

トランスグルタミナーゼを用いた酵素の安定化

茶谷悦司^{*1}、北野道雄^{*1}

Stabilization of Enzyme using Transglutaminase

Etsushi CHAYA, Michio KITANO

Owari Textile Research Center, AITEC^{*1}

繊維加工に酵素剤を用いる場合の問題点として、熱や薬品に対する安定性の低さがある。そこで、たんぱく質中のグルタミン残基とリジン残基間の架橋を触媒する酵素であるトランスグルタミナーゼを用いてプロテアーゼ、セルラーゼ等の繊維加工に使用される酵素剤の安定化を図るべく検討した。酵素剤ごとにトランスグルタミナーゼと反応させる際の最適 pH、最適温度、最適酵素量などを決定した。最適条件で反応させることにより調製した修飾酵素剤は、未修飾のものに比べて耐熱性が向上した。

1. はじめに

綿繊維は、原綿の内部を保護するため一次壁にセルロース以外の成分(ペクチン、ワックス、たんぱく質など)を多量に含んでいる。これらの成分は、染色工程において染液の浸透を妨げ、むら染めの原因となるため精練工程で取り除かれる。一般的に綿の精練は苛性ソーダを用いて 100 近くの高温で行われているため、廃水処理、エネルギーコスト、作業環境等に問題を抱えている。そこで温和な条件で処理可能な酵素精練が注目を集めるようになり、実験室レベルのみでなく実用化に向けた実機レベルの検討が行われるようになった¹⁾。まずペクチナーゼを用いたバッチ式酵素精練が検討され、ペクチン除去率がアルカリ精練より若干劣るものの吸水性は良好で染色工程へ移っても問題ないことが確認された。次に連続精練も検討されたが、アルカリ精練よりも反応時間を長くとる必要があり、精練効果(ペクチン除去率、吸水性)も劣ることがわかった。

綿の一次壁には種々の夾雑物が含まれているため、それらを除去するためには一種類の酵素のみでは不十分である。そこで、プロテアーゼ(たんぱく質の除去)、リパーゼ(ワックスの除去)、セルラーゼ(セルロースの除去)、ペクチナーゼ(ペクチンの除去)などを単独あるいは併用して用いる検討もなされている²⁾。プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼは、単独使用した場合精練効果が低く、併用する必要があった。また、これらの酵素を併用する場合、各々の酵素の至適温度、pH の相違から二浴処理する必要があった。

これらの検討から、綿の酵素精練の実用化のためには、反応時間の短縮、精練効果の向上、一浴化が達成されな

くてはならないことが確認された。酵素の耐熱性、耐薬品性などが向上し、反応条件の幅が広がれば、複数の酵素を使用した一浴同時処理が可能となり、工程の短縮、エネルギー消費削減が図られ実用化に近づくと考えられる。そこでここでは綿の精練に使用される酵素をトランスグルタミナーゼ(以下 TGase と略す)を用いて修飾処理し、熱安定性を向上させるべく検討した。

2. 実験方法

2.1 使用酵素剤の選定

酵素剤としてはプロテアーゼ(H社製 *Bacillus subtilis* 起源 900U/mg^{*1})、セルラーゼ(H社製 *Aspergillus niger* 起源 4U/mg^{*2})、ペクチナーゼ(N社製 3U/mg、H社製 *Rhizopus sp.* 起源 8U/mg)を選定した。また TGase は、微生物起源(*Streptoverticillium sp.*)のもの(A社製 1U/mg^{*3})を使用した。(*1: ミルクカゼインを基質とし、30、1分間に 1μg のチロシンに相当する呈色物質の増加をもたらす酵素量を 1U とする。 *2: カルボキシメチルセルロースナトリウムを基質とし、40、1分間に 1μmol のグルコースに相当する還元力の増加をもたらす酵素量を 1U とする。 *3: ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンを基質とし、37、pH=6.0、1分間に 1μmol のヒドロキサム酸を生成する酵素量を 1U とする。)

2.2 TGase による酵素修飾反応

選択した酵素剤を緩衝液(pH=3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0)に溶解し、恒温槽中で TGase と反応させた。反応温度は 20, 30, 40, 50, 60, 70 とした。反応時間は 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 分とした。

*1 尾張繊維技術センター 加工技術室

2.3 各酵素に対する TGase の反応性確認

酵素剤が TGase の良い基質となるかどうか (TGase の作用を受け架橋結合が進行するか否か) を判断するために、TGase で修飾処理した変性酵素剤の SDS-PAGE 電気泳動を行った。泳動は、15% の分離ゲル (Bio-Rad レディーゲル J) を用い 200V 定電圧で 50 分を行った。染色は Bio-Rad BioSafe CBB G-250 で行った。

2.4 酵素活性評価方法

プロテアーゼ活性は、ミルクカゼインを基質とし、30 で 10 分間反応を行った後の TCA 可溶成分をフェノール試薬で呈色させ、660nm の吸光度を測定することにより評価した。

セルラーゼ活性は、カルボキシメチルセルロースを基質とし、初期粘度と 40 で 5 分間反応させた後の粘度を測定し、粘度低下率を算出することにより評価した。

2.5 熱安定性評価方法

TGase で修飾されていない未修飾のプロテアーゼと、TGase で修飾された修飾プロテアーゼを、30、40、50、55、60、65、70、75、80 で 10 分間熱処理した後の残存活性を測定した。

また、60 で所定時間熱処理した後の残存活性も測定した。

同様に TGase で修飾されていない未修飾のセルラーゼと、TGase で修飾された修飾セルラーゼの熱安定性を評価した。

3 . 実験結果及び考察

3.1 各酵素に対する TGase の反応性

TGase は、たんぱく質中のリジン残基の ϵ -アミノ基に作用し、グルタミン残基の γ -カルボキシアミド基との間に (Glu)Lys 架橋結合を触媒する。たんぱく質のゲル形成性、耐熱性、耐水性、耐酸性などを改良することができるため主に食品加工分野への応用が試みられている³⁾。

酵素剤が TGase の良い基質となれば、分子間あるいは分子内架橋されることにより高次構造が安定し、熱や pH 変化に安定な変性酵素剤が得られると考えられる。たんぱく質が TGase の基質となり架橋重合化してゆく過程を SDS-PAGE で解析すると、反応の進行に伴って分離ゲルに入らない巨大分子が形成されるのが観測できる⁴⁾。図 1 に TGase で修飾したプロテアーゼの SDS-PAGE 電気泳動図を示した。反応の進行に伴いほとんど泳動されない巨大分子量のたんぱくが増加することがわかる。プロテアーゼを含む酵素剤中の成分が TGase のよい基質となり、分子間架橋されることにより高分子量化したものと考えられる。

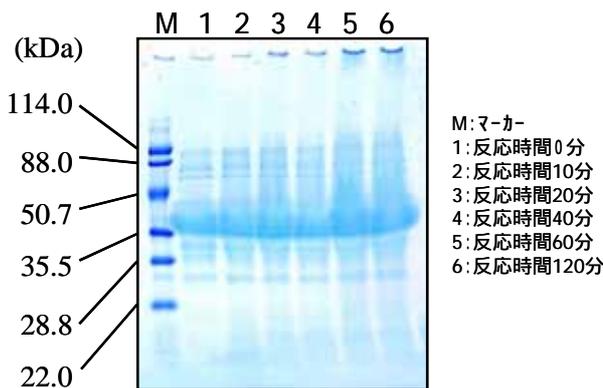


図 1 TGase で修飾したプロテアーゼの SDS-PAGE 電気泳動図 (反応温度: 20)

同様にセルラーゼやペクチナーゼについても TGase のよい基質となり、架橋が進行することが確認された。また、プロテアーゼと反応させる際にはプロテアーゼ活性の高い温度、pH で TGase と反応させると、TGase が消化されたり、自己消化することにより低分子量化することが電気泳動図から確認され、反応条件を慎重に検討することの必要性が示唆された。

3.2 TGase 反応条件の検討

3.2.1 プロテアーゼとの反応条件の検討

プロテアーゼと反応させる TGase の量を検討した。反応させる TGase の量を増加させるにしたがってミルクカゼイン消化力で評価した熱安定性 (残存活性) が向上するが、最適以上量の TGase を添加すると残存活性が低下した (図 2)。これは過反応により酵素が高分子量化・

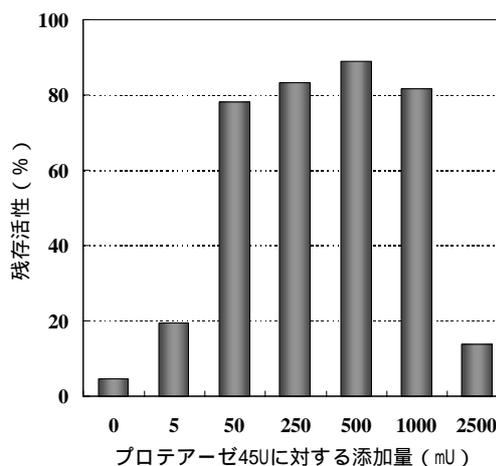


図 2 TGase 添加量と酵素活性 (TGase とプロテアーゼを 20、30 分反応した後、60、10 分熱処理した後の残存活性)

不溶化し、活性を失ったためと考えられる。プロテアーゼ 1 U に反応させる TGase の最適量は 5 ~ 20mU であった。

反応時の pH については 6.0 付近が適当であった (図 3)。pH 7.0 以上で反応させると残存活性が極端に低下した。pH 7.0 以上では TGase がプロテアーゼにより消化されるため架橋反応が進行せず、プロテアーゼの安定化が図られなかったと考えられる。また反応温度については、プロテアーゼ活性が高い温度範囲 (40 ~ 50) で反応を行うと TGase が消化されるため架橋反応が進行せず残存活性が低下した。

反応時間は 60 分程度が適当であった。

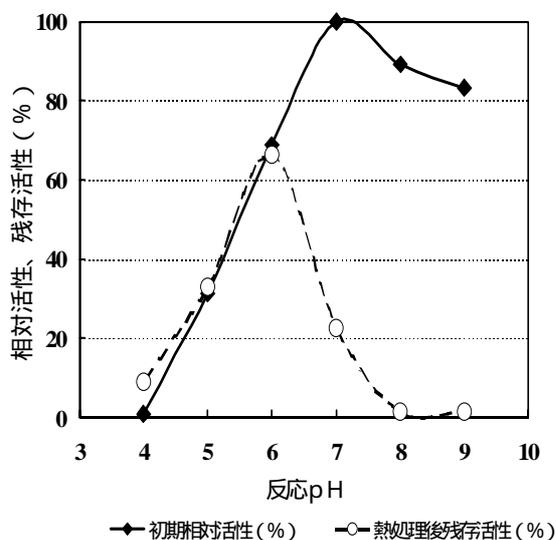


図 3 反応 pH と酵素活性

(TGase とプロテアーゼを各 pH で 20 、 60 分反応した後の初期活性と、60 、 10 分熱処理した後の残存活性)

3.2.2 セルラーゼとの反応条件の検討

セルラーゼと反応させる TGase の量を変え修飾酵素剤を調製し、70 で 10 分熱処理した後の残存活性を評価した。セルラーゼ 1U に反応させる TGase の最適量は、1 ~ 5U であった。反応時の pH や温度についてはプロテアーゼの時より条件は緩やかであるが、過反応による失活に注意せねばならないことはプロテアーゼと同様であった。最適反応温度は 20 ~ 30 、最適 pH は 7.0 付近であった。

反応時間は 60 分程度が適当であった。

3.3 TGase で修飾処理した酵素の熱安定性評価

3.3.1 TGase で修飾処理したプロテアーゼの熱安定性

TGase で修飾処理した修飾プロテアーゼと未修飾プロテアーゼを各温度で 10 分間熱処理した後、残存活性を評価した。その結果を図 4 に示す。未修飾プロテアー

ゼは 55 以上の温度で急速に失活した。一方修飾プロテアーゼは 60 においても 70% ほど活性を保持していた。TGase を用いた修飾処理で 5 ~ 10 ほど耐熱性が向上した。

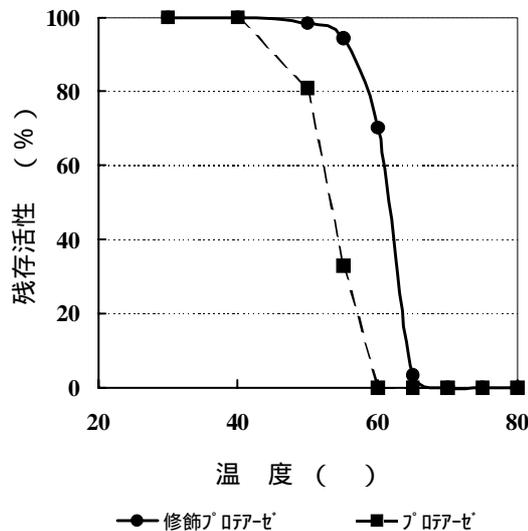


図 4 熱安定性評価結果

(各温度で 10 分熱処理した後の残存活性)

次に、60 における熱安定性を評価した結果を図 5 に示す。未修飾プロテアーゼは数分で急速に失活した。一方修飾プロテアーゼは 10 分経過後も 60% ほど活性を保持していた。20、30 分後においても活性は残存していた。その後活性は徐々に失われ、50 ~ 60 分後には完全に失活した。

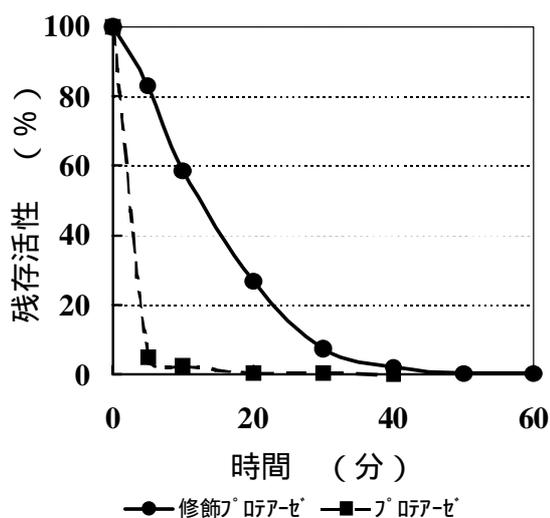


図 5 60 における熱安定性評価結果

(60 で所定の時間熱処理した後の残存活性)

3.3.2 TGase で修飾処理したセルラーゼの熱安定性

TGase で修飾処理した修飾セルラーゼと未修飾セルラーゼの 70 における熱安定性を評価した。未修飾セルラーゼは 60 分後に 10% 活性を保持するにとどまったが、TGase で修飾処理した変性セルラーゼは 60 分経過後も 50% 以上活性を保持していた。

4. 結び

酵素剤の安定性を向上させる目的で様々な酵素の化学修飾が試みられている。例えば、治療用酵素として用いられているウリカーゼ、アスパラギナーゼ、ストレプトキナーゼ等をポリエチレングリコールで修飾し、血中でのクリアランスや抗原性を改善する方法⁵⁾、スーパーオキシドジスムターゼを多糖類、ポリエチレングリコールで修飾し、抗原性抑制や熱安定性向上を図る方法⁶⁾などが提案されている。ポリエチレングリコールやデキストランといった高分子で修飾し安定化を図ろうとすると、一般に活性が大幅に損なわれる場合が多い。また、グルタルアルデヒドなどの架橋試薬の場合、高分子量化による活性低下や、不溶化などが生じるため、期待された効果が発揮できない場合が多い。TGase での修飾処理においても適切な反応条件をとらないと同様の問題が発生すると考えられる。ここで選択した酵素が TGase の良い基質となるので、分子内のみならず分子間架橋が進行することにより高分子量化し活性低下、さらには不溶化を引き起こす恐れがある。そこで、ここではこれらのことに留意して、選択した酵素剤に反応させる TGase の最適添

加量、反応温度、pH 等を検討した。選択した酵素ごとに最適条件を見だし、調製した修飾酵素の熱安定性が向上することを確認した。また修飾処理により活性が大幅に失われないことも確認した。修飾酵素の安定性が向上したことにより、複数の酵素を用いた綿精練の一浴化や、漂白や染色といった他の工程との同時処理の可能性が広がったと考えられる。

しかし、TGase をはじめとする架橋剤を用いる安定性の向上には限界があるのも事実である。劇的に安定性を向上させることが難しいばかりでなく、不溶化による活性低下の問題も解決する必要がある。修飾酵素調製時のみならず、保管中に架橋反応が進む可能性もある。修飾酵素調製後に TGase のみに有効な阻害剤を添加する等の過反応を抑える工夫が必要である。

文献

- 1)高岸徹：繊維学会誌, **57**, P125 (2001)
- 2)Usa Sangwatanaroj, Kingkamol Choonukulpong, Mitsuo Ueda: *AATCC REVIEW*, **3**, 17 (2003)
- 3)本木正雄、添田孝彦、安藤裕康、松浦明：日本農芸化学会誌、**69**(10), 1301 (1995)
- 4)K. Ikura, T. Kometani, M. Yoshikawa, R. Sasaki and H. Chiba: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1567 (1980)
- 5)特公昭 6 1 - 4 2 5 5 8 号、特開昭 5 7 - 1 1 8 7 8 9 号公報
- 6)特開昭 5 8 - 1 6 6 8 5 号公報