

# Focus 01

## 未知の酵素を表舞台へ

地球上のあらゆる生物の生命現象を支える酵素は、発酵や醸造など食品加工分野を中心に古くから産業に利用されてきた。これまでの酵素探索は微生物が主流で、生物種の90パーセント以上を占める動植物の酵素が対象となることはまれだった。富山県立大学工学部生物工学科の浅野泰久教授が率いるERATO「浅野酵素活性分子プロジェクト」は、地球のどこかに密かに眠っている高性能な酵素を見つけ出し、化学工業や医療など産業の表舞台で活躍させることをめざしている。



**浅野 泰久 (あさの やすひさ)**  
富山県立大学工学部生物工学科 / 生物工学研究センター 教授  
1982年京都大学大学院農学研究科博士課程修了(農学博士)。同年米国・パデュー大学薬学部博士研究員、米国・オハイオ州立大学理学部博士研究員。84年財団法人相模中央化学研究所研究員、87年同副主任研究員。90年富山県立大学工学部助教授、95年同教授。2007年同生物工学研究センター所長、11年同大学附属図書館館長(兼任)。11年よりERATO浅野酵素活性分子プロジェクト研究総括。

### 自然から学び、新しい酵素を探す

富山県には江戸時代からの薬学や製菓業の伝統があり、酵素工学の父といわれる高峰譲吉博士も輩出している。富山県立大学工学部生物工学科の浅野泰久教授の生家は、奇しくも、高峰博士が設立した日産化学工業の工場のすぐ近くだった。幼少時代の浅野さんは「遊びの名人」で、川原で砂鉄を集めたり、魚を捕ったりしていた。山野では化石や縄文時代の土器を掘り出すことに夢になった。やがて、遊び場だった自然界に存在する酵素に魅せられた。「微生物から取り出した酵素が試験管の中でも活性を示す様子が、まるで自分に返事をしてきているようで面白く、遊びの延長のように感じながら研究を続けてきました」。

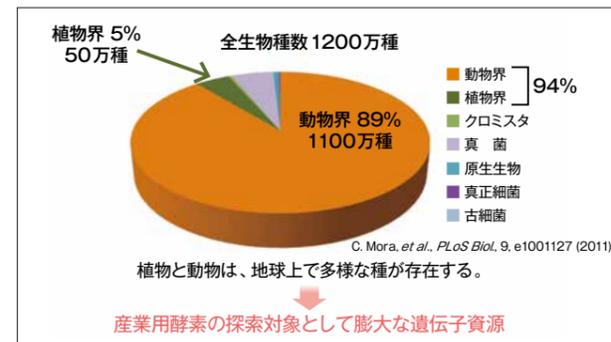
酵素は、生物の生命活動の源となるあらゆる化学反応を促進する触媒として働くたんぱく質である。生物が活動できるような温度やpHの穏やかな環境で、特定あるいは類似の物質だけにしか作用しないことが大きな特徴だ。金属などを触媒に用いた物質生産では、高温や高圧が条件で、有害物質が排出されることが多い。しかし酵素の性質を利用すれば、低コストで環境にやさしい生産方法が実現できる。浅野さんは、自身の研究を「未知の酵素を表舞台に引っ張り出すこと」だと表現する。生物はそれぞれが生存環境や生態に応じた多様な酵素を持っている。自然界にはまだ知られていない酵素が数多くあり、これまでにない機能や性能が見つかるかもしれない(図1)。微生物だけではなく、動植物が持つ優れた酵素を発見して、有用物質の合成や健康診断法

など産業という表舞台で幅広く活躍できるような基盤技術を開発することが、「浅野酵素活性分子プロジェクト」の大きな目的だ。

### 異端な領域へ、あえて壁を飛び越える

実用化されている酵素の多くは、細菌やカビなどの微生物から得られている。微生物は動植物と異なり、成長が速い。しかも省スペースで簡単に大量培養ができるため、産業利用に必要な酵素量を短時間で抽出することが容易だからだ。一方、動植物では酵素を取り出す作業が微生物と比較して煩雑なうえ、十分な量を得るためには大量に採集したり、栽培や飼育したりする必要があった。しかし、遺伝子組み換え技術の向上により、動植物を大量に得られなくても、酵素の遺伝子を微生物

図1 地球上の生物種数



に組み込むことで大量生産が可能になった。そこで動植物を産業用酵素の資源として見直すべきだと、浅野さんは考えた(図2)。

富山県中央植物園の協力を得て、剪定された植物を大きな袋で担いで持ち帰っては、破砕して活性を測ることを繰り返した。浅野さんは200種程度の植物を探索し、世界で見つかったヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)に分類される酵素の約30パーセントを富山で見つけた。HNLは主に植物の中にあることが知られ、医薬品や農業などの合成材料であるシアノヒドリン化合物の生産に利用されている。植物内では、産業での利用とは逆に、シアノヒドリン化合物を分解してアルデヒド化合物とシアン化水素(青酸)を作る化学反応の触媒として働く(図3)。害虫などに葉を傷つけられると、この化学反応が起き、青酸が害虫から身を守るための防御物質となるのだ。

「微生物は試験管で保存することができますが、植物は季節の影響を受けます。また、多数の植物を扱うのはかなり異端なことで、研究コミュニティから外れてしまうのではないかと悩みました。しかし、みんなと同じことをやっていたのでは新たな発見はないと、あえて壁を飛び越えました。それで心理的な抵抗もなくなり、勢いを得てERATOでは、さらに異端ともいえる動物に挑みました」。

### 動物は未発見酵素の宝庫

節足動物のヤスデは、枯れ葉などの有機物を主食とする。外敵に襲われると、防御物質として青酸ガスを放出する。このことから、HNLを持っているのではないかと推測した。ヤスデの生体内の酵素の量はごくわずかなので、推測が正しいかどうかを調べるためには大量のヤスデを集めることが必要になる。「たまたま九州で、台湾からの外来種であるヤンバルトサカヤスデが大発生したというニュースを聞き、現地へ飛んで何キログラムも集めてきました」。それをすりつぶして体液を抽出し、反応させてみると、思った通りHNLの存在を示す活性が見られた。「科学で最初から物事がうまく進むことは少ないので、これはとても幸運でした」。ヤスデの酵素を探すのに力を発揮したのは、プロジェクトの生物資源探索グループだった。ヤスデを捕獲するために、蝶や甲虫などの昆虫を研究してきた石田裕幸グループリーダーの知識と技術が求められた。「ヤスデの生態にはわからないことが多く、最初は研究材料として十分な量を集めるのにも苦しりましたが、これまでの昆虫研究で身につけたフィールドワークや生態学の知識を駆使して、

図3 ヒドロキシニトリルリアーゼの反応式

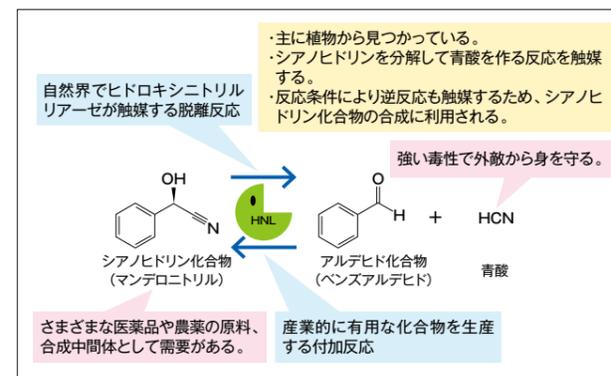
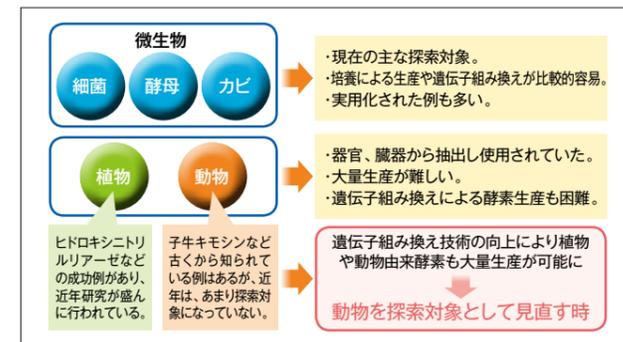


図2 産業用酵素の探索対象



試行錯誤しながら大量捕獲のコツをつかんでいきました」と振り返る。

驚くべきことに、ヤスデ由来HNLは植物由来のものとはアミノ酸配列が全く異なっていた。「通常、同じ働きをする酵素のアミノ酸配列は似ているのですが、ヤスデ由来HNLは、最初は酵素とは思えないほど独特の配列でした」。生体からの酵素の構造や活性を解析するには、精製して純粋な酵素を取り出す必要がある。多種多様なたんぱく質が混じり合った中から、どれが酵素かを特定しなければならぬ。精製できるようになるまで、何度も失敗を繰り返したが、ヤスデ1キログラムあたり0.12ミリグラムの純粋なHNLを取り出すことにやっと成功した(図4)。

これまで産業利用されてきたHNLの中ではアーモンド由来のものが最も活性が高い。ヤスデ由来HNLはアーモンド由来の5倍以上も触媒活性が高かった。さらに、一般的な酵素が活性を失う温度やpHの条件下でも壊れにくく、産業用酵素として優れた特性を示した(図5)。これまで注目されてこなかった動物にも、有意義な酵素が眠っていた事例となり、産業用酵素の探索を微生物以外にも広げるきっかけになると期待される。

図4 ヤスデを用いた実験ステップ



産業応用を阻む難題に挑む

自然界にある酵素を見つけることがゴールではなく、そこからスタートだ。ある生物が持つ酵素を利用するために、毎回その生物を大量に集めて抽出するのは現実的ではない。発見した酵素のアミノ酸配列を特定し、遺伝子を解明し、その遺伝子を微生物に組み込み、目的の酵素を微生物に作らせる「異種発現」を実現させて初めて、大量かつ安定した酵素の供給が可能になり、産業利用への道がひらける。

遺伝子組み換え技術の進歩とともに、大腸菌や酵母菌などの微生物に合成したい酵素の遺伝子を入れて、他の生物から発見された酵素を作らせる技術が発達してきた。しかし、微生物からすれば、自分のものとは全く異なる種類のたんぱく質を作り出すことになるため、そこにはやはり無理が生じてしまう。その無理が、しばしば不溶化という形で現れる。

不溶化とは、たんぱく質が凝集して、水溶液中に溶けない沈殿物になる状態をいう。酵素を構成するたんぱく質は、20種類のアミノ酸がひものように連なり、立体的に折りたたまれた構造をしている。微生物に作らせた異種たんぱく質の多くが、折りたたみが不完全な状態で、互いに絡まって凝集してしまい、酵素としての機能を発揮できないことも、これまで動植物の酵素が研究されてこなかった理由の1つである。

一度凝集したものをほぐすのは難しく、不溶化の問題は異種発現による大量生産や産業利用の実現を阻んできた。酵素に最初から「可溶性」を持たせ、活性のある酵素を正しく作り出すにはどうすればいいのか。この難

題に挑んだのが、プロジェクトの酵素工学グループと生物有機化学グループだ。

アミノ酸配列と可溶性の相関を解き明かす

可溶性発現の向上に挑戦しているのが酵素工学グループだ。松井大亮グループリーダーは次のように説明する。「酵素のアミノ酸配列の一部を人為的に別の配列に置き換え、酵素の性質を変化させる変異導入などの研究をしています。異種発現させた酵素の不溶性も、アミノ酸の配列を変えたら解決するのではないかという考えを出発点に、どの部分を変えればいいのかを見つけ出すことに取り組みました」。

たんぱく質である酵素は何百ものアミノ酸からできており、複雑な構造を持っている。そのため、どのアミノ酸が酵素の性質に関わっているかを特定することは難しかった。たった一カ所変異を加えただけで劇的に変化することもあれば、いくつもの変異を加えないと変化しないなど、その条件は酵素によって異なる。さらに変異を加えることにより、酵素の立体構造や活性が変化してしまうこともある。そのため、遺伝子変異により酵素の性質を改善するには、ランダムに変異を導入して多数の変異体を作製し、その中から希望する性質を持つ酵素を選び取るという、「数を打って当てる」方法が利用されることが多い。

活性を変えずに可溶化する法則性を見い出すことが重要だと考えていた浅野さんは、ランダムに変異を導入して多数の変異体を作製し、可溶化した変異体のアミノ酸配列の解析を試みた。事例を集め、解析することで、可溶化につながる知見を得られるのではないかと

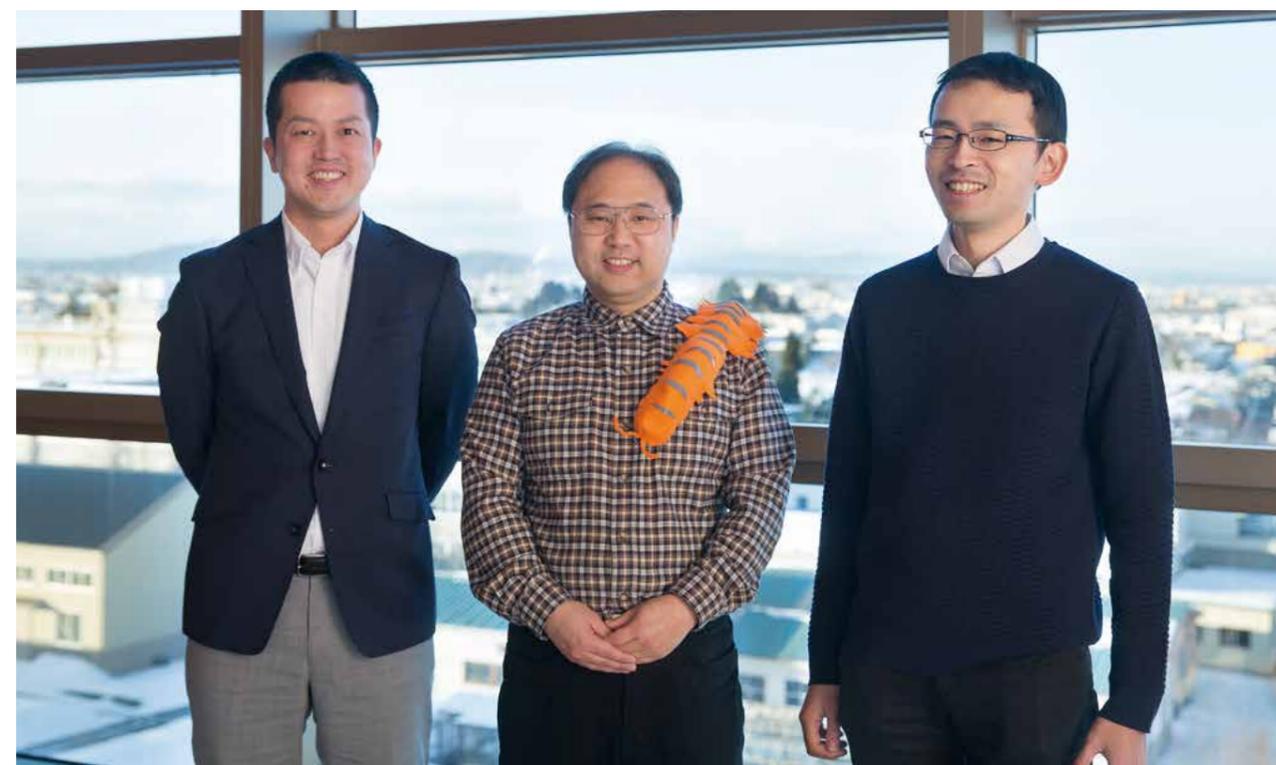
と考えたからだ。「ひたすら実験を繰り返して、可溶化につながるアミノ酸変異のデータを大量に集めました。その解析から不溶性と可溶性に関わるアミノ酸残基(たんぱく質を構成しているアミノ酸の1単位)を見つけ、そのアミノ酸残基を改変することで、不溶化していた酵素を可溶化するための法則性を見つけること成功しました」。

実験の繰り返しとデータの積み重ねにより、例えば酵素の表面にある水になじみにくい(疎水性)アミノ酸を水になじみやすい(親水性)アミノ酸に置き換えると可溶性になるといった法則を明らかにしている。この可溶性発現技術により、いくつかのヤスデ由来HNL遺伝子の異種発現に成功しており、大量生産など実用化に向けた技術的課題を解決するための研究を進めている。

これまで可溶性発現の壁になっていたのは、元の酵素と完全に同じアミノ酸配列のものを作らなければならないという思い込みではないかと、浅野さんは語る。「医薬品は別として、産業利用の場合は、同じ活性を持つ酵素なら少しぐらいアミノ酸配列が違っていてもいいのではないかとという発想が、少なくとも私がこの研究を始めたときにはなかったようです。私たちの成果を見て、同様の考え方を取り入れた研究も盛んになってきました」。

実験科学と計算機科学の融合

こうして見つけ出した変異と可溶性の相関の法則性をもとに、生物有機化学グループが力を発揮して、可溶性発現するためのアミノ酸残基をアミノ酸配列から予測するプログラムを編み出した。開発したのは、プロジェクト



左から松井大亮(まつい だいすけ) 酵素工学グループ グループリーダー、石田裕幸(いしだ ゆうこう) 生物資源探索グループ グループリーダー、中野祥吾(なかの しょうご) 静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科 助教(生物有機化学グループ 元研究員)。石田さんが肩に載せているのは、プロジェクトのメンバーが手作りしたヤスデのぬいぐるみ。

開始から3年目まで研究員として所属し、現在は静岡県立大学食品栄養科学部の中野祥吾助教だ。

「生物有機化学グループでは、X線結晶構造解析などで酵素の形を明らかにすることと、コンピューターを活用して酵素の形の変化と働きの関係を調べる計算機科学の2つの側面から、酵素の機能に迫っていきました」。

予測プログラムは、不溶化した酵素と、類似の可溶性酵素のアミノ酸配列を比較して、不溶化の要因となる部分を見つけ出す。次にその部分を、類似酵素を参考に可溶性を持たせられる配列に変えるものである。

「大腸菌を使った異種発現で不溶化した酵素について、この手法で予測した部分の配列を変えたところ、テストした酵素の約50パーセントを可溶性発現させることができました」。不溶化は異種発現させた酵素の約80～90パーセントで発生するといわれ、そのうちの半分を可溶性発現できたのは、かなりの高確率だ。コンピューターで変異導入部位を予測できるため、時間も費用も削減できる(図6)。

この手法は、科学の世界でいうウェット(実験科学)とドライ(計算機科学)が高度に融合してこそ実現できた。そのために浅野さんが意識したのは、「異分野の人材を大部屋に集めること」だという。最初は抵抗感もあったよ

うだが、同じ空間で一緒に研究することで、知識や情報を共有でき、互いの専門知の融合も加速した。中野さんは当時をこう振り返る。

「松井さんたちが一日中立ち実験を繰り返していたので、ずっとコンピューターの前に座っているのが申し訳ない気持ちになりました。そこで、慣れないながら実験を習ってみたりする中で、お互いの価値観を認めて理解し合えるようになりました。ウェットとドライの融合で新しい発見をした感動は大きかったです」。

研究者には、それを達成する能力があると信じている。石田さんは「自分の専門から一歩足を踏み出す勇気」を学んだという。「今まで築いてきた領域から外に出ることは、研究者にとって怖いことですが、浅野先生の姿勢を私たちも受け継いでいきます」。

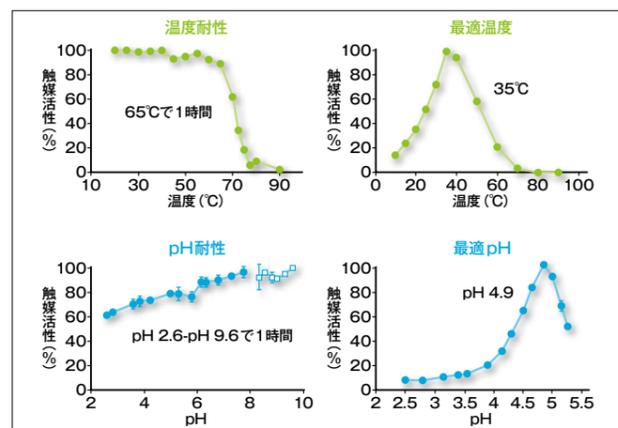
富山県立大学は1990年に開学した比較的新しい大学だが、開学当初から教員を務め、生物学研究センターの開設にも深く関わった浅野さんの力も手伝って、設備や人材を含めた研究環境の充実ぶりは、広く知られるところとなっている。

富山の地からスタートして、日本から世界の酵素活性分子研究を盛り上げたいと、浅野さんは活動してきた。

「酵素研究のプロジェクトがERATOに採択されたのは、酵素工学研究や応用微生物学の世界的競争が激化し、オールジャパンで広く考える機会を与えられたからだと思っています」。

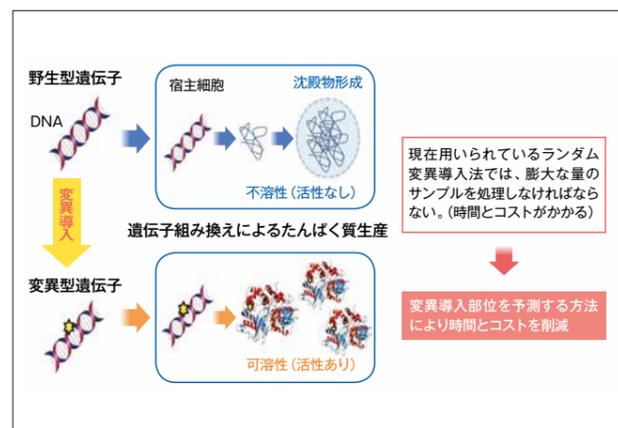
研究成果を広く世界に発信する活動を支援するJSTの仕組みを活用して、国内初の酵素工学の国際会議を開催し、海外との共同研究や連携も積極的に行ってきた。これからはそれ以上先常識となるであろう研究をし、その成果を実証してきた。新しい研究への挑戦は孤独だが、プロジェクトに結集した若き

図5 ヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼの性質



最適な温度やpHは通常の酵素と同様であったが、温度やpHが変化しても機能を失わない、非常に安定した酵素であることが確認できた。

図6 変異導入による可溶性発現法の技術開発



可溶性につながる変異導入部位の予測により従来のランダムな変異導入法の問題点であった時間とコストの問題を解決できる。