

■ 展望・解説 ■

バイオテクノロジーの一断面 ：生体触媒の改変を設計する

A Slice of Biotechnology Design for Mutant Enzymes



大 島 泰 郎*

Oshima Tairo

1. バイオテクノロジーの成立と特徴

20世紀は前半が物理学の時代、後半が生物学の時代と言われることがあるが、1950年代からの分子生物学を中心とした生物科学諸分野の急進展はめざましいものがあり、生命の基本的構成、特に遺伝、代謝、免疫などの現象に関わる生体分子の構造やその相互関係の詳細が明らかになった。1970年頃から、これらの知識を駆使して生体材料や生体の一部を人為的に制御することが可能となった。これを応用した技術がバイオテクノロジーである。

生体や生体反応の利用は、1970年代以前に始まっていることは言うまでもない。それどころか、生物体の利用はおそらく有史前にさかのぼることが出来る。例えば、日本では酒や味噌の製造、西洋におけるビールやパンの製造に微生物を利用する技術、薬草を用いた病気の治療など数え上げ始めたらキリがないほどである。

更に時代が進むにつれて生体利用も進歩し、近代自然科学の成立以後は多種の治療薬の開発・合成、滅菌法や血清療法の開発などの医療技術の進歩、品種改良法や農薬・肥料の開発など農業技術の進歩には、古典生物学の知識も大いに寄与してきた。しかし、これらの生体反応利用には盲目的な面があり、生体の持つ優れた機能をブラックボックス的に用いていた。

一つの例を挙げよう。抗生物質の発見は、ほとんどの伝染病を駆逐し人類から病気の恐怖を取り去った画期的な発見であった。最初の抗生物質の発見は、フレミングによるペニシリンで、1920年代のことであった。しかし、ペニシリンが細菌の細胞壁の合成を阻止することにより抗菌作用を示すという機構がわかったのは1960年代のことである。

バイオテクノロジーが単なる“生物利用”でないことは、生物機能の分子機構を理解し、これを加工したり制御して利用することにポイントがある。このため旧来の生物利用をオールドバイオテクノロジーと呼んで区別することがある。

なぜバイオテクノロジーに注目が集まるのだろうか？ 以下は主に酵素利用技術をバイオテクノロジーの代表として取り上げ、その特色を述べる。酵素は生体内の反応を押し進める触媒に過ぎない。工業で用いられる触媒と違う点はタンパク質から出来ていることであるが、このため以下のような金属触媒にない利点がある。

先ず第一に、触媒としての能率がよい。生体の反応は常温、ことに人など温血動物では体温温度において反応が十分な早さで進行する必要がある。したがって、化学工業において高温高圧を必要とする反応も、生体内では常温付近で進行するよう極めて能率のよい触媒が作り出されている。

例えば、タンパク質の分解は酸を触媒として115°C、20時間と言った条件で行われる。一方、我々が肉を食べれば、そのタンパク質は胃と腸内で酵素の働きの下にやすやすと分解されていく。

第二の特徴は選択性である。酵素は二つの選択性を備えている。一つは、特定の反応しか触媒しないという選択性で、生化学ではこれを反応特異性と呼んでいる。いま、アミノ酸の一つであるグルタミン酸にピリドキサルと金属の錯体を触媒として、高温下に加熱したとしよう。グルタミン酸は活性化され、思い付く限りの反応がいろいろな割合で起こってしまうから、反応産物は多様で、一つ一つの産物の収率は低いものになってしまう。二つのカルボキシル基はどちらも脱炭酸し、それぞれ、 α -、 γ -アミノ酪酸を生ずる。D、Lの間の異性化も起こり、アミノ基が酸化されて2-オキソグルタル酸もできる。

これに対し酵素反応では、それぞれの反応の一つ以上の酵素が対応しているから、一種類の酵素を用いれ

* 東京工業大学生命理工学部生命理学科教授

〒227 横浜市緑区長津田町

ば反応産物は常に一つだけである。化学的には副産物がないといえる。酵素反応では、生産物の分離精製が不用である。

第二の選択性は反応物質に対する選択性で、生化学においては反応物質を基質と呼び（この用語は便利なので有機化学者も用いるようになってきている）この選択性は基質特異性と呼んでいる。例えば、グルコースを酸化する酵素、グルコースオキシダーゼはD-グルコースのみに働き、他のヘキソースはもとより、L-グルコースにすら作用しない。

反応特異性と異なり基質特異性は厳密なものでない場合もある。アルコールをアルデヒドに酸化するアルコールデヒドロゲナーゼは、本来生理的にはエタノールにのみ働けばよいのだが、基質特異性が甘くいろいろなアルコールに反応する。このため、エチレングリコールなどを誤って飲むと中毒を起こす原因となっている。逆にキシロースとキシロースの間の異性化を触媒する酵素はグルコースをも基質とし、フルクトースに転換する。本来の微生物生理学上の意義はキシロースの転換であるが（従ってグルコースに対する触媒活性は低いのだが）、工業的にフルクトースの生産に用いられ、グルコースイソメラーゼという名称がまかり通っているほどである（学術的には、あくまでもキシロースイソメラーゼと呼ぶ）。

酵素利用にとって酵素の特長の第三は、タンパク質で出来ていることである。酵素の持つ特長として述べてきた高効率、高選択性のいずれもが、触媒の本体が柔軟な立体構造をもつ高分子化合物であるタンパク質であることに由来しているが、本体がタンパク質であることは更に別のメリットをもたらす。例えば、捨てても公害を起こす危険が極端に少ない（全くないと主張するつもりはないが）、従来、触媒として用いた重金属が公害を引き起こしてきた例を考えると、この特徴の社会的重要性は将来の技術発展にとって何にも勝ると言えよう。

要するに、酵素を用いると、高効率であるため省エネルギーの、高選択性であるため省資源、かつ省力の、更に無公害のプロセスが実現出来る。まさに未来の技術として社会が要請している要件をすべて備えている。これが酵素利用に熱い眼差しが注がれる理由である。また、ここでは酵素を例にとって述べたが、生体反応の特徴一般を代表しており、これがバイオテクノロジーを振興させなければならない理由でもある。

2. 酵素利用

酵素はいろいろな面で利用されるようになってきた。一般にはそれと意識されていないことが多いが、多方面に渡っている。

第一は分析試薬としての利用で、選択的に、迅速、かつ省力の分析が可能である。ほとんどすべての人が恩恵を蒙っているのは、糖尿病の検診におけるグルコースオキシダーゼの利用である。尿中（血液中でも同じである）のグルコース量は化学的な方法で定量してきたが、これは常に妨害物質の存在を考慮に入れなければならない。また、グルコースの還元力を測定するので、加熱、比色などの操作が必要で、技術者の手を借りて行われてきた。これに対し、最近、ろ紙にグルコースオキシダーゼ、更に反応に伴い生ずる過酸化水素に働いて色素を酸化する反応を触媒する酵素ペルオキシダーゼおよび適当な色素を浸みこませた試験紙が用いられている。

集団検診で行われているように、これだと尿中につけるだけで、1分後には結果が判定できる。高効率な酵素を用いているので、加熱操作は必要なく、選択性が高いので、フルクトースなどの他の糖を含め、関連物質の存在は影響せず、このため尿を前処理して予め共存物質を除いておく操作も必要としない。操作は簡易で、誰でも行えるので技術者や特別な機器を必要としない。酵素法による血糖測定にはバイオテクノロジーの特徴がよく現れている。

医療診断では酵素試薬はふんだんに用いられるようになった。多数の病気の診断に酵素が用いられており、更に、酵素のほか免疫抗体を利用した鋭敏な診断技術は、輸血における肝炎ウィルス、AIDS ウィルスの感染防止の切札である。更に酵素利用分析技術に遺伝子操作技術を加えた遺伝子診断法は、最も厳密な親子関係や犯人の特定など病気以外の領域でも活躍するようになっていく。

このような酵素による分析は医療にとどまらず、工業、農業分野にも応用できる。特に電極や半導体と結びつけた“酵素センサー”が有名である。また研究用の酵素試薬は単に分析だけでなく、合成反応にも利用されている。

酵素を利用した合成反応の特長は、その高い選択性に基づく立体特異的合成である。アミノ酸合成に応用すれば、L-型のみを合成できる。酵素による合成技術は現在のところ食品関係への応用が目立っている。

例えば上述の“グルコースイソメラーゼ”によるグルコース・フルクトース混液（平衡定数は温度に依存するが、常温付近では、ほぼ1:1の混合液となる）の製造がある。天然からはシロップとして知られるものに当たり、今では、一般の食堂で提供されるシロップはこれである。更に各種の飲料の甘味剤として多量に用いられている。この反応では高温にするほど平衡はフルクトースに寄り、フルクトース合成に有利になるので、耐熱性グルコースイソメラーゼを用い、高温（50℃以上）下に反応を行なわせる。人工的に本酵素の耐熱性を上げようとする試みもある。

酵素合成の特長をうまく生かした典型例は、ムシ歯予防用の糖パラチノース合成であろう。ムシ歯は口内細菌による蔗糖の代謝が原因で起こる。従って、ムシ歯予防するには、この機構のどこかを止めれば良いわけである。経験的に蔗糖を控えるとムシ歯予防になることが知られているが、一方、幼児の発育に糖分摂取は不可欠である。この矛盾した状況を解決すると期待されているのがパラチノースで、これは、蔗糖がグルコシル-1, 2-フルクトースの構造を持つ二糖であるのに対し、パラチノースはグルコシル-1, 6-フルクトース構造の二糖、すなわち、結合特異性が違う以外、蔗糖と同じ構造の異性体である。

パラチノースは天然にほとんど存在せず、人工合成以外供給の道はない。幸い、蔗糖からパラチノースへ転換する酵素が発見され、これを用いて比較的安価にパラチノースが合成出来るようになった。すでに多くの食品に利用され、当たり前の商品として市場に出回っている。糖の結合を有機化学的に変換しようとする大変で、パラチノース合成は酵素ならではの技術である。

酵素利用は医療や食品に限ることはなく、次第に他の分野に拡大しようとしている。例えば、石油化学においても、工程の一部を酵素に置き換えることが行われている。生体利用は化学分野を越えて、他の工学分野にも拡大している。例の一つは鉱業である。微生物を利用して有用金属の回収を計る生物精練法は、すでに一部実用に達している。

ここまで、酵素を例にとって生体利用のすぐれた面を強調してきた。しかし、反面欠点もある。酵素について述べるなら、高価であるのに不安定で寿命が短いこと、時には特異性が欠点となり希望する反応を触媒しないことなどが挙げられる。酵素利用がまだ限られている理由はこれらの点にあり、人工的な操作によ

り、これを解決することが求められている。

3. タンパク質工学

酵素利用を一層発展させるために、人工的に改良、改質していく必要があるが、これがタンパク質工学と呼ぶ新分野である。一言でいうなら、タンパク質を人工的に設計し、設計通りの空間配置を持ったタンパク質になるアミノ酸の並びを定め、このようなアミノ酸の並びを規定している遺伝子を合成し、これを微生物に与えることで、設計通りのタンパク質を合成しようというものである。将来的には、もっと単純化して、設計したタンパク質を人工的に合成すればよいのだが、現状ではその技術は未完成で、生物のタンパク質合成能に頼るしかなく、少しまわりくどいやり方となっている。

タンパク質工学が必要とする全技術が十分成熟しているわけではない。現状では特定機能や特定の物性を持ったタンパク質の設計部分が最も未熟で、正確には設計できていない。これに対し、遺伝子操作部分は完成された技術といってよく、多くのステップが自動化されている。そこで幾分か犬も歩けば式のやり方であるが、いろいろな試みが行なわれ、一部は大きな成功をみている。

例えば、酵素の耐熱性を上げることを目指してみよう。好熱菌が生産する耐熱酵素の研究から、耐熱化の機構の一つは、分子内部の疎水性を増すことであると知られているから、これを目的とする酵素タンパク質に適用することを試みる。ことに α -ヘリックスの分子内部疎水性コアに向かった側鎖をより疎水性の高い側鎖に代えることが耐熱化機構の一つだとわかっている。ある常温菌由来の酵素は丁度 α -ヘリックスの内部に向かう側鎖の一つがグリシンである。これをより疎水性の高いアラニンに代えると耐熱化出来るだろうと推理できる。

この推測に従って、この酵素をコードしている遺伝子DNAの一部を人工的に改変し、これを大腸菌内で働かせて設計した通りのタンパク質を作らせてみたところ、期待通りの安定化に成功した例がある。この他別の分子的機構を適用して安定化に成功した例もいくつかある。問題はいつもうまくいくとは限らず、これらモデル系では成功しているが、実用酵素の耐熱化にはまだ成功した例は聞いていない。

同時に基質特異性を変えることもできる。基質の結合様式を解析して、これから別の化合物がうまく結合

できるよう設計してみる。このやり方でもいくつかの成功例があるが、前の例と同様、設計能はまだ低く、いつもうまくいくとは限らない。むしろ現状では生物の設計能に頼る方が早く、免疫抗体の認識能に着目して人工酵素を作るの方が成功する率は高いと言える。例えば目的とする反応の遷移状態を想定し、その化合物か、それに近い構造の化合物を合成し、これを抗原とする免疫反応を起こさせて抗体を作る。この抗体は目的化合物を遷移状態に導いて結合するので酵素として働く。アブザイムと名付けられた抗体を利用した人工酵素は時に高い活性を示し、今後の発展が期待されている。

4. タンパク質工学のこれから

タンパク質工学は当初の期待したほどの成果が上がっていない。このためタンパク質は高度に完成された作品で、これに手を加え、大幅に改良することは不可能ではないかという悲観論も出ている。例えば、多くの好熱菌酵素の常温付近の活性は、相当する常温菌の酵素活性に比べ低いので、安定性と活性は両立しないのではないかといった考え方である。

これらの考えは、タンパク質について十分な知識がないことに由来する誤った悲観論のように思える。進化を通して個々の生物は、それぞれの生理的要求や環境条件に適した働きのタンパク質を作ればよく、また、可能性のすべては試していないように思われるからである。酵素タンパク質はどこまで安定であろうか？最近の好熱菌の研究は100°Cでも失活しない酵素の存在が珍しくなくなっている。常温付近の活性についても、一部の好熱菌酵素では、相当する常温菌由来の酵素と比べて遜色のないものも知られているから、安定性と活性は互いに相反する関係にあるとは言えない。タンパク質は不安定で短寿命という先入観があるが、寿命でいえば一番短寿命の酵素は生物細胞内において10分以内であるのに対し、長いものは数カ月から眼のレンズタンパク質のように一生にわたって働くものもあるから、短寿命は必要条件ではない。なぜ寿命にこんなに大きな差が出るのか、その分子的な機構はわかっ

ていない。結局、我々のタンパク質に関する知識が不十分で、長寿命なタンパク質を正確に設計できないにすぎない。

タンパク質にはどの位の可能性があるだろうか？最も平均的な酵素タンパク質は400程度の重合度である。20種のアミノ酸を単量体としているから、可能な分子種類の数は20の400乗で、これは10の520乗に当たる。これはとてつもない数で、これだけの種類のタンパク分子を各1分子ずつ作っても、宇宙の全重量をはるかに越える。生命の全歴史、すなわち生命の誕生から今日までは10の17乗秒に達しないから、自然が仮に大急ぎで実験したとして、毎秒千種ものタンパク質分子を調べてきたとしてすら10の20乗種しか調べ終わっていない。このような比較から結論できるのは、生物はタンパク質の可能な分子種のほんの僅かな部分だけを使って生物界を構成しているにすぎないということである。

人間の技術は更にこの可能性を拡大する。自然のタンパク質ですら、構成するアミノ酸残基の種類は20以上である。細胞内では20のアミノ酸をつなげて高分子分子を作るが、出来上がってから、一部の残基を加工している。例えば、動物の皮膚を作るコラーゲンタンパク質では、プロリン残基を水酸化して、ヒドロキシプロリンに変える。一部の酵素では、チロシンにリン酸が加わり、ホスホチロシンに変わるが、この修飾がガン化と深く関わっていることがわかってきている。

自然がこうして増やしたアミノ酸残基の種類は何十種にも上る。ところが人工では制限なしに種類が増やせるから、タンパク質の可能な数は無限である。この面でも予備的な成果が挙がっており、20種以外のアミノ酸を加えたタンパク質の人工合成が報告されている。これがバイオテクノロジーの一面を物語っており、まだテクノロジーとしては揺らんな期にある。成熟するには我々の知識が不十分な面があり、タンパク質工学のように現状で予期したほどの成果がないからテクノロジーにつながらないと結論しては早計にすぎよう。現在のところバイオテクノロジーの未来可能性は、無制限である。