

## 新規洗剤用プロテアーゼに関する研究

### 学位論文内容の要旨

プロテアーゼは、タンパク質系の汚れを分解し襟や袖の汚れ除去に有効であることから、大部分の衣料用洗剤に配合されている。筆者らは、1990 年代初めに好アルカリ *Bacillus* 属細菌が生産するアルカリプロテアーゼ (M-protease) を見出し、高生産化を行って衣料用コンパクト洗剤に配合した。しかし、M-protease は近年洗浄剤組成物として配合されるようになった漂白剤により速やかに不活化された。部位特異的変異の手法を用いた安定化については、改変に伴う酵素活性の低下が課題として報告されていたため、自然界からのスクリーニングにより優れた性能を有するプロテアーゼを取得することを検討した。

#### 1) 新規プロテアーゼ生産菌 *Bacillus* sp. KSM KP-43 株の菌学的性質

土壌試料から分離した *Bacillus* sp. KSM KP-43 株 (以下 KP-43 株) が、酸化剤耐性を有し、優れた洗浄力を有する KP-43 プロテアーゼ (以下 KP-43) を生産することを見出した。KP-43 株について分類学的性質を検討した結果、16S rDNA 遺伝子の解析から *B. halmapalus* DSM8723<sup>T</sup> と最も高い相同性を示したが、*B. halmapalus* DSM8723<sup>T</sup> は、5%の塩化ナトリウム存在下で生育できないこと、メリビオースおよびラムノースを生育に利用できないこと、Tween 20, 40 および 60 を分解できない点で、KP-43 株と生理学的小および生化学的性質を異にすることを明らかにした。さらに、KP-43 株と *B. halmapalus* DSM8723<sup>T</sup> は、DNA-DNA hybridization 解析の結果から相同性は低く (25%以下)、染色体 DNA の G+C 含量および細菌体脂肪酸の組成と構成比率も異なっていた。以上の結果から、KP-43 株はこれまでに報告された *Bacillus* 属細菌いずれの種とも一致せず、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の新種として分類されると推定された。

#### 2) KP-43 の酵素学的諸性質

KP-43 を単離・精製して酵素学的諸性質を検討した。従来の洗剤用プロテアーゼである Savinase (Novo 社), Maxacal (PB92 : Gist-brocades 社) そして M-protease (花王社) の分子量が 28 kDa であるのに対して、KP-43 は 43 kDa と大きな相違を示した。一方、阻害剤が酵素活性に与える影響の検討から、従来の洗剤用プロテアーゼ同様セリンプロテアーゼに分類されると考えられた。KP-43 は、高アルカリ領域で作用して安定であること、洗浄剤組成物である界面活性剤およびキレート剤等にも安定であり、洗浄剤への応用の要件を満たすと考えられた。最大の特長は、野生型の酵素でありながら酸化剤に対して高い安定性を示したことである。天然基質に対する分解能も M-protease 等と同等以上であり、洗浄性能についての詳細検討から、同一タンパク質量あたりの洗浄力が M-protease と比較して明確に優れていることがわかった。

### 3) KP-43 のクローニングとアミノ酸配列の推定

KP-43 のN末端アミノ酸配列をもとにプライマーを設計し、PCR 法によりクローニングを行って遺伝子を取得した。KP-43 遺伝子の塩基配列を決定してアミノ酸配列を推定したところ、206 アミノ酸から構成されるプレプロ領域と 434 アミノ酸から構成される成熟酵素領域から構成されていることがわかった。既存のスブチリシンとのアミノ酸配列の相同性は低かったが、活性中心を構成する 3 種類のアミノ残基（アスパラギン酸、ヒスチジンおよびセリン）は保存されており、C-末端に extension が存在するという特徴が認められた。また、組換え技術を用いた KP-43 の生産検討を行い、枯草菌 ANA1 株を用いて野生株と比較して約 25 倍の生産性が得られる発現系を構築した。

### 4) KP-43 の分子系統学的解析

特許菌株 4 種類（D-6 株, Y 株, NCIB12289 株および SD-521 株）が生産するプロテアーゼ（E-1, LP-Ya, NP-1 および SD-521）の諸性質を検討した結果、推定分子量は約 43 kDa で酸化剤に対する安定性を有し、KP-43 と類似した性質を示した。それぞれのプロテアーゼ遺伝子のクローニングを行いアミノ酸配列の推定を行った結果、互いに高い相同性を有する（>85%）ことが判った。一方、これらのプロテアーゼの進化論的位置は、スブチリシンのファミリーAの中で他のプロテアーゼ（true subtilisins, high-alkaline proteases および interacellular proteases）と非常に離れた位置に存在することから、oxidatively stable serine proteases (OSPs) として新たなクラスターに分類されると考えられた。M-protease 等のスブチリシンの酸化剤による不活化は、活性中心のセリン残基に隣接するメチオニン残基がスルフォキシド誘導体に酸化されることに起因することが報告されている。OSPs はいずれも活性中心のセリン残基（Ser<sup>255</sup>）に隣接するメチオニン残基（Met<sup>256</sup>）を有している。X 結晶構造解析の結果等から、Met<sup>256</sup> と触媒反応に重要な役割を果たすオキシアニオンホールとの距離が M-protease 等と比較して長いこと、近傍にメチオニン残基（Met<sup>251</sup>）が存在することにより、Met<sup>256</sup> が穏やかな酸化を受ける可能性があるかと推察している。

### 5) 新規プロテアーゼ LD-1 の取得

さらなる洗剤用プロテアーゼのスクリーニングを継続することにより、*Bacillus* sp. KSM LD-1 株が生産する新規アルカリプロテアーゼ LD-1（以下 LD-1）を取得した。本酵素は、耐熱性、アルカリ領域での作用及び安定性、洗浄剤組成物に対する安定性に優れ、衣料用洗剤中で良好な洗浄力を示したことから、洗剤用酵素として有望なアルカリプロテアーゼであることを確認した。LD-1 遺伝子のクローニングを行って塩基配列を決定するとともに、アミノ酸配列の推定ならびに分子系統学的解析を行い、LD-1 は、true subtilisins と high-alkaline proteases の中間的な位置にサブクラスターを形成することを明らかにした。

以上、従来の洗剤用プロテアーゼと比較して優れた性能を有するプロテアーゼの取得を目指して、自然界からスクリーニングを行い、土壌試料から分離した *Bacillus* sp. KSM KP-43 株が、酸化剤耐性を有し、優れた洗浄力を有する KP-43 プロテアーゼを生産することを見出した。なお、本プロテアーゼは遺伝子組換え技術の生産系への導入および変異育種による高生産化に成功し、2004 年から衣料用洗剤への配合を実施している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 田 篤

副 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 木 村 淳 夫

## 学 位 論 文 題 名

### 新規洗剤用プロテアーゼに関する研究

本論文は、和文 98 頁、図 26、表 11、7 章からなり、参考論文 9 編が付されている。

プロテアーゼは、タンパク質系の汚れを分解し襟や袖の汚れ除去に有効であることから、衣料用洗剤に配合されている。申請者らは、1990 年代初めに好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌が生産するアルカリプロテアーゼ M-protease（以下 M-protease）を見出し、高生産化を行って衣料用コンパクト洗剤に配合した。しかし、M-protease は近年洗剤組成物として配合されるようになった漂白剤により速やかに不活化された。部位特異的変異の手法を用いた安定化については、改変に伴う酵素活性の低下が課題として報告されていたため、自然界からのスクリーニングにより優れた性能を有するプロテアーゼを取得することを検討した。

#### 1) 新規プロテアーゼ生産菌 *Bacillus* sp. KSM KP-43 株の菌学的性質

土壌試料から分離した *Bacillus* sp. KSM KP-43 株（以下 KP-43 株）が、酸化剤耐性を有し、優れた洗浄力を有する KP-43 プロテアーゼ（以下 KP-43）を生産することを見出した。16S rDNA 遺伝子解析により、KP-43 株は *B. halmapalus* DSM8723<sup>T</sup> と最も高い相同性を示したが、染色体 DNA の相同性解析の結果から、両菌株の相同性は低い（25%以下）ことが判った。両菌株は、染色体 DNA の GC 含量および菌体脂肪酸の組成と構成比率にも差異があり、生育条件および糖の資化性も異にすることから、KP-43 株は、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の新種として分類されることを示した。

#### 2) KP-43 の酵素学的諸性質

従来の洗剤用プロテアーゼの分子質量が 28 kDa であるのに対して、KP-43 は 43 kDa と大きな相違を示した。KP-43 は、高アルカリ領域で作用して安定であること、洗剤組成物である界面活性剤およびキレート剤等にも安定であり、洗浄用酵素の要件を満たすと考えられた。最大の特長は、野生型の酵素でありながら酸化剤に対して高い安定性を示したことである。また、洗浄性能についての詳細検討から、同一タンパク質量あたりの洗浄力が M-protease と比較して明確に優れていることが判った。

#### 3) KP-43 のクローニングとアミノ酸配列の推定

KP-43 遺伝子を取得し、塩基配列を決定してアミノ酸配列を推定したところ、206 アミノ酸から構成されるプレプロ領域と 434 アミノ酸から構成される成熟酵素領域から成ることがわかった。既存の洗剤用プロテアーゼとのアミノ酸配列の相同性は低かったが、活性中心を構成する 3 種類のアミノ残基（アスパラギン酸、ヒスチジンおよびセリン）は保存されており、C-末端に拡張領域が存在した。

#### 4) KP-43 の分子系統学的解析

特許菌株 4 種類（D-6、Y、NCIB12289 および SD-521 株）が生産するプロテアーゼ（E-1、LP-Ya、NP-1 および SD-521）の諸性質を検討した結果、推定分子量は約 43 kDa で酸化剤に対する安定性を有し、KP-43 と類似の性質を示した。それぞれのプロテアーゼ遺伝子のクローニングを行いアミノ酸配列の推定を行った結果、互いに高い相同性を有する（> 85%）ことが判った。一方、これらの酸化剤耐性を有するプロテアーゼの進化論的位置は、スブチリシンのファミリーAの中で他のプロテアーゼ（真性スブチリシン、高アルカリプロテアーゼおよび菌体内プロテアーゼ）と非常に離れた位置に存在し、新たなクラスターを構成すると考えられた。

#### 5) 新規プロテアーゼ LD-1 の取得

スクリーニングを継続し、*Bacillus* sp. KSM LD-1 株が生産する新規アルカリプロテアーゼ LD-1（以下 LD-1）を取得した。LD-1 は、耐熱性、アルカリ領域での作用及び安定性、洗剤組成物に対する安定性に優れ、衣料用洗剤中で良好な洗浄力を示したことから、洗剤用酵素として有望なアルカリプロテアーゼであることを確認した。LD-1 遺伝子のクローニングを行って塩基配列を決定するとともに、アミノ酸配列の推定ならびに分子系統学的解析を行い、LD-1 は、真性スブチリシンと高アルカリプロテアーゼの中間的な位置にサブクラスターを形成することを明らかにした。

以上、自然界からスクリーニングにより、従来の洗剤用プロテアーゼと比較して優れた性能を有する 2 種類の新規プロテアーゼ、KP-43 と LD-1 を取得した。KP-43 は、野生型でありながら酸化剤耐性を示し、優れた洗浄力を有することから、洗剤用酵素として有用なことを明らかにした。また、既存の洗剤用酵素とは異なるユニークな構造を有し、進化論的に新しいクラスターを形成していることを示した。なお、KP-43 は遺伝子組換え技術の生産系への導入および変異育種による高生産化に成功し、2004 年から衣料用洗剤へ配合されている。以上の成果は、プロテアーゼの科学的理解に役立つだけでなく、研究成果の実用化の事例として価値を有するものである。

よって審査員一同は、佐伯勝久氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。