酵素が活性発現にカルシウムイオンを必要とせず、また、結合残基の保存性も低い超高熱始原菌由来 α -アミラーゼとも進化論的に遠く離れており、分子系統学的にも新規な酵素であることを明らかにした。

5. 蛋白質工学による AmyK38 の耐熱化

AmyK38 が熱に対して比較的不安定であることから、既知酵素とのキメラ酵素の作成および分子動力学計算による不安定因子探索の2つの方法から耐熱化要素を推察し、両者からの安定化因子を組み合わせることにより、他の優れた酵素特性を失うことなく、耐熱性はさらに向上し、特に 自動食器洗浄機専用洗剤として十分な特性を有する改良 AmyK38 の大量供給を可能とした。

以上のように本研究は、新しい用途に適う新規 α -アミラーゼを取得し、その酵素学的特性を明らかにした。また、シークエンスとモデリングによる本酵素の構造的特性を解析するとともに分子系統学的解析を行った。さらに、実用化に向けた蛋白質工学による本酵素の耐熱化を検討し、その大量供給を可能としたものであり、学術的にもかつ産業的にも大いに価値ある成果と判断される。

よって審査員一同は、萩原浩が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。