

酵素の超安定化 (スーパー酵素) 技術の構築とその応用

高橋治雄, 梶野勉, 宮崎千絵, 杉山英彦, 浅見修

Enzyme Stabilization in Mesoporous Material and Its Application

Haruo Takahashi, Tsutomu Kajino, Chie Miyazaki, Hidehiko Sugiyama, Osamu Asami

要 旨

西洋わさびペルオキシダーゼ, サチライシンを30Åから90Åの細孔径を有するメソ多孔体であるFSM-16, MCM-41およびSBA-15に吸着固定化し, 安定性を調べた。非イオン性の界面活性剤を鋳型としたSBA-15に比べて, 陽イオン性の界面活性剤を鋳型としたFSM-16およびMCM-41はより多くの酵素を吸着した。また, 酵素のサイズに最も近い細孔径を有するFSM-16またはMCM-41に固定化した場合, 酵素の安定性が最も高かった。以上の結果よりメソ多孔体の表面特性や細孔のサイズが酵素分子と合致していることが酵素の安定化には重要であることがわかった。

本技術の応用として, リグニンやダイオキシンといった難分解性物質を分解でき, 産業上有用な酵素であるマンガンペルオキシダーゼ (MnP) をFSM-16に吸着固定化し, 超安定化を図った。細孔径が酵素のサイズにマッチしたFSM-16に固定化することにより最も高い熱安定性および過酸化水素耐性を示すスーパー-MnPを作製した。さらにスーパー-MnPの性能を最大限に引き出すTwo Stage Reactor System (TSRS) を新たに構築した。このシステムを用いることにより塩素を用いる従来のパルプ漂白法と同様の性能 (6時間以内で白色度85%) を有する, 環境に優しいバイオパルプ漂白法を開発した。

キーワード

メソ多孔体, 酵素, 固定化, 環境, パルプ漂白

Abstract

Enzymes were adsorbed on the silica mesoporous materials FSM-16, MCM-41, and SBA-15 with various pore diameters from 30 to 90Å, and their stabilities were studied. FSM-16 and MCM-41 prepared by a cationic surfactant showed a higher adsorption of HRP than SBA-15 prepared using a nonionic surfactant. When the average mesopore size of FSM-16 just matched the molecular diameters of the enzyme, immobilized HRP exhibited the best stability. Both the surface character and size matching between pore sizes and the molecular diameters of HRP were important in achieving a

high stability. Manganese peroxidase (MnP) immobilized in FSM-16, whose pore size just matched the diameter of the enzyme, showed the best stability and high H₂O₂ tolerance. A two-stage reactor system (TSRS) involving the MnP-immobilized FSM-16 was constructed in which the enzyme and pulp bleaching reactions were separately performed. The thermally discontinuous TSRS resulted in efficient pulp bleaching. After treatment of pulp with TSRS, the brightness of pulp increased to about 85% within 6h.

Keywords

Mesoporous materials, Enzyme, Immobilization, Environment, Pulp bleaching

1. はじめに

近年、地球環境に優しい環境技術構築の一環として酵素を産業利用する技術が着目されている。酵素は常温での反応性や反応特異性が優れており、理想的な“触媒”であるが、元々生物体内で働くように設計されているため、環境技術に使用するにはその反応場に応じた耐熱性向上や有機溶媒中での反応性向上などの高機能化が必要である。これまで酵素を固定化担体へ結合させたり、高分子で酵素を被覆し安定化しようとする試みは多くなされてきたが、十分な安定化効果は得られていない。そこで酵素分子そのものを改変したり、その分子サイズに応じた高分子による超安定化（スーパー酵素）技術が求められており、我々は酵素の分子サイズに合致した高分子で被覆することにより安定化することを試みた (Fig. 1(a))。近年、20～300Å程度の均一の細孔を有するメソ多孔体が合成可能となったが、その直径は酵素分子の直径とよく一致する (Fig. 1(b))。これまでモービル社が開発したメソ多孔体であるMCM-41に比較的小さなチトクロムC（分子量12k）などの酵素が固定化可能であることは明らかにされてきた。一方、実用上価値のある分子量44kのペルオキシダーゼなどの固定化の実績はなく、安定化のメカニズムもよくわかっていなかった。

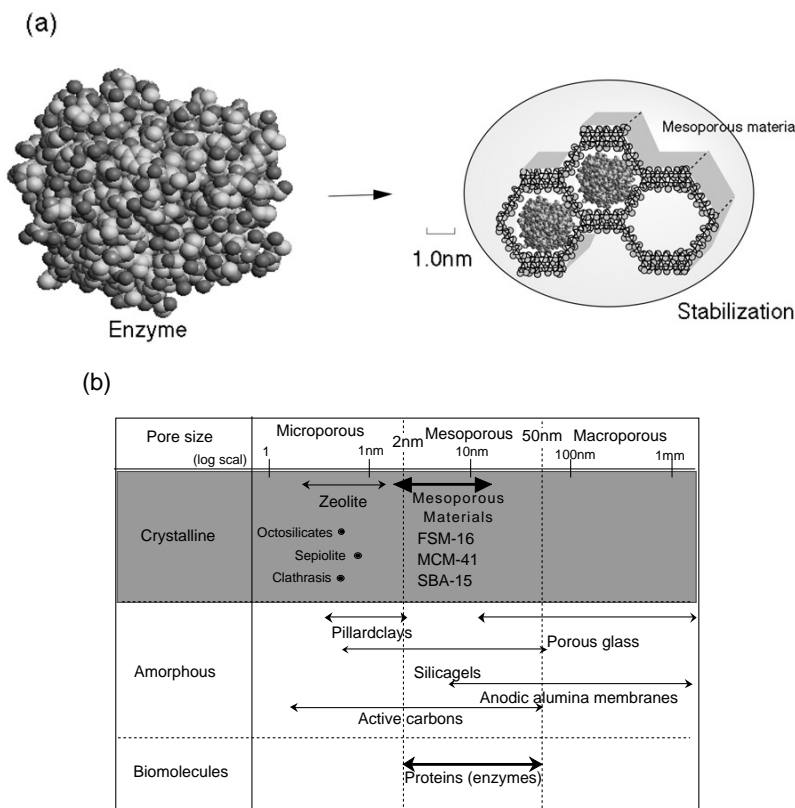


Fig. 1 Image model of stabilized enzyme in mesoporous material (super enzyme) (a) and classification of inorganic porous materials (b).

そこで本研究では酵素全般に適用できる系を構築するために、メソ多孔体の表面の性質が酵素の吸着に及ぼす影響およびメソ多孔体の平均細孔径が酵素の安定化に及ぼす影響に関して検討した。さらに得られた知見を基にFSM-16への固定化技術をマンガンペルオキシダーゼ (MnP) に応用し、安定性に優れたスーパー-MnPを作製することに成功した。リグニンやナイロンなどの合成高分子が分解できるMnPは環境浄化や環境に優しいパルプ漂白技術の分野で注目され、その応用技術の開発研究が精力的に行われている。しかしながら、MnPはその安定性が著しく低いため実用上有効な利用技術の確立には至っていなかった。今回スーパー-MnPを用いて産業上有効なバイオパルプ漂白技術を開発するとともに、ナイロンなどの分解への応用の可能性についても検討した。

これらの取り組みは21世紀に向けたグリーンケミストリーの一環として積極的な対応が求められるものである。

2. 実験方法

2.1 材料

酵素は市販の西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) とタンパク質分解酵素のサチライシンを用いた。白色腐朽菌 (Phanerochaete chrysosporium) からのマンガンペルオキシダーゼ (MnP) の調製はGoldらの方法¹⁾を用いた。

2.1.1 メソ多孔体の合成

FSM-16の合成は稲垣らの報告²⁾、MCM-41の合成はBeckらの報告³⁾、またSBA-15はStuckyらの報告⁴⁾に従って行った。

2.1.2 メソ多孔体への吸着固定化

酵素は、1-10mg/mlに調製した酵素溶液をメソ多孔体材料に4°Cで16時間回転しながら吸着させた。吸着後、脱イオン水で3回洗浄し、室温乾燥して用いた。

メソ多孔体への酵素の吸着メカニズムを知るために色素の吸着実験を行った。色素は陽イオン性の色素であるメチレンブルー (MB) と陰イオン性界面活性剤である硫酸アントラキノンナトリウム (ASS) をそれぞれ100mgのメソ多孔体に60°Cで7時間吸着させた。色素の吸着量は100°Cから900°Cでの減少量を熱重量測定 (TG) により算出した。

2.2 安定性評価

2.2.1 酵素の熱安定性の評価

各種細孔径を有するFSM-16に酵素を吸着させたものを用いて、70°Cで一定時間処理したサンプルをScottらの方法⁴⁾に従ってモニターした。サチライシンの熱安定性はBoc-Gly-Leu-Leu-p-nitroanilideの加水分解活性でモニターした。MnPの熱安定性は反応後、残存する酵素活性により生成したMn³⁺量を270nmの吸光度でモニターした。

2.2.2 過酸化水素耐性

MnPを固定化メソ多孔体を過酸化水素濃度を0~8mMの濃度で37°Cで5分間反応させ、遠心後、上清の270nmの吸光度をモニターした。

2.3 Two Stage Reactor System (TSRS)

試作した超安定酵素の性能を最大に活かしてパルプの漂白実験を行うために、FSM-MnPをカラムにつめ、基質反応槽(50ml)に未漂白パルプ(白色度59.0%)を仕込んでTSRSを構築した。反応液を6ml/minで連続的に流下してパルプ漂白を行った。この際、基質反応槽の入口あるいは出口におけるMn³⁺量を270nmの吸光度を指標に測定するとともに、手抄紙を作製し白色度を測定した。

3. スーパー酵素の構築と特性解析

3.1 酵素の固定化メカニズムの解析

3.1.1 各種メソ多孔体への酵素の吸着

3種類のメソ多孔体、FSM-16、MCM-41およびSBA-15に対するHRPまたはサチライシンの吸着実験を行った。3種の多孔体はそれぞれ細孔径が異なるほか、FSM-16、MCM-15は陽イオン性界面活性剤を鑄型として作製されているのに対し、SBA-15では非イオン性の界面活性剤が用いられている。この吸着実験の結果をFig. 2に示す。酵素のサイズより細孔径が大きい場合(50Å以上)には、陽イオン性界面活性剤を鑄型として用いたFSM-16またはMCM-41では酵素の吸着量は100mg/g担体以上の値を示した。

一方、非イオン性の界面活性剤を鑄型としたSBA-15ではその1/5以下であった。また、メソ多孔体の細孔径が酵素サイズより小さい場合では、やはり酵素の吸着量は低く細孔内に吸着されていないと考えられる。またシリカゲルへの吸着量は約40mg/g担体程度であった。

3.1.2 イオン性色素のメソ多孔体への吸着

酵素が陽イオン性の界面活性剤を鑄型としたメソ多孔体へ特異的に吸着するメカニズムを明らかにする目的

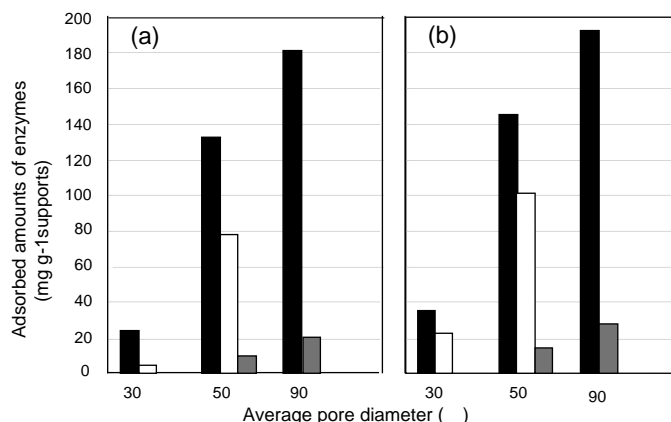


Fig. 2 Enzyme adsorption to mesoporous silica materials.
(a) HRP, (b) subtilisin : FSM-16, : MCM-41,
: SBA-15

で、イオン性色素のメソ多孔体への吸着量を調べた。陽イオン性の色素としてはメチレンブルー (MB) を、また陰イオン性界面活性剤である硫酸アントラキノナトリウム (ASS) を用いて熱重量測定 (TG) した結果をFig. 3に示した。メチレンブルーを用いた場合においては陽イオン性の界面活性剤を鑄型として合成したFSM-16やMCM-41に対する吸着量は、非イオン性の界面活性剤を鑄型として合成したSBA-15に比べて1.5倍以上の吸着能を示した。一方、ASSの吸着ではメソ多孔体間で大きな差は認められなかった。このことよりメソ多孔体の細孔内のイオン性の性質が酵素等の物質の吸着に重要な役割を果たしていることが考えられる。すなわちFSM-16やMCM-41は、陽イオン性の物質を選択的に吸着できる能力を有していることがわかった。酵素を陽イオン性となる等電点以下でメソ細孔に吸着すると、イオン性相互作用や水素結合などの非共有結合によって強固に固定されると考えられる。

3.1.3 FSM-16に固定化した酵素の安定化効果

Fig. 4AにHRPとサチライシンの分子モデルを示す。いずれも短直径は40~50Åの大きさである。各種細孔径を有するFSM-16に固定化したHRPとサチライシンを緩衝液中、70°Cで処理したときの残存活性をFig. 5に示す。

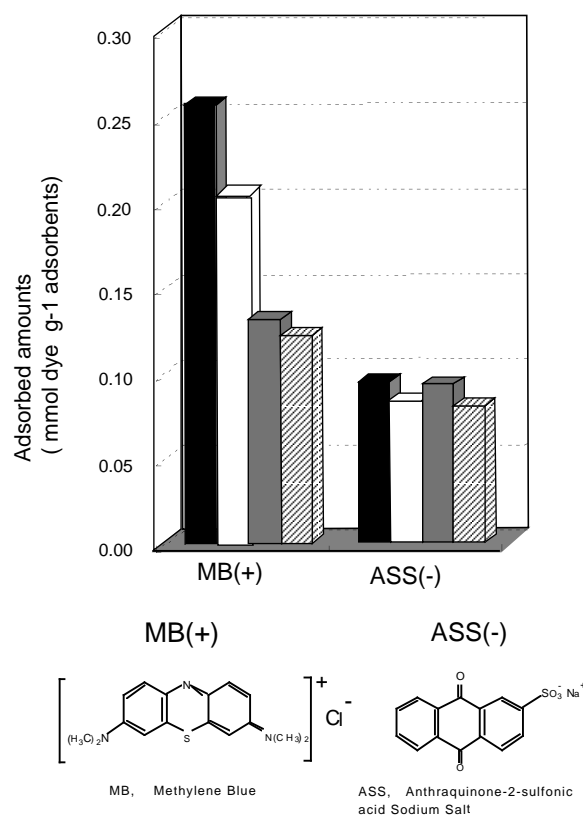


Fig. 3 Pigments adsorption to mesoporous silica materials.
: FSM-16/50Å, : MCM-41/50Å, : SBA-15/50Å,
: silica-gel/30-300Å

HRPの場合、未処理の酵素は60分で活性が完全に失われるのに対して、メソ多孔体で固定化したものではいずれも熱に対する安定化効果が認められた。安定化効果は50Åの平均細孔径を有するFSM-16に固定化したときが最も高く120分処理後も80%以上の活性を有していた。以下安定化効果は90Å、30Åの順であり、従来酵素の固定化によく用いられているシリカゲルは30Åのものと同程度以下の安定化効果を示すのみであった。サチライシンの場合の安定化効果は50Å、90Å、30Åの順でHRPと同様であった。酵素のサイズに合致した細孔径を有するFSM-16に酵素を固定化した場合には、酵素は非共有結合によって多孔体の細孔内のシラノール基に強固に固定化されるために安定化するものと考えられる。酵素の吸着量と窒素吸着のパターンをもとにしてコンピュータで各種サイズ

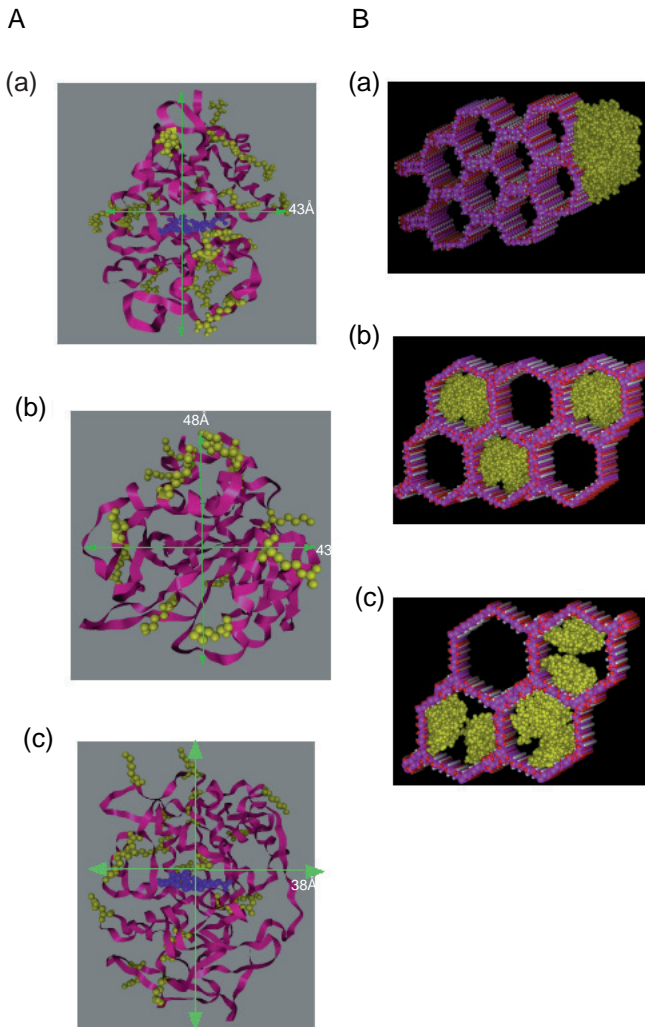


Fig. 4A Structural model of an HRP molecule (a), subtilisin Carlsberg molecule (b), and MnP molecule (c).

Fig. 4B Image models of immobilized HRP in FSM-16 with various pore sizes using a computer schematic model. The FSM-16 model was constructed in accordance with the folded sheet formation mechanism. (a) a pore diameter of 30Å (b) 50Å (c) 90Å.

のFSMへの酵素の吸着の様子をモデルで示したのがFig. 4Bである。細孔径30Åでは酵素分子は粒子の外側のみならず吸着する。また50Åでは酵素のサイズに丁度合致した形で細孔内部に取り込まれる。90Åにおいては酵素のサイズより非常に大きいため吸着量は大きい安定化効果はよくない。

3.2 酵素の超安定化

リグニン分解酵素の一つであるマンガネルオキシダーゼ (MnP) はリグニンや高分子ポリマなどを非特異的に分解する産業上非常に有用な酵素である。しかし、熱などの環境条件に不安定であり、従来の固定化法では十分な安定化ができなかった。そこでFSM-16による超安定化を図った。前項で述べたように超安定化を実現するためには酵素のサイズに合致したFSM-16を選択することが重要である。そこで、MnPの短径は約45Å、長径は約65Åであることから細孔径が30、50、70、90Åのものを合成し、それぞれの安定化効果を評価した。

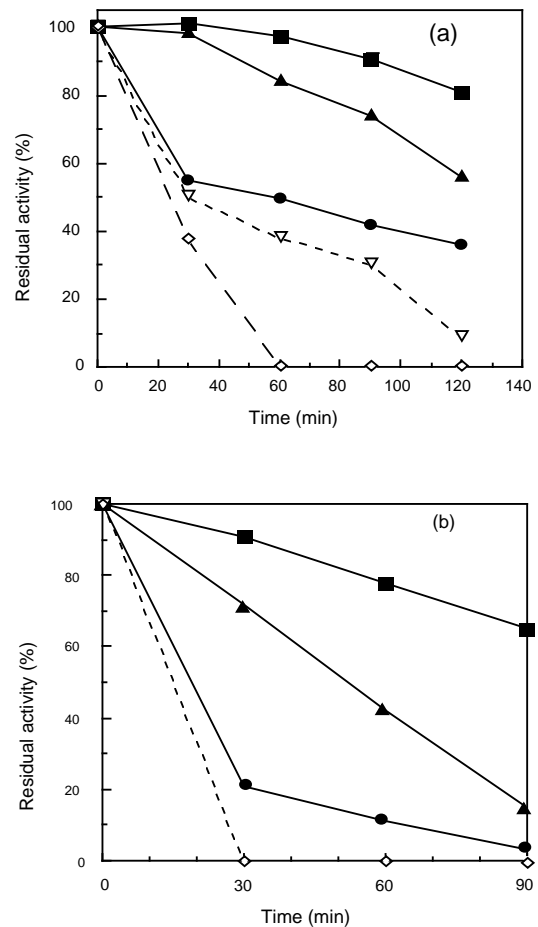


Fig. 5 Effect of thermal incubation of immobilized HRP (a) and subtilisin (b) on enzymatic activity.

□ : FSM-16/50Å, △ : FSM-16/90Å, ○ : FSM-16/30Å, ◇ : silica gel, ● : native enzyme

3.2.1 熱安定性

まず細孔径の違いによる熱安定性について評価した。その結果、酵素サイズに最も合致した70ÅのFSM-16へ固定した場合が最も安定化効果が高く、以下50, 90, 30Åの順であった。

3.2.2 過酸化水素耐性

過酸化水素はMnPの触媒作用に必須(0.1mMが至適)であるが、これより少し高い濃度(0.5 mM以上)では簡単に失活してしまう。この性質がこの酵素の産業応用を妨げている大きな要因である。そこで過酸化水素耐性について検討した。結果をFig. 6に示す。

天然のMnPは過酸化水素濃度0.1mMが最適であり、それを越えて0.5mMになると失活した。その他の固定化MnPの場合、ポリマに固定化したものは過酸化水素の最適値がnativeと同じであるが、0.5mMでも活性は60%程度維持されていた。さらに過酸化水素濃度を上げ、1mMではポリマに固定化した場合は完全に失活した。2mMではsilica gel 5Dに固定化したものも失活した。ところがFSMに固定化したMnPは、最大で6mMまでの濃度でも0.1mMのときのほぼ100%の活性を保つという注目すべき結果を得た。

3.2.3 操作安定性

FSM-MnPにより生成されるMn³⁺量は、反応時間の経過とともに徐々に減少するが、500時間反応後でも約80%の活性を維持していた。

4. スーパー酵素の応用展開

4.1 パルプ漂白への応用

4.1.1 無塩素パルプ漂白

古くから製紙産業においては、塩素を用いた効率的で安価なパルプ漂白技術が確立され、実用化されている。パルプ漂白工程では、木材パルプに含まれる黒色物質の

リグニンを塩素の酸化力により分解除去することが行われるが、多量に使用される塩素により、漂白廃液にダイオキシン類などの有害物質が排出されることが大きな環境問題となっている。この問題に対処するため、塩素の使用量を低減する技術や、有害性の低い塩素化合物による漂白技術の開発が積極的に行われているが、コスト面や効率面での課題が残るほか、何より塩素系化合物を使用する限り、排水中への有機塩素化合物の混入は避けられない。特に、環境問題に厳しい欧米諸国では、塩素を全く使用しないパルプ漂白技術の開発が始まっており、過酸化水素法、オゾン法、酵素法等が報告されている。酵素法は最も環境負荷の少ない漂白法として期待されるが、漂白工程においてリグニンを分解除去できるリグニン分解酵素は、熱やpH等の環境条件に不安定であり、コスト的にも天然の酵素をそのままパルプ漂白工程に使用するのは困難である。リグニンを分解できる酵素として、注目されるリグニン分解酵素の一つであるマンガンペルオキシダーゼ(MnP)をスーパー酵素化し、これを用いて塩素を用いない、環境に優しいバイオパルプ漂白法を開発した。

4.1.2 スーパー酵素を用いたパルプ漂白

現在製紙メーカーで行われているパルプ漂白は、多種類の漂白処理を組み合わせた多段漂白法である。そこで、MnPによるパルプ漂白の実用性を評価するため、MnP処理とアルカリ抽出とを組み合わせた多段処理によるパルプ漂白を試みた。最適条件である酵素反応を39°C、酸化反応を70°Cで行うTSRS処理(Fig. 7)を55分間行った後、アルカリ抽出を5分間行う漂白シーケンスを6回繰り返すことにより、現行法と同等の処理時間(6時間)で目標の白色度(85%)を達成し(Fig. 8)、実用化可能なレベルのパルプ酵素漂白技術を確立した。

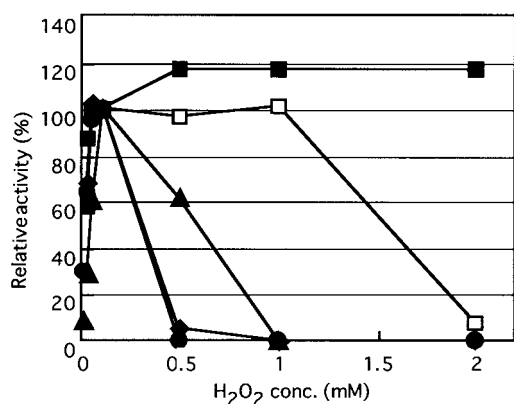


Fig. 6 H₂O₂ dependency of immobilized MnP in various supports.

□ : FSM-16/70Å, ○ : silica gel, ▲ : Emphaze polymer, △ : sol-gel, ● : native MnP

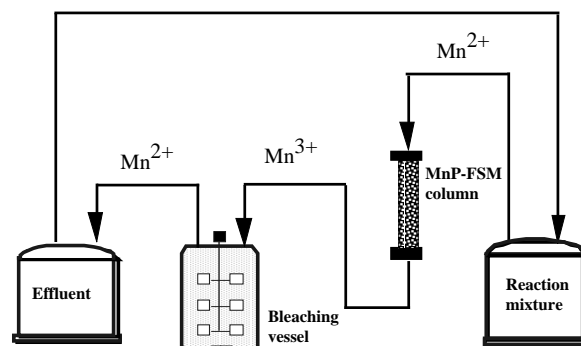


Fig. 7 Schematic diagram of the two-stage reactor system (TSRS) involving MnP immobilized in FSM-16/70Å.

4.2 合成高分子分解への応用

石油を原料とする合成高分子は、本来天然には存在しない構造を有しているため、微生物によって分解されにくいという特徴を有している。このため、耐久性に優れている反面、廃棄物が自然界では分解せず、蓄積し、大きな環境問題を引き起こしている。西田らはMnPがポリエチレンの分解に関与していることを見いだすとともに、ナイロン膜をMnPにより分解できることを確認した⁶⁾。筆者らも、MnPで37°C、7日間、ナイロン膜を処理することによりナイロン分子の平均分子量が低下することを確認した。しかし、この際の反応液組成はリグニン分解の場合と大きく異なることから、その分解メカニズムはリグニン分解とは異なることも考えられる。合成高分子の分解にMnPを利用する研究は比較的新しく、その効率も今は決して高いものではない。合成高分子による環境問題の解決にMnPを利用するためには、分解メカニズムの解析が必須であり、MnPを利用した高分子分解システムの構築と併せて効率的な分解処理法の開発が期待される。

5. まとめ

陽イオン性の界面活性剤を鑄型としたFSM-16やMCM-41では、酵素がその等電点以下の領域でよく結合できることを発見した。メカニズムとして細孔内のイオンの性質が関与していることをイオン性の色素を用いた実験で明らかにするとともに、細孔径と酵素の分子サイズのマッチングが非常に重要であることを明らかにした⁷⁾。すなわちメソ多孔体を多くの酵素の安定化担体として用いる場合には酵素のサイズに合致したメソ多孔体を合成し、その酵素分子を等電点より低いpH領域で固定化することにより、担体への酵素の吸着を十分に行うことができ、超安定化が可能である。難分解性物質を分解でき、環境分野への期待が大きいのが、安定性の問題で実用化が困難であったMnPをFSM-16へ固定化することにより超

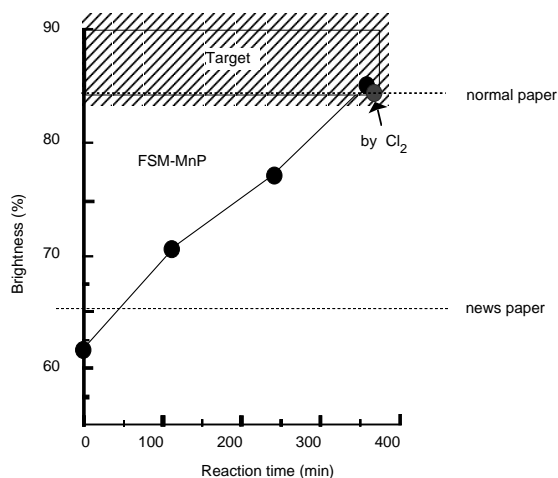


Fig. 8 Bleaching of kraft pulp with TSRS combined with alkaline extraction.

安定化に成功し、塩素フリーのパルプ漂白技術を開発した。筆者らの方法により、プラスチック等の難分解性物質の分解への応用が十分期待できると考えている。今後は今回確立した手法により様々な酵素の安定性を高め、環境にやさしいグリーンケミストリの分野へスーパー酵素を広く応用展開していきたい。

参考文献

- 1) Gold, M. H., et al. : Arch. Biochem. Biophys., 234 (1984), 353
 - 2) Inagaki, S., et al. : Bull. Chem. Soc. Jpn., 69(1996), 1449
 - 3) Beck, J. S., et al. : J. Am. Chem. Soc., 114(1992), 10834
 - 4) Stucky, G. D., et al. : Nature, 396(1998), 152
 - 5) Scott, K. P., et al. : Science, 221(1983), 259
 - 6) Nishida, T., et al. : Appl. Environ. Microbiol., 64(1998), 1366
 - 7) Takahashi, H., et al. : Chem. Mater., 12(2000), 3301
- (2001年1月9日原稿受付)

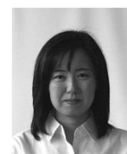
著者紹介



高橋治雄 Haruo Takahashi
 生年：1956年。
 所属：生物部。
 分野：酵素工学および分子生物学。
 学会等：日本化学会、日本生物工学会、日本分子生物学会、日本生物物理学会会員
 薬学博士。



梶野勉 Tsutomu Kajino
 生年：1962年。
 所属：生物部。
 分野：酵素工学および生物反応化学。
 学会等：日本農芸化学会、日本分子生物学会、日本生物工学会会員。
 農学博士。



宮崎千絵 Chie Miyazaki
 生年：1964年。
 所属：生物部。
 分野：人工蛋白質の創製。
 学会等：日本分子生物学会、日本生化学会、日本農芸化学会会員。



杉山英彦 Hidehiko Sugiyama
 生年：1964年。
 所属：生物部。
 分野：蛋白質に関する研究。
 学会等：日本木材学会会員。



浅見修 Osamu Asami
 生年：1952年。
 所属：生物部。
 分野：酵素、抗体の応用に関する研究。
 学会等：日本生化学会会員。
 薬学博士。