



# 極限酵素が切り拓く未来

## 中村 聡 研究室～生物プロセス専攻



中村 聡 教授

ヒトは、強酸性や強塩基性の液体に触れると皮膚を損傷する。もちろん、このような液体の中に浸かることはできない。しかし、この地球上には強酸・強塩基性の水中で生息している生物もいる。また、100度を超える熱湯中や、死海など塩濃度の高い場所にまで、生物の存在が確認されている。では、こういった生物はどのような仕組みによって厳しい環境に適応しているのだろうか。

この生物たちの持つタンパク質に注目し、その仕組みを実用化しようと酵素の研究をしている中村聡教授に話を伺った。



## 極限環境の微生物と酵素

中村研究室では、塩濃度の高いところを好んで生息する好塩菌、高圧によって水温が100度を超える海中に生息している好熱菌、塩基性の強い環境を好む好アルカリ菌の三つを研究している。

好塩菌や好熱菌、好アルカリ菌は極限環境に暮らす微生物の一種だ。極限環境とは、生物が生きていくには大変厳しい環境のことであり、主にタンパク質が壊れやすい場所を言う。タンパク質は体を構成する物質であるため、昔は極限環境では生物は生息できないと考えられていた。しかし近年、塩濃度の高い環境や高温環境、強酸・塩基性環境など、タンパク質の壊れやすいさまざまな環境においても、生物の存在が確認されている。このような、極限環境に住む微生物は、極限環境微生物と呼ばれている。

厳しい環境に耐えるために、極限環境微生物は特殊な仕組みや独特のタンパク質を持っていると推測できる。それらを研究することで、高塩濃度や高温、強塩基性の環境においても使える酵素が得られるのではないかと。このような考えのもと、極限環境微生物の持つ酵素（極限酵素）は多くの研究室で研究されている。なお、酵素とは、タン

パク質でできた生体触媒のことである。

極限酵素の研究は環境対策や産業に大きく貢献している。たとえば、極限酵素を用いている日用品として洗剤が挙げられる。洗剤液は通常アルカリ性を示すため、耐アルカリ性の極限酵素を加えることによって洗浄効率を高めることができるのだ。実際に、洗濯洗剤に酵素が用いられるようになってから、一度に必要な量がカップ1杯からスプーン1杯に減った。また、犯罪捜査においても極限酵素が活躍している。PCRという技術ではDNAの複製を触媒する耐熱性酵素であるDNAポリメラーゼが使われており、犯行現場に落ちているわずかな髪の毛や血痕から人物の特定をする際に広く利用されている。

中村研究室では、これらの酵素に対してタンパク質工学を用いて研究を行なっている。タンパク質工学とは、天然に存在するタンパク質の構造を少し変えることで、便利な物質を創ろうとする学問および技術である。タンパク質の構造を変える際には、タンパク質の設計図が書かれているDNAの方に手を加えるという手法が用いられている。タンパク質は構造が複雑なので、構成する

アミノ酸の一つ二つだけを直接換えることは現存の技術ではできないからだ。タンパク質は数多くのアミノ酸が連なってできており、アミノ酸の配列順序はDNAに書かれている。DNA上にある塩基の並び方によって、アミノ酸の順序が決定されているのである。タンパク質工学では、この塩基配列を変えて変異DNAを創り、そこから変異タンパク質を創り出すのである(図1)。

このタンパク質工学を用いて、中村研究室ではどのような研究をしているのか。次の章では、好塩菌、好熱菌、好アルカリ菌の3つの微生物に関する研究について紹介する。

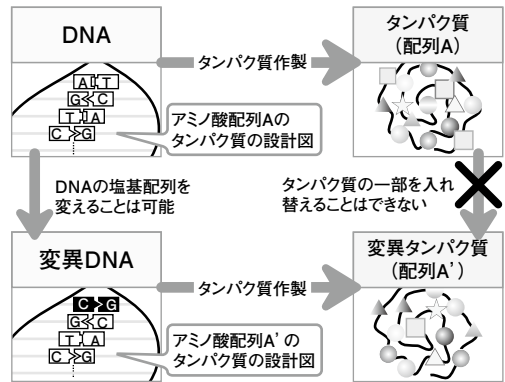


図1 タンパク質工学の手法



## 好塩菌、好熱菌、好アルカリ菌

### 好塩菌

塩濃度の大変高い環境を好む微生物を高度好塩菌という。日本で最初に発見された高度好塩菌は、中村研究室の前任の教授に当たる掘越教授により塩田で発見されたものだ。微生物は球に近い形をしているものが多いが、掘越教授の発見したこの高度好塩菌は変わった形をしていた。なんと三角形の平板状だったのだ。その形から、この好塩菌は三角菌と名付けられた。中村研究室では、三角菌について、形に関する研究と、耐塩性に関する研究の両方を行っている。

三角菌の形についての研究で、 $Mg^{2+}$ が周囲に全くない環境では、三角菌でも一般の菌のように球状になるということがわかっている(図2)。三角平板状のときに三角菌を調べてみると表面を覆うように存在しているタンパク質があることから、中村先生はこれが形の構成に関与しているのではないかと考えている。しかし、このタンパク質の有無と三角平板状になることとの関連性については未だわかっていない。

耐塩性に関する研究についても紹介しよう。普通の生物は塩濃度の高いところでは生きられない。塩濃度が極端に高いと $Na^+$ や $Cl^-$ のまわりに水分子が集まるために、生きていく上で必要な水分が奪い取られ、塩析が起ってしまうからだ。しかし、三角菌は塩濃度の高いところを好むので、そのような環境でも生きていけるだけの必要最低限の水分を確保する仕組みが三角菌のタンパク質

にはあるはずだ。

そのメカニズムを解明するために中村先生が着目したのは、三角菌の持つタンパク質の一つであるフェレドキシンという電子伝達タンパク質だ。フェレドキシンは、耐塩性のない植物中にも存在するが、三角菌のものと植物のものとは構造がわずかに異なる。そこで、三角菌のフェレドキシンを植物のフェレドキシンと比較すれば、耐塩性の仕組みがわかると考えた。

三角菌と植物のフェレドキシンを比較したところ、三角菌のものに酸性のアミノ酸が多く含まれていることがわかった。今までの研究からも、フェレドキシンに限らず多くのタンパク質において、好塩菌由来のものには酸性アミノ酸が多く含まれ

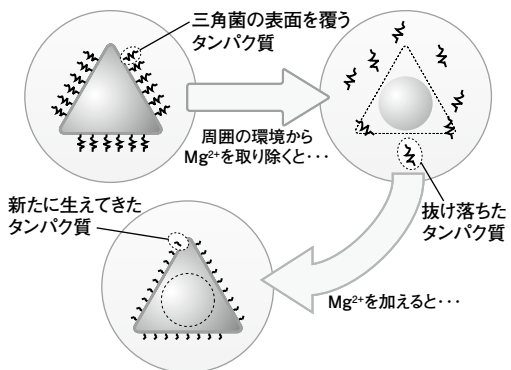


図2 三角菌の形と $Mg^{2+}$ の関係

ていることが統計的にわかっている。

中村先生は、酸性アミノ酸が耐塩性に関与しているとすれば、それは次のようなメカニズムによるものと考えている(図3)。酸性アミノ酸は分子中にカルボキシル基を多く持っているため、水分子をとらえて水和しやすい。このため、酸性アミノ酸を多く含むタンパク質は、水分子が少ないところでも水を保持できるのだ。

酸性アミノ酸が本当に耐塩性に関与しているのか、他にも要因があるのか、確かなことはまだわかっていない。三角菌の形そのものについても、研究の切り口になりそうなタンパク質に目をつけたばかりである。今後、三角菌のどのような秘密が解き明かされていくのか興味深いところだ。

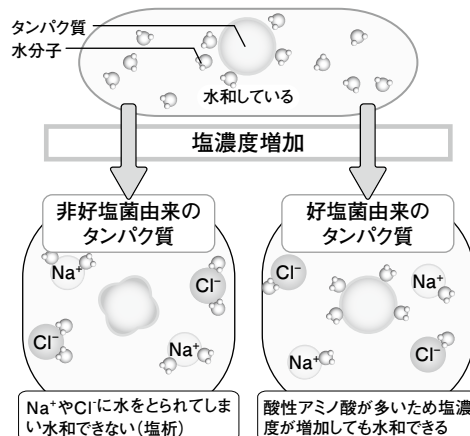


図3 好塩菌のタンパク質の特性

## 好熱菌

塩を好む好塩菌の次は、熱を好む好熱菌をみていこう。タンパク質は通常、高温環境下では変性してしまい、元に戻らない。体内のタンパク質がほとんど変性してしまうような環境では、生物は生きることができないはずだ。

好熱菌は熱に耐えるために、何らかの仕組みを持っていると考えられる。中村研究室では、複数の好熱菌からある同一の酵素(3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ; アミノ酸合成酵素の一種)を採り、この仕組みを研究している。この酵素は、同一のタンパク質が二つ組み合わせさせた二量体構造をしており、二量体となることではじめて触媒として働く。二量体を構成するタンパク質一つ一つはサブユニットと呼ばれている。

中等度の好熱菌から採ってきた3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼにさらに耐熱性を持たせるために、先生は酵素の二量体構造に着目して二つの方針をたてた。サブユニット同士の相互作用と、サブユニット単体の耐熱性に注目したのである。

一つめのアプローチは、二量体を構成するサブユニット同士の相互作用を強めるというものである。サブユニットは接触部分にそれぞれ二つずつ $\alpha$ -ヘリックスと呼ばれる螺旋構造を持っている。この螺旋構造が集まることによって二量体となるのだが、螺旋構造同士が共有結合をしているわけではない。接触部分の螺旋構造に含まれる疎水性のアミノ酸が、水に溶けたときに疎水部を

覆い隠すように集まっているだけなのだ(図4)。そこで、先生は、螺旋構造に含まれる親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置き換えることで、二量体構造が保たれやすくなると考えた。

実際に、接触部分にある親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置き換えて、いくつかのタンパク質を創り出した。すると、セリンをアラニンに、グルタミン酸をロイシンに置き換えたものが、もとの酵素より17度高い耐熱性を示した。たった二つのアミノ酸を置き換えただけで17度も耐熱性が向上するのは、なかなか例のないことである。

二つめのアプローチとして、先生は二量体をつくるそれぞれのサブユニットの耐熱性を向上させることを考えた。高度好熱菌由来のタンパク質と比較することで、サブユニット一つ一つの安定化を図ったのである。高度好熱菌由来の酵素にはプロリンというアミノ酸が多かった。プロリンはタ

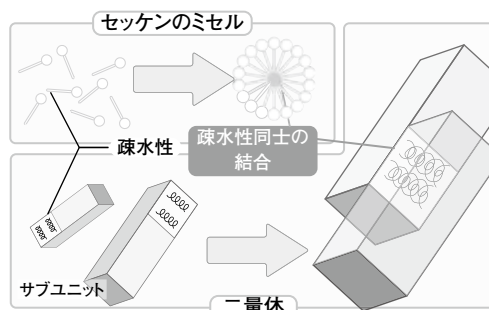


図4 疎水性による結合

ンパク質主鎖の構造において柔軟性を低下させる働きを持つので、プロリンを多く含むタンパク質は強固な構造を持っている。先生は、中等度好熱菌由来の酵素における不安定な領域にプロリンを増やすことで、より安定なサブユニットを創り出せるのではないかと考えた。

そこで、一つ目のアプローチにより耐熱性を向上させたタンパク質をもとに、不安定領域のプロリンを増やした変異タンパク質を創り出した。ここにあるアラニンをプロリンに変えたのである。また、このときプロリン導入による構造のひずみ

をなくす目的で、隣にあるトレオニングリシンに変えるという操作も行った。この二つのアミノ酸置換により、耐熱性をさらに7度上げることに成功した。天然タンパク質からたった四つのアミノ酸を変えただけで24度も耐熱性が上がったというのは前例のないことであり、これを上回るような結果は世界的に見ても未だない。

中村研究室では、耐熱性の仕組みを解明して他のタンパク質にも応用するために、現在でも3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼの研究を続けている。

## 好アルカリ菌

今まで、好塩菌と好熱菌をみてきた。好塩菌も好熱菌も、体内まで高塩濃度、高温環境になっていて、作り出す全てのタンパク質が耐塩性、耐熱性を獲得することで環境に適応してきた生物であった。しかし、これから紹介する好アルカリ菌は、体内までアルカリ環境になっているわけではない。体内のpHをコントロールする仕組みを持っており、体内は常に中性に保たれているのである。ゆえに、耐アルカリ性を持つ酵素を研究するためには、好アルカリ菌が体外のアルカリ環境に分泌する酵素を研究しなければならない。

中村先生が研究対象に選んだのは、多糖キシランの加水分解酵素であるキシランナーゼだ(図5)。キシランナーゼの利用法にはさまざまなものがあるが、主にキシロオリゴ糖の生産とパルプの漂白が挙げられる。

キシロオリゴ糖とは、キシランを構成している単糖であるキシロースが数個連なった糖である。この糖の代表的な利用法は以下の二つだ。まず、キシロオリゴ糖は人工甘味料として用いられている。ヒトはキシロオリゴ糖に甘味を感じるが、栄養素として吸収することはできない。さらに、キシロオリゴ糖は腸内細菌のエサにもなるため、糖尿病患者やダイエット中の人でも安心して取ることができる甘味料として利用されている。また、キシロオリゴ糖の保湿作用を利用してファンデーションなど一部の化粧品にも用いられている。

耐アルカリ性のキシランナーゼはパルプ漂白補助剤に用いられている。紙の主成分であるセルロースには着色成分のリグニンがついているため、漂白しないと紙は黄色くなってしまふ。キシランは

このリグニンとセルロースをつなぐ糊の役割をしている物質である。漂白する際は通常、セルロースをアルカリ環境下で煮ることでリグニンを溶出させ、残ったリグニンを塩素によって漂白するという手法を用いている。しかし、リグニンは芳香族化合物であるため、塩素と反応するとダイオキシンが発生してしまい環境に悪い。そこで、接着剤のキシランを分解するために、アルカリ環境に耐えられるキシランナーゼを使えば、必要な塩素の量を減らすことができると考えられている。紙は大量に使うものなので、キシランナーゼを利用することによる環境への貢献は大きいと先生は言う。

キシランナーゼの研究にあたり、先生はまず、中性で働くキシランナーゼとアルカリ性で働くキシランナーゼを比較した。すると、アルカリ性で働くキシランナーゼにのみ触媒部位の近くに塩橋が多いことがわかった。ここで言う塩橋とは、酸性アミノ

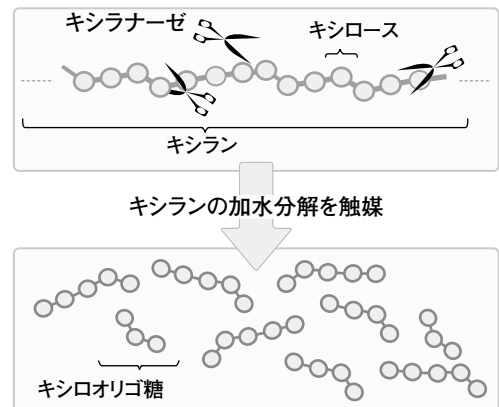


図5 キシランナーゼの働き

酸と塩基性アミノ酸が近づいたときにできるイオン性の結合のことである。

それならば、塩橋があることで耐アルカリ性が強くなっているのではないか。こう考えた先生は、まず、塩橋と耐アルカリ性の関連を調べるための実験を行った(図6)。天然の好アルカリ菌キシラナーゼから塩橋を減らした変異キシラナーゼを創り出し、その最適 pH を調べたのである。その結果、もともと9だった最適 pH が変異キシラナーゼでは5~7へと酸性側にシフトした。予想通り、塩橋は耐アルカリ性に関与していたのである。

この研究成果を活かして、先生はさらに、より耐アルカリ性の高いキシラナーゼの開発に取り組んだ。塩橋を強くするために、2ヶ所のリシンをアルギニンに置き換えたのである。リシンもアルギニンも塩基性アミノ酸であるが、アルギニンの方が塩基性が強いいため、置き換えによって隣にある酸性アミノ酸とのイオン結合が強くなると考えたのだ。結果、一方のリシンの置き換えでは最適 pH が酸性側にシフトしてしまっただが、もう一方では塩基性側にシフトし、改良に成功した。現在では、なぜ一つ目の置換では酸性側にシフトしてしまったのかも含め、キシラナーゼの耐アルカリ化について研究を進めている。

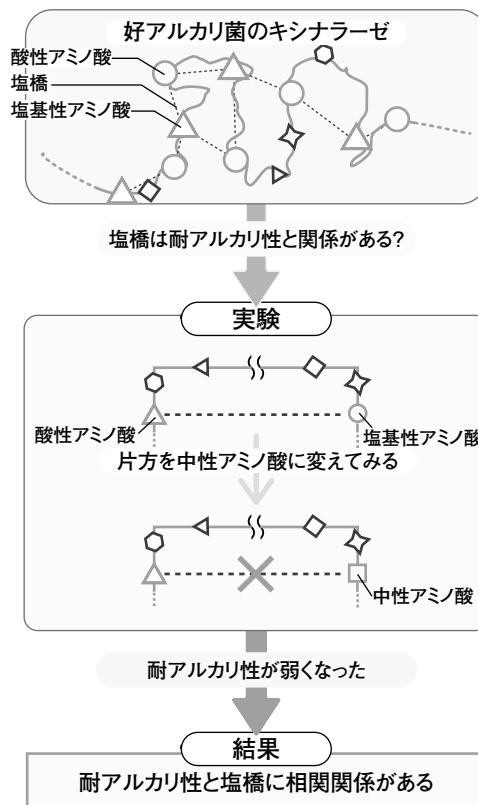


図6 好アルカリ菌キシラナーゼの塩橋の役割

## 複数の極限環境に耐えるには

最後に、複数の極限環境に耐性をもつ酵素の開発研究について紹介しよう。

中村研究室では、今まで紹介した耐塩・耐熱・耐アルカリ性タンパク質の研究の応用として、複数の極限環境に耐性を持つタンパク質、特に酵素を創り出そうとしている。その一つとして、耐熱性と耐アルカリ性を併せ持つ酵素の開発がある。

研究対象として選んだのは、ある超好熱菌のキシラナーゼだ。前に述べたように、好熱菌の作り出すほとんどのタンパク質には耐熱性がある。100度を越える環境を好む超好熱菌のキシラナーゼも確かに最適温度が110度であった。一方、この超好熱菌は弱酸性環境に生息しているため、持っている酵素には耐アルカリ性がない。そこで、この超好熱菌が持つキシラナーゼに耐アルカリ性を付与すれば、耐熱性と耐アルカリ性を併せ持つ酵素を創り出せると考えたのである。

この開発においてもやはりアミノ酸置換によっ

て変異タンパク質を作り出したのだが、ここではタンパク質工学の手法ではなく、進化分子工学の手法を用いた(図7)。進化分子工学では、自然界が数十億年かけてきた進化の過程を試験管内で時間を早めて再現する。まず、対象のタンパク質を指定しているDNAの遺伝子配列に対し、人工的にランダムな変異を導入する。次に、この変異DNAをもとにさまざまなアミノ酸置換の入った変異タンパク質のライブラリを作る。最後に、このライブラリから目的の方向に沿って変異したタンパク質を選び出す。これが進化分子工学の手法である。

耐熱-耐アルカリ性キシラナーゼの開発においては、耐熱性をもつキシラナーゼに変異を起こさせ、アルカリ性環境での活性がやや向上したキシラナーゼを選び出し、その遺伝子配列を調べた。すると、どのキシラナーゼにおいても共通のアミノ酸置換が起きている箇所が2つ見つかった。

このうち、アスパラギンの一つがアスパラギン酸に変異している置換が耐アルカリ性に関与していると仮説をたて、次にこの置換だけが起きている変異タンパク質を創り出した。この変異タンパク質を調べたところ、予想通り、変異前と比べてpH9での活性が大きく高まったものが得られた。未だpH6での活性のほうがpH9での活性より高い状態であるが、この方法を繰り返していけば、アルカリ性領域に最適pHを持つ変異タンパク質も創り出せるのではないかと先生は考えている。

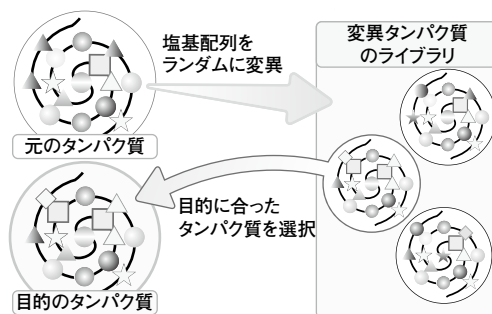


図7 進化分子工学の方法論



## 極限酵素の将来

今まで紹介したような極限酵素は、現在すでに多くの分野で利用されている。将来的には、現代社会の抱える問題の多くは極限酵素を応用した技術により解決されていくと期待されている。

耐塩性の酵素については、有機溶媒中での利用や海水で育つ植物開発への応用が考えられている。耐塩性のタンパク質には、前に紹介したとおり、塩濃度が高く塩析しやすい環境においても水に溶けるのに必要なだけの水分子を確保しておくことができるという性質がある。通常の酵素は有機溶媒存在下で水分子を確保しにくくなるが、耐塩性の酵素は、この性質により、有機溶媒存在下においても高い活性を発揮できるのである。有機溶媒中での反応は工業的に多く用いられており、このような反応中で触媒として利用される酵素に耐塩性を付与できれば、工業発展への貢献は大きいと考えられる。

また、日本では、海水を用いて穀類の植物を育てようと、耐塩性を持つ植物の開発に向けて研究が進められている。現在ある穀類は淡水で育てられたものばかりで、それが持つ酵素には耐塩性がない。そこで、耐塩性の仕組みを解明して植物のタンパク質に耐塩性を付与すれば、水に塩分が含まれる海辺においても、豊富な水を用いて穀類の植物を育てられるというのである。これは、現在の日本で問題になっている食糧自給率の低さを解

決する糸口になる可能性がある。

また、耐熱性の酵素には、耐圧性や耐アルカリ性を付与することによる化学工業への応用が期待されている。深海底は高圧の環境であり、高温環境で生育する好熱菌のほかに高圧力下で生育する好圧菌の存在が確認されている。この好圧菌から採れるのが耐圧性を持つタンパク質である。好圧菌の研究はまだ基礎段階であるが、耐熱性と耐圧性を併せ持つ酵素を作り出すことができれば、化学工業での高温・高圧環境プロセスにおいて利用できる酵素の開発につながるかもしれない。

また、耐熱性と耐アルカリ性を併せ持つセルラーゼ（セルロース分解酵素）やキシラナーゼを用いることで、セルロースやキシランを主要成分とするバイオマスを効率的に加水分解することが可能になると考えられている。化石燃料に変わる資源として注目されているバイオマスは今後ますます利用が拡大していくと考えられるため、バイオマスの分解によりバイオ燃料の調製に耐熱酵素や耐アルカリ酵素が用いられる日も近いだろう。

これらの実現は、現在の技術を鑑みればまだまだ夢のような話である。しかし、これからは今以上に多くの場面で酵素が利用されるようになるはずだ。数十年後の未来には、工場が縮小され、海岸沿いにも田園の並ぶ景色がみられるようになるかもしれない。

本稿の執筆にあたり、中村先生には取材に応じていただいただけでなく、多くの助言もいただきました。酵素研究のお話は大変興味深いものでし

た。お忙しい中貴重なお時間を割いて御協力くださりましたこと、厚く御礼申し上げます。

(重光 千彩)