

酵素化学ことはじめ

～酵素の機能を解析し、創出し、産業へ応用する～

京都府中小企業特別技術指導員
京都大学名誉教授 井上 國世

本年4月に、京都府中小企業特別技術指導員を拝命しました。大学卒業以来、酵素の基礎と応用に関する研究に携わってきました。実用化に至ったもの(アスパルテームの酵素合成、全自動酵素免疫法臨床診断装置など)にも恵まれました。本稿では「酵素化学」の概略を紹介させていただきます。

酵素とは

酵素は生体における化学反応の触媒であり、球状タンパク質からなる。発酵や食物の消化を通して古くから認識されていたが、科学的研究の開始は150年ほど前のことである。多くの酵素の分子量は2万-10万程度であり、タンパク質だけでできているものと、補因子と呼ばれる低分子物質や金属の援助を必要とするものがある。酵素は関与する化学反応により次の6つに大別される:酸化還元、転移、加水分解、除去付加(ある基の二重結合への付加とその逆反応)、異性化、合成(ATP開裂に共役した2分子の結合)。機能に従って更に細分され、3200種類が登録されている。酵素は構造情報に基づいて分類されているわけではない。

酵素化学とは

ほとんどの生物現象には酵素が関わっており、生物の研究と応用には酵素の理解が欠かせない。酵素の構造情報はDNAに書かれているので、原則としてDNA配列から酵素のアミノ酸配列(一次構造)が分かる。タンパク質の高次構造は一次構造に基づき自発的(非酵素的)に形成される。酵素機能が高次構造の表現であることを考えると、一次構造が酵素機能を規定すると言ってよい。しかし現在、構造から機能を推定することはほとんど不可能であり、分子レベルでの「構造と機能の相関性」の理解が酵素化学の重要課題である。近年、分子生物学、構造生物学などの支援を得て、酵素機能が構造の何処から発現するのか、何処をどう変化させると機能をどう改変でき、さらに新規機能を創造できるのかが、理解できるようになってきた。落葉していた木々が春先に若葉を出し、夏には緑で覆われる。大気中の微量のCO₂を原料になされた光合成と炭酸同化に関わる酵素の威力である。

酵素は絶妙の触媒であるが、生化学反応にしか適応できないという弱点もある。従来、食品や医薬品の製造、臨床分析などに利用されてきた。近年、バイオエタノールや生分解プラスチックなど工業材料への応用も広がってきた。今後の課題は、プラスチックやダイオキシンなどの人工的化合物への応用である。酵素化学はいま、酵素自体の解析から酵素をツールとする応用化学へと展開を始めている。

酵素反応の特性

酵素は有機触媒や無機触媒と異なり、生物が生存する温和な条件(常温、常圧、水系、中性pHなど)で働く。逆に、この条件を外すとほとんど働けない。生体では、数千種類の酵素反応が、細胞というワンポットで継起的・同時並行的に進行する。化合物Aが酵素aにより化合物Bに変換され、さらにBは酵素bによりCに変換される; Cは酵素cによりDに変換され、同時にCは酵素c'によりEへも変換されるとき、反応はA→B→C→(D+E)のように継的に流れると共に、個々の反応は同時並行にも進む。

これが可能であるのは、酵素の持つ2つの特異性に基づく。酵素は作用する化合物(基質)と反応機構に対して特異性を持ち、それぞれ基質特異性および反応特異性と呼ぶ。酵素は、特定の基質のみを結合する部位(活性部位)を持ち、ここに結合した基質に対し特定の化学反応を仕掛けるのであり、「鍵と鍵穴」に例えられる。例えば、グルコース(G)はグルコース酸化酵素、グルコース脱水素酵素、グルコース異性化酵素など複数の酵素の基質となり、別個の生成物を生成する。生体では数万種の化合物が間断なく酵素反応による合成・分解を繰り返しており、個々の化合物間には「酵素によって結ばれたネットワーク」が張り巡らされている。

酵素反応速度

生化学反応で非酵素的に進むものはほとんどない。多くの酵素は反応を100万倍以上加速する。オロチジル酸(OMP)脱炭酸反応の半減期は7800万年であるが、OMP脱炭酸酵素はこれを10¹⁷倍加速する。カルボキシペプチダーゼAはペプチド加水分解(半減期7.3年)を10¹¹倍加速する。カーボニックアンヒドラーゼはCO₂水和反応(半減期5秒)を1000万倍加速する。酵素活性を一般に酵素反応速度(v)で表す。酵素、基質、生成物をそれぞれE、S、Pで表す。まずEはSを活性部位で結合して酵素基質複合体(ES)を形成し、次いでESは遷移状態(TS)に到達したのちPを生成し、これを遊離して、Eは元の状態に戻る。一般に v はミカエリス-メンテン式と呼ばれる次式で表される。

$$v = k_{cat} [E]_0 [S] / (K_m + [S])$$

v は反応液中の酵素初濃度 $[E]_0$ に比例して増大する。一方、 $[S]$ に対しては双曲線型飽和曲線であり、 $[S]$ が低濃度($[S] \ll K_m$)では $(k_{cat}/K_m) [E]_0 [S]$ であるが、高濃度($[S] \gg K_m$)では $k_{cat}[E]_0$ すなわち最大速度 V_{max} に漸近する。また k_{cat} (単位: s^{-1})は、ESが(E+P)に変換される速度定数であり、酵素反応の1秒間当たりの回転数を表す。 K_m (単位:M)はミカエリス定数と呼ばれ、 $v = V_{max}/2$ を与える $[S]$ で与えられる。 K_m は概ねESの解離定数とみなすことができ、EとSの結合力の指標になる。酵素活性は k_{cat} が大きいほど、また K_m が小さいほど大きい。ただし、両者に対するpHや温度などの環境因子や阻害剤などの効果はそれぞれ独立しており、両者を同時に最適化させるのは難しい。

酵素の改良と創造の試み

酵素(E)の活性部位は基質(S)と相補的な構造を持つと考えられた(鍵と鍵穴説)ことがあった。プラスチックで作られたSの鋳型やSに対して作られた抗体がESを形成はしたが、酵素活性を示した例はない。一方、遷移状態(TS)の類縁化合物に対して作られた抗体が酵素活性を持つことが示され、活性部位はTSに相補的な構造を持つことが強く示唆された。EはTSの安定化因子と言ってよ

い。酵素活性の増強には小さい K_m が望ましいが、過度に小さいとESが安定化しすぎて、ESで反応が止まる(k_{cat} が極度に低下)ことになる。すなわち k_{cat} と K_m は背反的であり、酵素反応がうまく進行するためには、ESに適度の「ゆるさ」が必要である。実際、抗原抗体複合体の解離定数 K_d はnM-pMのものが多いが、 K_m ではmM- μ Mが多い。

酵素活性を増強する工夫として(1)ES安定化; (2)TS安定化; (3)Pの脱離促進(EP複合体の不安定化)がある。加えて、(4)酵素阻害の抑制: しばしば酵素活性の阻害が見られる。実際、医薬品の約50%は酵素を標的としており、大半が酵素阻害剤(I)である。IIには、Sと競合して活性部位に結合するものと、それとは別の阻害剤結合部位(I部位)に結合して、 K_m や k_{cat} に影響を与えるものがある。また、Pは活性部位に結合して、Iとなることが多く、阻害の抑制が求められる。(5)Eの構造安定化: k_{cat} は温度に伴い増大するため、Eの反応温度は可能な限り高温が望ましい。ただし、Eはある温度で急激に変性し失活する。この変性は、高次構造を形成する弱い相互作用がわずかに切れるだけで起こるカタストロフな現象である。遺伝子組換えによる構造安定化や好熱性微生物からの酵素探索が行われてきた。十分な活性を保持しつつ安定性を増大させる工夫が求められる。(6)溶媒工学: 酵素反応の溶媒を改変して、Eの安定化や活性化、Sの溶解度の増大が考えられる。Pを沈殿させる溶媒を用いると反応を積極的に生成系へ引っ張ることも可能になる。

酵素の産業応用

多くの応用例があるが、化学合成に用いられた一例を挙げる。アスパルテーム(DPM)は1965年に発見されたペプチド性人工甘味剤である。DPMはショ糖の200倍の甘味度を持ち、肥満予防の目的で広く利用されている。1970-80年代に開発競争が世界中で繰り広げられた。基本的にはL-Aspの α -NH₂をZ基で保護したZ-L-Asp(ZD)とL-Phe-OMe(PM)を脱水縮合してZDPMを合成したのち、Z基を除去する。ZDには α 位と β 位にCOOH基があり、PMには α -NH₂があるが、ZDの α -COOHとPMの α -NH₂とを選択的に結合することが求められる。化学合成法が先行していたが、

ZDの β -COOHとPMの α -NH₂との結合が回避できない、加えて原料アミノ酸中のD-体との副反応が除外できないという問題点があった。

1970年代末、東洋曹達工業(現、東ソー)ではプロテアーゼ反応の逆反応を利用するペプチド合成が試みられていた。本法の利点は、酵素がL-体アミノ酸のみを識別し、その α -COOHと α -NH₂を特異的に結合する点にある。平衡は加水分解側に大きく偏っており、合成は1-2%しか進まないが、反応系を工夫してZDPMを系外に除外することで反応を進めることができる。酵素にはサーモライシン(TLN)を用いた。本酵素は1964年、遠藤滋俊博士により有馬温泉の熱水の微生物から発見されたもので、高い酵素活性と好熱性(65-70°C)を示す。我々は、TLNの溶解度、熱安定性、活性の増強を目的に媒質改良や酵素改変を試みた。特筆すべきは、高濃度の中性塩の添加に応じて K_m は変化しないが、 k_{cat} が指数関数的に増大することを見出したことである。例えば、NaClの場合、飽和濃度5Mでは30倍以上の活性化をもたらす。この条件では、酵素の溶解度は10倍増大し、熱安定性も増大する。このときTLN活性部位が広くなるように構造変化が起こることを見いだした。TLNを用いるDPM合成は、汎用化学品の工業生産に応用された酵素合成の始まりと言ってよい。

本稿に関しては、井上國世 編「初めての酵素化学」シーエムシー出版、2016年を参照していただくと幸いです。

井上 國世 氏

1977年京都大学農学研究所博士課程修了。日本学術振興会奨励研究員、ミシガン大学医学部博士研究員、東ソー(株)生物工学研究所研究室長など(79-90年)、京都大学農学部助教授(90-96年)、同農学研究科食品生物科学専攻教授(1996-2013年)、同大学産官学連携本部副本部長(08-12年)などを経て退職。2013年4月より京都大学名誉教授ほか。

専門: 酵素化学・(産学連携)中小企業論
連絡先: inouye@kais.kyoto-u.ac.jp

お問い合わせ先

京都府中小企業技術センター 企画連携課 企画・情報担当 TEL: 075-315-8635 FAX: 075-315-9497 E-mail: kikaku@kptc.jp

相談無料
秘密厳守

知財総合支援窓口

- アイデアはあるがどうすればよいかわからない
- 同じアイデアや商品名が出願されていないか知りたい
- 出願方法を知りたい
- 権利侵害に対応したい
- 社内で知財セミナーを実施してほしい
- 会社を離れられないので、自社で相談に応じてほしい
等、知財に関する課題を解決してみませんか?

※セミナーと訪問支援は、中堅・中小企業、個人事業主、創業検討中の個人の方に限ります。

一般社団法人
京都発明協会

京都市下京区中堂寺南町 134
京都リサーチパーク内京都府産業支援センター2階
TEL: 075-326-0066 FAX: 075-321-8374
E-mail: hatsumei@ninus.ocn.ne.jp
URL: http://www.chizai-kyoto.com/



あなたの企業の強みを活かすため
まずはお気軽にご相談ください!

相談日時 毎週月曜日～金曜日
(休日、祝日を除く)
午前▶ 9:00～12:00
午後▶ 13:00～17:00
※事前予約制です