

# 酵素の高度利用技術に関する研究 —修飾酵素によるバイオ素材の開発—

茶谷悦司、北野道雄

## 要 旨

蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）を水溶性多糖類であるデキストランへ固定化する方法について研究した。その方法としては、まずデキストランを過ヨウ素酸ナトリウムで酸化してアルデヒド基を導入した後、酵素のアミノ基と結合反応させる共有結合法をとった。デキストランの酸化反応条件（酸化剤の量など）や、酵素—担体固定化反応条件（反応時のpHなど）について検討し、調製した固定化酵素の諸特性を評価した。この結果、酸化反応時の酸化剤の最適配合量、固定化反応時の最適pH、酵素—担体配合比を見いだすことができ、調製した固定化酵素の熱やpHの変化に対する安定性が向上していることが確認できた。

### 1. はじめに

古くから麻や絹の不純物の除去に酵素が利用されてきたが、繊維工業に積極的に用いられるようになったのは、 $\alpha$ -アミラーゼによる経糸澱粉糊の除去、プロテアーゼによる絹の精練からである。これらの用途にとどまらず、化学薬品では達成できない種々の優れた特徴をもった酵素は、繊維加工剤の一つとして将来有望視されており、一例としてここ数年、ジーンズのバイオポリッシュ加工、テンセル・ポリノジックの毛羽除去、風合い出し加工に用いられるセルラーゼが飛躍的に伸びていることなどがあげられる。

しかしながら、繊維素材の表面処理加工においては、酵素処理による繊維性能の劣化（強度低下など）をはじめ、酵素自身の安定性や回収などの問題点が指摘され、今後ますます利用度が高まってゆく中で適切な改良策が望まれている。とりわけ羊毛などの天然繊維は、

その繊維構造の複雑さゆえ、酵素による作用が偏在化することにより、内部保護と表面処理効果の均一性のバランスがとりにくいという問題をかかえている。

そこで本研究では、適当な水溶性高分子担体に酵素を共有結合法により固定化させることにより、この問題を解決すべく検討した。高分子担体に酵素を固定化することにより、

- (1) 酵素作用の繊維表面への偏在化
- (2) 熱やpHに対する安定性の改善
- (3) プロテアーゼの自食防止
- (4) 酵素の回収—再利用の可能性

などが期待できる。

ここでは酵素剤（プロテアーゼ）を水溶性多糖類であるデキストランに固定化する際の調製条件につき検討し、得られた固定化酵素の諸特性につき評価した結果を報告する。

## 2. 実験

### 2.1 使用した酵素剤、担体、その他の薬剤について

蛋白質分解酵素—プロテアーゼN（天野製薬）、および担体として用いたデキストランT-2000（ファルマシア）は、特に精製することなくそのまま使用した。過よう素酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウムは試薬をそのまま使用した。

### 2.2 固定化酵素の調製方法

デキストランとプロテアーゼの固定化には、デキストランを過よう素酸で酸化することにより生成したデキストランジアルデヒドに酵素のアミノ基を結合させる過よう素酸酸化法を採った。固定化酵素の調製フローを図1に示す。まずデキストランを蒸留水に溶解して10%溶液とした後、これを50mlとり、10%の過よう素酸ナトリウム水溶液を2.5~10ml加えて遮光下4℃で20時間反応させた。その後、3%の重亜硫酸ナトリウム水溶液を加え、過剰のよう素を除去した。この反応混合物を流水に対して透析し、デキストランジアルデ

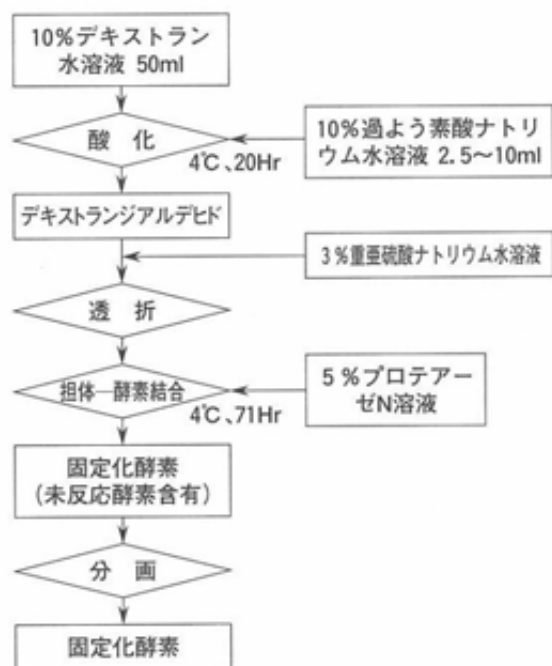


図1 固定化酵素の調製

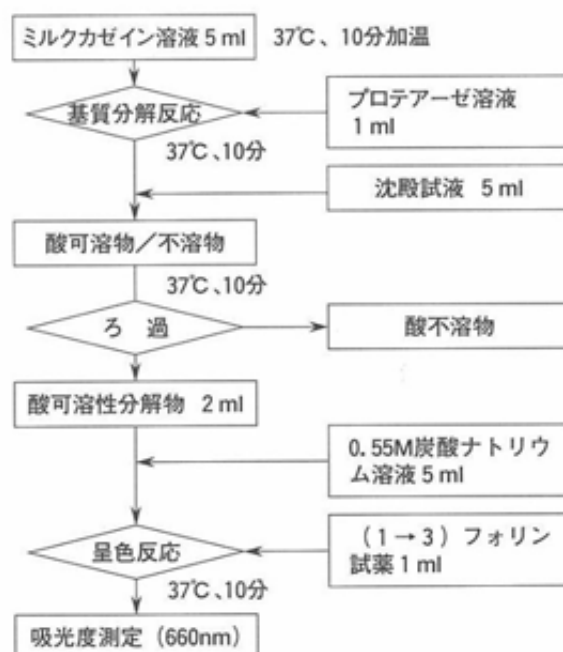


図2 蛋白質分解活性評価法

表1 ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布測定条件

Instrument	Intelligent HPLC System/Gulliver Series
Column	Shodex OHPak SB-804HQ
Eluent	20mM pH7 phosphate buffer+50mM KCl
Flow rate	0.5ml/min
Detector	UV(280nm)
Sample charge	100μl
Mw Standard	240,000 Katalase 68,000 Albumin 29,000 Carbonic Anhydrase 12,400 Cytochrome c

ヒドを得た。これに1~2当量の5%プロテアーゼN溶液（緩衝液でpH調整）を加え、結合反応を4℃で71時間進行させた。続いてこの反応混合物を分画分子量5万のフィルターでろ過することにより、未反応の酵素を除去して、固定化酵素を得た。

### 2.3 固定化酵素の蛋白質分解活性の評価

固定化酵素の蛋白質分解活性の評価は、日本薬局方の蛋白消化力試験法によった（図2）。すなわち、蛋白消化力はカゼインにプロテアーゼが作用するとき、ペプチド結合の切断にともなって増加する酸可溶性低分子分解産物の量をフォリン反応で比色測定して求めた。

また、この方法でフリープロテアーゼN（固定化していない生の酵素）の試料溶液濃度と

吸光度から検量線を作成し、これを用いて固定化酵素溶液中の有効酵素濃度を算出した。

## 2. 4 固定化酵素の分子量分布測定

使用した酵素、担体、及び固定化酵素の分子量分布を液体クロマトグラフィーのゲルろ過法で調べた。分析条件を表1に示す。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 固定化酵素調製方法の検討

#### (1) デキストランの酸化によるデキストランジアルデヒドの調製

酵素の固定化方法には共有結合法、イオン吸着法、包括法などがある。また担体にも天然高分子、合成高分子、無機物などがあり、これらの組み合わせは多様である。

ここでは担体として水溶性多糖類であるデキストランを使用した。デキストランは、乳酸菌に属する *Leuconostoc mesenteroides* などによってスクロースから生成する  $\alpha$  1→6結合を主体とする多糖である。菌株により  $\alpha$  1→6結合の含量が変動し、一般には65%以上の  $\alpha$  1→6結合を有するものをデキストランと呼ぶ。その部分加水分解物は血液増量剤や代用血漿として用いられている。

酵素との結合反応のための官能基をデキストランに導入するための、デキストラン糖鎖のアルデヒド化の反応には、過よう素酸ナトリウムを用いる酸化法をとった。この試薬でデキストランなどの多糖類を処理すると隣接の水酸基間で酸化が起こり、2molのアルデヒド基が生成する。これにプロテアーゼのアミノ基を結合させようとするものである。

デキストランジアルデヒドの調製は以下の手順で行った。デキストランT-2000の10%水溶液を50mlとり、これに10%の過よう素酸ナトリウム水溶液を2.5、5.0、7.5、10.0ml加え、遮光下で4℃、20時間反応させた。つ

ぎに3%の重亜硫酸ナトリウム溶液で過剰の過よう素を除去した後、透析チューブ（再生セルロースチューブ、分画分子量12,000～14,000）にこの反応混合物を入れ、流水に対し透析することによりデキストランジアルデヒドを得た。

表2 酸化反応条件と生成したアルデヒドの濃度

デキストラン/過よう素酸比	グルタルアルデヒド換算アルデヒド濃度 (mol/l)
100/5	$1.4 \times 10^{-2}$
100/10	$2.1 \times 10^{-2}$
100/15	$3.4 \times 10^{-2}$
100/20	$3.8 \times 10^{-2}$

\* 酸化反応温度：4℃ 酸化反応時間：20時間

過よう素酸の酸化により生成したアルデヒド基の存在を確認するため、シッフ反応で比色測定した。これは、過よう素酸による酸化で隣接する水酸基を持つ炭素間の結合が切断され生じたアルデヒド基とシッフ試薬とが反応してシッフ塩基を形成して、赤色ないし赤紫色の化合物に変わる反応を利用したものである。表2にグルタルアルデヒド換算のアルデヒド基のモル濃度を示す。ここに示したアルデヒド基のモル濃度は、グルタルアルデヒド試料溶液2mlにシッフ試薬0.2mlを混合し、20℃、15分反応させた後、560nmにおける吸光度を測定することによりアルデヒド濃度一吸光度の検量線を作成し、同様の操作で得た

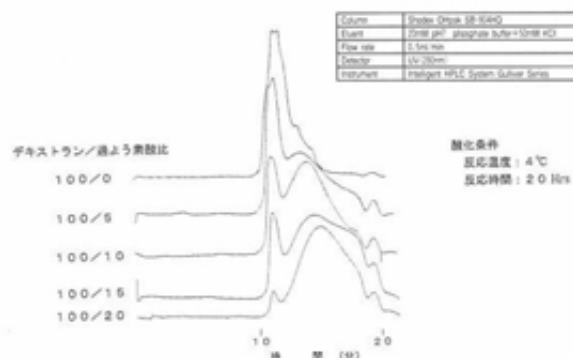


図3 デキストラン及びデキストランジアルデヒドのクロマトグラム

デキストランジアルデヒド試料の吸光度からアルデヒド濃度を算出したものである。過よう素酸の配合量の増加とともにシッフ反応後の吸光度が増加し、アルデヒド濃度が増加することが確認できた。

つぎに、上記の方法で調製したデキストランジアルデヒドの分子量分布を、ゲルろ過クロマトグラフィーで測定した結果を図3に示す。過よう素酸の配合比が増加するにつれ、デキストランの分子量が低下してゆくことがわかる。

## (2) デキストランジアルデヒド/酵素結合反応条件の検討

### 1) 固定化酵素の調製条件

多糖と蛋白質の結合には、プロモシアン (BrCN) によるアルキル化法<sup>1)</sup>と過よう素酸酸化によるジアルデヒド形成による方法<sup>1)</sup>が用いられている。一般に、酵素を担体に固定化する際の留意点として、収量 (結合反応効率)、酵素の活性維持、固定化操作の簡便性、未反応酵素と担体の分離などがあげられる。本研究で採用した過よう素酸酸化によるジアルデヒド形成による方法は、蛋白質のアミノ基と糖に生成したアルデヒドを結合させるものであり、酵素の活性をいたずらに低下させることなく、酵素の熱などに対する安定性を向上させるとされる。またこの反応は反応時のpH依存性が高く、pH8以下では反応が進行しにくいとされている<sup>2)</sup>。そこでここでは、この反応中に失活する酵素を最小限にとどめ、結合反応効率を最大とするための反応条件を見いだすべく、表3に示す結合反応条件で固定化酵素を調製した (図1の固定化酵素の調製フロー参照)。

調製した固定化酵素の特性評価は、固定化酵素液の性状の目視判定、蛋白質分解活性、熱安定性、分子量分布、収量などを測定する

表3 デキストランジアルデヒド/酵素結合反応条件

固定化条件番号	酸化反応条件 <sup>1)</sup>		結合反応条件 <sup>2)</sup>		固定化酵素液の性状 <sup>3)</sup>
	デキストラン/過よう素酸比	デキストラン/アルデヒド比	反応時のpH	反応時間	
1	100/5	1/2	9.5	20時間	○
2	100/10	1/2	9.5	71時間	○
3	100/15	1/2	9.5	71時間	○
4	100/20	1/2	9.5	71時間	○
5	100/10	1/1	9.5	71時間	○
6	100/10	2/1	9.5	71時間	○
7	100/10	1/2	7.0	71時間	×
8	100/10	1/2	8.0	71時間	×
9	100/10	1/2	9.0	71時間	○
10	100/10	1/2	10.0	71時間	○

\*1) 酸化反応温度: 4℃ 酸化反応時間: 20時間  
 \*2) 結合反応温度: 4℃ 結合反応時間: 71時間  
 \*3) ○: 良好 ×: デキストラン成分と酵素成分が分離

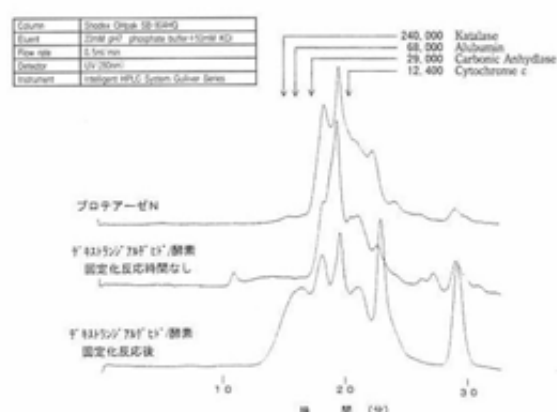


図4 プロテアーゼNと固定化プロテアーゼNのクロマトグラム

ことにより行った。

表3中に固定化酵素液の性状も同時に示した。pH8以下での結合反応においては、担体成分と酵素成分が分離し、デキストランジアルデヒドと酵素の結合反応が進行しにくいことがこの実験でも確認できた。

### 2) 固定化酵素の分子量分布

図4に固定化酵素調製に使用したプロテアーゼN (固定化していない生の酵素) とデキストランに固定化させたプロテアーゼNのゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) で測定したクロマトグラムを示す。GFC (サイズ分離) とは、溶液中でのサンプル分子の広がり具合 (三次元空間を占める体積) が大きいものほど早く溶出される原理を利用した分析法である。図中に分子量マーカーの溶出位置を矢印

で示した。プロテアーゼNのクロマトグラムから、プロテアーゼNは分子量1~3万のものが主成分であることがわかる。一方、デキストランジアルデヒドと酵素とを単にブレンドしただけの固定化反応時間なしと固定化反応後(表3中の固定化条件2)のクロマトグラムを比較することにより、固定化が進行すると15分前後のピークが増大し、プロテアーゼNの主成分である分子量1~3万のものが相対的に減少することがわかる。これはプロテアーゼNがデキストランに結合し固定化されたことを示すものである。このことから、15分前後のピークの増大と1~3万のピークの減少をもって固定化結合の進み具合をはかることとした。

まず、アルデヒド量や分子量分布の異なるデキストランを用いて調製した固定化酵素(表3の固定化条件1~4)の分子量分布を測定した結果を図5に示す。アルデヒド基を導入するために使用した過よう素酸の配合比が増加するにつれ、固定化された酵素の量が増加することを示す15分前後のピークの増大がわかる。これはデキストランに導入されたアルデヒド基の量が過よう素酸の配合量の増加にともなって増加し(表2)、固定化された酵素の量が増加したためと考えられる。

図6に結合反応させるデキストランジアルデヒドと酵素の重量比を1/2、1/1、2/1と

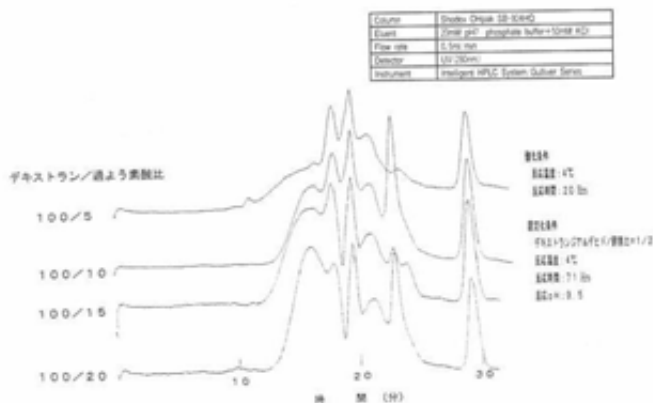


図5 固定化酵素のクロマトグラム①

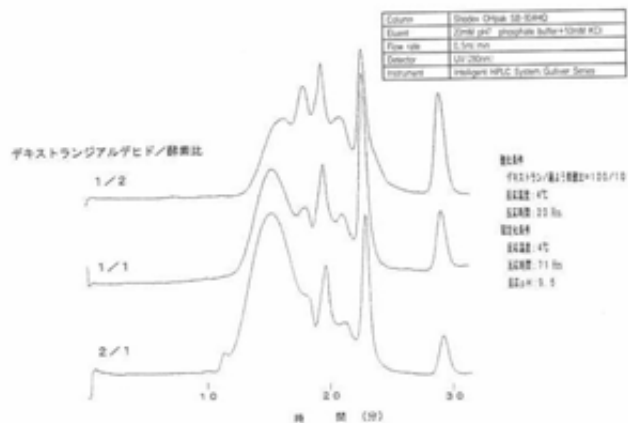


図6 固定化酵素のクロマトグラム②

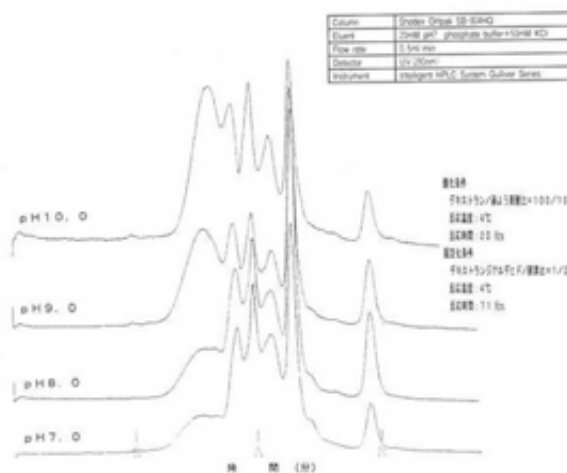


図7 固定化酵素のクロマトグラム③

したときの(表3の固定化条件2、5、6)クロマトグラムの変化を示す。デキストランジアルデヒドの配合比が増加するにつれ、固定化された酵素の量が増加することを示す15分前後のピークの増大がわかる。

図7にデキストランジアルデヒドに酵素を反応させる際のpHを7.0、8.0、9.0、10.0としたときの(表3の固定化条件7~10)クロマトグラムの変化を示す。pHが増加するにつれ、固定化された酵素の量が増加することを示す15分前後のピークの増大がわかる。アルデヒドとアミノ基の反応はpH依存性が高く、pH9以上でないと反応が進行しないといわれているが、ここにおいてもそのことが確認された。

### 3) 固定化酵素のタンパク質分解活性の評価

表4に固定化酵素の有効酵素濃度、収量、熱処理後の残存活性を示す。表4中の有効酵

表4 固定化酵素調製条件と酵素活性

固定化条件番号	有効酵素濃度 (μg/ml)	収量 (%)	熱処理後の残存活性 (%)
1	420	1.05	61.1
2	640	1.60	60.5
3	280	0.70	64.8
4	260	0.65	70.2
5	440	1.33	68.8
6	540	2.16	65.8
7	5800	14.5	92.1
8	5240	13.1	93.0
9	460	1.15	47.0
10	380	0.95	44.8
			(33.7)

\* 括弧内の数字は、フリープロテアーゼNの熱処理後の残存活性

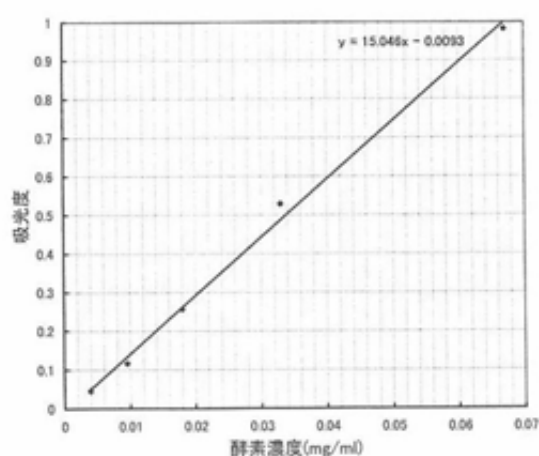


図8 プロテアーゼN濃度と吸光度

素濃度は、固定化操作後に溶液中に残存し、有効に蛋白質分解活性を示す酵素量を表すものである。これは、日本薬局方のたん白消化力試験法に基づき測定して求めたフリープロテアーゼNの試料溶液濃度と吸光度の検量線(図8)を作成し、同様の操作で得た固定化酵素試料の吸光度から算出したものである。

収量は、デキストランジアルデヒドに固定化させるために最初に投入したプロテアーゼNの量に対し、固定化操作後に溶液中に残存して有効に蛋白質分解活性を示す酵素の量がどれほどあるかを表すものである。

熱処理後の残存活性については、固定化酵素試料溶液を60℃、10分ウォーターバス中で熱処理した後室温まで冷却し、ミルクカゼイン基質と反応させたとき、熱処理を行わずに

基質と反応させたときに対しどれだけ分解活性が残存しているかを測定したものである。酵素の熱安定性が向上するほど高い残存活性を示す。

まず、酸化反応条件と有効酵素濃度、収量、残存活性について考察する(表3中の固定化条件1~4)。一般に、固定化された酵素の量が増加すると熱などに対する安定性が増すといわれている。分子量分布測定で確認したように、デキストランの酸化の度合いが増し、導入されるアルデヒド基が増加すると固定化される酵素の量が増え、熱に対する安定性が良くなることがわかる。一方、調製した固定化酵素の収量は、固定化される酵素量の増加にともない単純に増加せず、100/10で最大となった。これは、固定化が進みすぎると酵素の高次構造の乱れが生じたり、活性部位が失われたりするためと考えられる。

次に、デキストランジアルデヒド/酵素比と有効酵素濃度、収量、残存活性との関係について考察する(表3中の固定化条件2、5、6)。デキストランジアルデヒドの配合比が増すと、固定化される酵素の量が増え、熱に対する安定性が良くなることがわかる。一方、調製した固定化酵素の収量は、デキストランジアルデヒドの配合比が増すと増加する傾向を示した。

次に、固定化反応時のpHと有効酵素濃度、収量、残存活性との関係について考察する(表3中の固定化条件7~10)。pH9前後で、固定化酵素液の性状が激変し、pH8以下ではデキストラン成分と酵素成分が分離し結合反応が進まないことは前に述べたとおりである。一方、調製した固定化酵素中の絶対量を表す有効酵素量は、反応時のpHが上昇するのにもなって低下しており、固定化反応処理中に酵素が失活したことを示す。また残存活性については、固定化反応がうまく進んでいないにも



関わらず、pH8以下で高い残存活性を示した。これは酵素が担体には結合していないが包括されたような状態になっていると思われ、分画操作後も系中に残存した酵素が分解活性を示していると思われる。

このように固定化酵素の熱処理後の残存活性は、フリーの酵素と比較して高くなっていることが確認された。一方、収量は固定化(担体に結合)されなかった酵素が分画操作で取り除かれたり、固定化酵素の調製操作中に失活したりしていずれも低い値を示しており、最高でも10数%にとどまった。このことから、今後の課題として収量の向上が残された。固定化反応温度、反応時間、触媒の使用などの固定化条件、あるいは担体の選択、固定化方式の選択などの再検討が必要である。

### 3. 2 固定化酵素の諸特性評価

#### (1) 固定化酵素の熱安定性

3.1の固定化酵素調製方法の検討結果をふまえて、調製した固定化酵素の熱安定性を評価した。ここでは表3中の固定化条件2と8で調製したものとフリーの酵素との比較の上で試験した結果を図9に示す。熱安定性の評価は次の手順で行った。酵素溶液を20~70℃で60分熱処理した後、基質(ミルクカゼイン)と

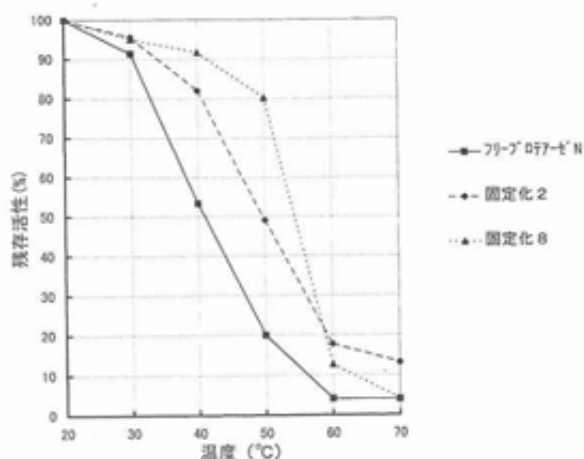


図9 固定化プロテアーゼNの熱安定性

反応させ、フォーリン試薬で発色したトリクロロ酢酸可溶性画分の660nmにおける吸光度を測定することにより分解活性を測定し、熱処理前の蛋白質分解活性を100として熱処理後の分解活性の残存量をプロットすることにより熱安定性を評価した。図9から明らかなように、40~50℃における残存活性がフリーの酵素と比較してかなり高くなっていることがわかる。一般に、共有結合による担体結合法で固定化した酵素は、熱、蛋白質変性剤、有機溶媒などに対してフリーの酵素よりも安定であるとされる。これは、担体と結合した酵素の高次構造が強固に保持されるためと考えられるが、この結果からもそれが確認できた。

#### (2) 固定化酵素のpH安定性

酵素分子の存在する環境のpHが酵素にとって好ましくない場合には、酵素分子の高次構造の乱れ、蛋白質分解酵素においては自己消化の促進、官能基の解離、あるいは解離の抑制などによる不活性化などが起こる。

表3中の固定化条件2で調製したものとフリーの酵素とを比較して、pH安定性を評価した結果を図10に示す。ここでは、酵素溶液を基質(ミルクカゼイン)とpH4~10の緩衝溶液中で反応させ、フォーリン試薬で発色したトリクロロ酢酸可溶性画分の660nmにおける吸光度を測定する方法で分解活性を測定し、

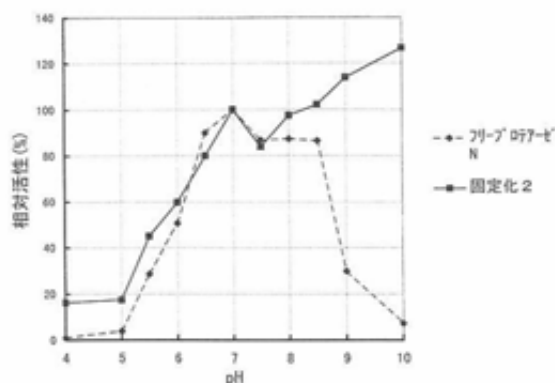


図10 固定化酵素のpH安定性

pH7における分解活性を100として各pHにおける相対活性をプロットすることによりpH安定性を評価した。フリーの酵素が中性付近に至適pHがあるのに対し、固定化酵素はpH7以上のアルカリサイドでも活性を維持することがわかった。

一般に、固定化酵素の至適pHは、担体にアニオン性のものを使用した場合は高pH側へ、カチオン性のものを使用した場合は低pH側へシフトする<sup>3)</sup>。ここで用いた担体デキストランはノニオン性であるが、アニオン性担体と同様な挙動を示した。

#### 4. まとめ

ここでは担体デキストランに共有結合法で酵素を固定化することを試みたが、この担体及び固定化方式を選択した理由として、

- ①デキストランに酵素と結合可能な官能基を導入しやすい
  - ②デキストランは代用血漿として用いられるなど人や環境に優しい素材である
  - ③酵素が担体の表面近くにあるため基質との接触が容易である
  - ④担体と酵素が共有結合しているため結合力が強く、反応中に酵素脱離がない
  - ⑤担体に導入したアルデヒド基は酵素のアミノ基と反応し、結合反応によりいたずらに酵素の活性を低下させない
- などがあげられる。

固定化条件につき種々検討した結果、酸化反応時の酸化剤の最適配合量、固定化反応時の最適pH、酵素—担体配合比等を見いだすことができ、調製した固定化酵素の熱やpHの変化に対する安定性が向上していることが確認できた。その一方、収量が低くなるという問題点が残った。この問題点を解決するためには、固定化条件の再検討が必要と考えら

れるが、ここで用いた担体（デキストラン）に共有結合法で固定化するという方法を採用し、限界があるように思われる。そこで重要となってくるのが担体の特性や固定化方式と特徴をよく把握した上で担体や固定化方式を決定し、調製方法を検討するということである。先に述べたとおり、酵素の固定化方式や担体の組み合わせで多様な固定化酵素が得られるが、目的にかなったものを得るためにはどのような固定化方式、担体を選択するのが最適であるかについての技術的情報は意外と少ない<sup>4,5,6)</sup>。固定化による酵素の特性変化は酵素ごとに異なり、それぞれについて最適の固定化方式、担体を探し出すことが重要である。これらが明確になってくれば、繊維加工分野のみにとどまらず、洗剤、化粧品などへの添加酵素の安定化など固定化酵素の応用は広範な分野で開かれるであろう。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり、固定化酵素の調製方法についてご助言を賜った天野製薬株式会社中央研究所の平野賢一氏に対し深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Tam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2128 (1976)
- 2) G. E. Means, R. E. Feeney, *Biochemistry*, 7, 2192 (1968)
- 3) E. Katchalski, I. Silman, R. Goldman, *Adv. in Enzymol.*, 34, 445 (1971)
- 4) 特開平, 6-341067
- 5) 小寺 洋、稲田祐二、高分子論文集, 48, 261 (1991)
- 6) 林 寿郎、繊維機械学会誌, 45, P245 (1992)