

## 酵素反応の最適化

兒島 憲二<sup>1</sup>・滝田 禎亮<sup>1</sup>・保川 清\*

### はじめに

酵素反応の最適化に真っ向から取り組んでいる研究者は、大学よりも企業に多いと思われる。企業では、生産性の向上はきわめて重要であり、酵素による物質生産を行う場合、酵素反応の最適化が永遠の課題となる。また、酵素反応を含むパッケージキットを開発する場合、反応に必要な成分を含む溶液も合わせて開発する。一方、大学でのバイオの研究者は酵素反応を取り扱うことは多いが、キットを用いるとプロトコル通りに反応液を調製すればよいだけなので、反応液の組成について思いが及ばない。実際、キットに添付される緩衝液の成分は公表されていないことも多い。しかし、酵素反応を扱う以上、酵素反応の最適化についての理解が要求される。特に、酵素反応を含む実験が全体としてうまくいかないときは、反応条件が適当であるかどうか疑ってかかる必要がある。本稿では、酵素反応の最適化について、いろいろな観点から紹介していきたい。

### 酵素反応を行う上での注意点

通常、一つの酵素に対して複数のアッセイ系が報告されている。したがって、組織や細胞あるいは培養上清から酵素または酵素阻害物質を精製する場合、各アッセイ系の特徴を理解したうえで、適切なアッセイ系を選択しなければならない。

寒天培地に形成された円周状の透明帯のことをハローと呼ぶ。カゼイン分解酵素を大腸菌で発現させ、その培養上清からその酵素を精製する場合、培養上清をあるクロマトグラフィーにかけて100のフラクションが得られたとしよう。目的の酵素がどのフラクションに含まれているかを知るには、カゼインを含む寒天培地に各フラクションをスポットし、一定時間後に、不溶性粒子であるカゼインが分解されたことで生じるハローの形成を目視で調べる方法がよく用いられる。この方法の長所は簡便であり、多くのサンプルを処理できることである。

精製とは目的の酵素を純粋な状態にすることであるが、それは比活性を上げることである。酵素の精製が適切に行われているかを把握するために、精製表が作成さ

表1. 精製表

工程	液量 (mL)	タンパク質濃度 (mg/mL)	タンパク質量 (mg)	酵素濃度 (units/mL)	酵素量 (units)	比活性 (units/mg)
A	1,000	2.0	2,000	5.0	5,000	2.5
B	10	90	900	450	4,500	5.0
C	10	8.1	81	405	4,050	50
D	1	7.3	7.3	3,650	3,650	500
E	5	0.14	0.7	700	3,500	5,000

A:抽出, B:硫酸分画, C:疎水性相互作用クロマトグラフィー, D:イオン交換クロマトグラフィー, E:ゲルろ過クロマトグラフィー

れる。精製表の一例を表1に示す。ここで、酵素量(units)とは活性に基づいた酵素の量である。市販の逆転写酵素の添付資料に「Poly(rA)・oligo (dT)<sub>12-18</sub>を鋳型/プライマーとして、37°C、10分間に1 nmolの<sup>3</sup>H] dTTPを取り込む酵素活性を1 unitとする。」などと書かれてあるのはご存知であろう。酵素量を求めるためにどのような酵素反応を行うか、さらに目的酵素の酵素量をどのように定義するかは、研究者の自由である。注意すべきことはその酵素反応で得られた測定値が酵素の量に比例することである。酵素反応の測定は「試料採取法」と「連続測定法」に大別される。前者は、経時的に反応液を採取し、すぐに反応を止めてから、生成物の増加量（または基質の減少量）を別の方法で定量する。後者では、反応に伴う反応液の吸光度変化などをリアルタイムに追跡する。いずれの場合も、測定値と生成物濃度が比例する定量域を逸脱しないことが重要である。「連続測定法」は「試料採取法」よりも操作が簡便であるという長所をもつ。一方、基質には天然の基質にはない官能基（たとえば、ジニトロフェニル基）が含まれることが多く、基質を溶解させるのに有機溶媒を用いたりするので、反応効率の低下に注意を要する。酵素量が高い再現性が求められるので、反応液の組成や操作についても厳密に決定する必要がある。一方で、操作をできるだけ簡便にし、貴重な酵素や基質を無駄に使わないための工夫も重要である。

\* 著者紹介 京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 (教授)  
<sup>1</sup> 京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 (助教)

E-mail: yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp

酵素反応の速度論的解析を行う場合、酵素濃度を正確に求めることが重要である。また、緩衝液、基質溶液、酵素溶液を混合して反応を開始させる場合、基質溶液と酵素溶液の組成が反応条件に影響しないか注意を要する。酵素反応速度論の原理については、『生物工学会誌』の連載「続・生物工学基礎講座—バイオよもやま話—」の「原典からの酵素反応速度論」を参考にされたい<sup>1)</sup>。

品質工学の技法による反応条件の最適化

反応液中の成分の種類や濃度、さらには温度やpHをまとめて最適化するためには、タグチメソッドとよばれている品質工学の技法が用いられる。この方法では、一例であるが、13個の要因を設定し、各要因に対して3個の水準を設定する(表2)。ここで、アルファベットの*i*は数字の1と見誤りやすいため通常用いない。

要因が温度であれば、水準1, 2, 3は30, 40, 50°C、要因がNaCl濃度であれば、水準1, 2, 3は0, 50, 200 mMという具合である。実験条件は本来3<sup>13</sup>通りであるが、直交表を作成し、27通りとする(表3)<sup>2)</sup>。この直交表では一つの要因に対して、どの水準も9個(27通り/水準数3)の実験条件が割り振られている。直交表はパズルのようなものなので、自分で作成することもできるが、専門書<sup>2)</sup>を参考にした方が無難である。

各実験の結果を数値化する。この数値は、測定により得られた何らかの値そのものであっても、それをスコアにしたものであってもよいが、実験結果がよいほどこの値が大きくなるようにする。

実験条件*m*のスコアを*s<sub>m</sub>*とし、 $(S/N)_m = -10 \log (s_m^2)$ とする。 $(S/N)_m$ は「実験条件*m*のSN比」とよばれ、この値が小さい(絶対値が大きい)ことは実験結果がよいことを意味する。要因*x*の水準*i*の $(S/N)$ を $(S/N)_{x,i}$ とし、

水準*i*が使われている9個の実験条件の $(S/N)_m$ の合計とする。たとえば、要因1において水準1が使われている実験条件が1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9である場合、 $S/N_{1,1} = S/N_1 + S/N_2 + S/N_3 + S/N_4 + S/N_5 + S/N_6 + S/N_7 + S/N_8 + S/N_9$ となる。 $(S/N)_{x,i}$ が小さいことは、要因*x*の水準*i*は要因*x*の他の2個の水準よりも好ましいことを意味する。

要因*x*の変動を*V<sub>x</sub>*とし、 $V_x = (S/N_{x,1}^2 + S/N_{x,2}^2 + S/N_{x,3}^2)/9 - (S/N_1 + S/N_2 + \dots + S/N_{27})^2/27$ とする。*V<sub>x</sub>*が大きいくほど、要因*x*の3個の水準の $(S/N)_m$ のばらつきが大きいくこと、すなわち要因*x*の反応に与える影響が大きいくことを意味する。要因*x*の寄与率を*P<sub>x</sub>*とし、 $P_x = V_x / (V_1 + V_2 + \dots + V_{13}) \times 100$ とする。*P<sub>x</sub>*は全体を100としたときの*V<sub>x</sub>*の相対値である。

$(S/N)_{x,i}$ を比較することで、要因ごとにとどの水準が好ましいかがわかる。*P<sub>x</sub>*を比較することで、どの要因の影響が大きいくかがわかる。次の実験ではこの要因の水準の幅を狭くする。このような実験を繰り返すことで最適反応条件にたどり着く。すなわち、どの要因においても水準2が最適となり、寄与率がどの要因も一定となる。タグチメソッドによる酵素反応の最適化の論文が報告されている<sup>3,4)</sup>。

本技法は要因数をもっと減らすことや各要因に対する水準の設定数を3個から2個に減らすことも可能である。参考までに4個の要因を設定し、各要因に対して3個の水準を設定した場合の実験条件を表4に示す。任意の2要因(たとえば、AとB)について、その水準のすべての組合せ(A1, B1; A1, B2; A2, B1; A2, B2)が同じ回数(2回)現れていることがわかる。本技法を、酵素反応条件を最適化するのに役立ててほしい。

表2. 要因と水準

要因	水準		
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
⋮	⋮	⋮	⋮
N	N1	N2	N3

表3. 実験条件

実験	水準の組合せ												
1	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	J1	K1	L1	M1	N1
2	A1	B2	C3	D1	E2	F3	G1	H2	J3	K1	L2	M3	N1
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
27	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	J3	K3	L3	M3	N3

表4. 実験条件

実験	水準の組合せ			
1	A1	B1	C1	D1
2	A1	B2	C2	D2
3	A1	B3	C3	D3
4	A2	B1	C2	D3
5	A2	B2	C3	D1
6	A2	B3	C1	D2
7	A3	B1	C3	D2
8	A3	B2	C1	D3
9	A3	B2	C2	D1

### 糖類添加による酵素の安定化

酵素はタンパク質であるため容易に変性する。したがって、反応時だけでなく保存時も含め、失活速度を下げる工夫が必要となる。

糖類が酵素の安定性を向上させることが多くの酵素で報告されている。特に、凍結乾燥時や高温での反応ではこの効果が著しい。このような糖類として、二糖であるスクロース、トレハロースおよびマルトース、単糖であるグルコースおよびフルクトースがあげられるが、もっとも利用されているのはトレハロースであろう。ウシ小腸アルカリホスファターゼの熱失活曲線を図1に示す。1.5 Mトレハロース存在下58°Cで30分間熱処理したときの残存活性が50%以上であるのに対し、3 Mグルコース存在下58°Cで20分間熱処理したときの残存活性が50%以下であることから、トレハロースの効果はグルコースよりも高いと言える<sup>5)</sup>。

糖類によるタンパク質安定化の理論として、水素結合置換理論とガラス状態理論がある。前者では糖がタンパク質の回りの水分子に置き換わり、水素結合をとることにより安定化する。後者では、糖を含む水溶液の乾燥後の構造がガラス状態であり、動きが制限されることにより安定化される<sup>6)</sup>。

糖類添加以外にも酵素の安定化法として、ウシ血清アルブミンの添加、ポリエチレングリコールによる化学修飾が知られている。酵素の不溶性単体への固定化は産業用酵素で広く応用されているが、これも酵素の安定化の方法の一つと言える。

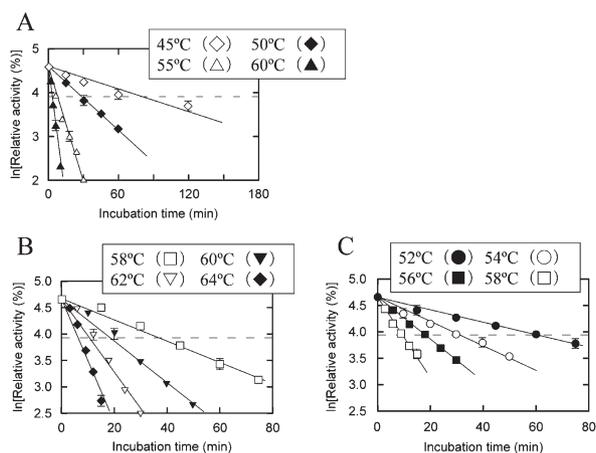


図1. ウシ小腸アルカリホスファターゼの熱失活曲線。糖類非存在下 (A), 1.5 Mトレハロース存在下 (B) あるいは3.0 Mグルコース存在下 (C) で一定時間熱処理した後に20°Cで活性を測定した。縦軸は残存活性(熱処理前の活性を100%としたときの熱処理後の活性の相対値)を示す、破線は残存活性50%を示す。

### 阻害要因の排除

酵素反応は阻害剤非存在下でも阻害を受けることがある。酵素反応の最適化にはこれらの要因を排除しなければならない。

Michaelis-Mentenの式を中心とする酵素反応速度論では反応初速度は酵素濃度に比例し、基質濃度に対しては飽和型曲線を示す。しかし、酵素反応は酵素濃度や基質濃度が過剰な場合、阻害されることがある。

好熱性細菌 *Thermotoga petrophila* K4株由来ファミリーA DNAポリメラーゼ (K4pol) と鹿児島県小島島の硫気孔より単離された超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来耐熱型DNAポリメラーゼ (KODpol) はともにPCR酵素として利用されている。K4pol<sub>L329A</sub> は藤原らにより開発されたK4polの変異体<sup>7)</sup>、RTXはEllefesenらにより開発されたKODpolの変異体<sup>8)</sup>で、ともに逆転写酵素活性を有する。K4pol<sub>L329A</sub> と RTXのcDNA合成活性とPCRでの活性の酵素濃度依存性を図2に示す。RTXはK4pol<sub>L329A</sub> よりも100倍低い濃度で活性を有するが、100 nM以上の高濃度では阻害が見られた<sup>9)</sup>。PCRでのこのような阻害はKODpolでは報告されていないことから、RTXは変異により逆転写酵素活性を獲得したことに伴い、核酸に非特異的に結合する性質を有したものであると思われる。酵素と基質の結合は、特異的な結合だけではないことに注意し、酵素と基質が過剰な濃度で反応を行わないことが重要である。

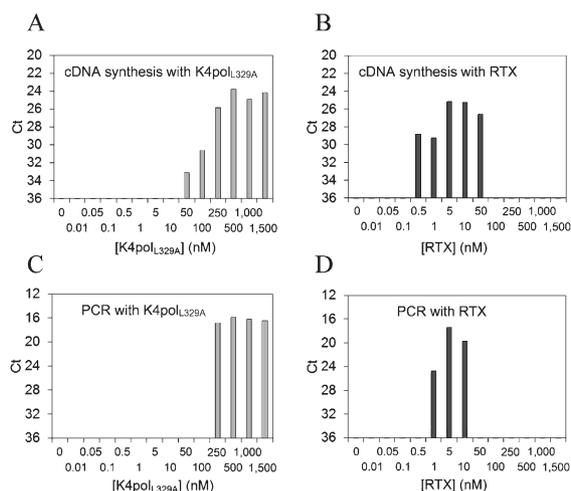


図2. cDNA合成とPCRの効率の酵素濃度依存性。(A, B) 各酵素濃度でcDNA合成反応(50°C 30分間)の後、リアルタイムPCR(95°C 30秒, 57°C 30秒, 72°C 30秒, 45サイクル)を行った。(C, D) 各酵素濃度でリアルタイムPCRを行った。縦軸は蛍光が立ち上がったサイクル数を示す。

## 添加物による反応効率の向上

**1. Water mimics** タンパク質は、周囲を囲む水分子と多数の水素結合を形成することで本来の構造をとる。しかし、加水分解反応の逆反応や一部の転移反応においては、水分子は反応効率を低下させるので、できれば反応液から除きたい。グリセロール、ホルムアミド、2-アミノエタノール、1,3-プロパンジオール、ギ酸などはwater mimicsとよばれ、水分子と同様に水素結合を形成できる。これらを水の代わりに用いることで反応効率を上げることができると報告されている。

**2. 有機塩基** 有機塩基とは $H^+$ と結合できる有機化合物であり、メチルアミンやトリエタノールアミンのように窒素原子を含む化合物があげられる。リパーゼは、脂肪の分解反応だけでなく、逆反応によるグリセリンと脂肪酸からの脂肪の合成やエステル交換など、食品産業などのさまざまな工業分野で利用されている。リパーゼの反応効率を上げるために、有機塩基が添加物質として用いられている。

**3. 塩** 一部の酵素は塩の添加により活性が劇的に向上する。たとえば、微生物由来の中性亜鉛プロテアーゼであるサーモライシン（以下TLNと略す）では、アスパルテームの前駆体である*N*-carbobenzoxy-L-Asp-L-Phe methyl ester（以下ZDFMと略す）を基質として、pH 7.0、25°Cにおいて3.8 M NaClを添加すると、非添加時の6~7倍の活性を示した<sup>10)</sup>。活性に対するカチオンの効果は $Na^+ > K^+ > Li^+$ であり、イオンの水和効果の強さを示すホフマイスター系列( $Li^+ > Na^+ > K^+$ )と異なったことから、サーモライシンのNaClによる活性化には媒質の誘電率の増大だけではなく、TLNと $Na^+$ との相互作用が関与していると考えられている。

**4. クラウンエーテル** クラウンエーテルは $(-CH_2-CH_2-O-)_n$ で表される環状のエーテルおよびその誘導体である。クラウンエーテルはその内部に金属イオンを取込むことができる。クラウンエーテルおよび酸素原子がイオウ原子に置換されたチオクラウンエーテルは、リパーゼによるアセテートの加水分解反応やアリアル

コールのエステル交換反応の反応効率を上げるために用いられている。

## 生成物の反応系からの除去

逆反応の効率を上げるためには、生成物を反応系から除去することが重要となる。産業酵素であるTLNは、*N*-carbobenzoxy-L-Asp（以下Z-L-Aspと略す）の $\alpha$ -カルボキシル基とPhe methyl ester（以下Phe-OMeと略す）ラセミ体中のL-Phe methyl esterの $\alpha$ -アミノ基を脱水縮合し、ZDFMを合成する反応を触媒する<sup>10)</sup>。しかし、この反応は逆反応であるため、約3%が脱水縮合したところで平衡に達してしまう。TLNの至適pHは7であるが、この反応をpH 6付近で行うと、ZDFMはすぐに未反応物D-Phe-OMeと付加化合物を形成し沈殿する。すなわち、生成物が反応系から除かれるので反応がいくら進んでも平衡に達することがなく、常に合成反応が起きる。

## おわりに

遺伝子工学の実験では何段階もの酵素反応を連続して行うことが多い。一つひとつの反応はキットを使えば確かに簡単であるが、それだけに目的の結果が得られないとどうしたらよいかわからなくなってしまう。酵素反応は阻害を受けやすく、反応条件は多くの試行錯誤の後に最適化されたことを認識したうえで、一つひとつの反応を注意深く行うべきである。

## 文 献

- 1) 知名秀泰・岡田 豊：生物工学, **92**, 20 (2014).
- 2) 立林和夫：入門 タグチメソッド, 日科技連出版社 (2004).
- 3) Dash, R. N. *et al.*: *Saudi Pharm. J.*, **24**, 92 (2016).
- 4) Okano, H. *et al.*: *Enzyme Microb. Technol.*, **96**, 111 (2017).
- 5) Sekiguchi, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 95 (2012).
- 6) 鈴木哲夫：日本食品工学会誌, **11**, 117 (2010).
- 7) Sano, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 315 (2012).
- 8) Ellefson, J. W. *et al.*: *Science*, **352**, 1590 (2016).
- 9) Okano, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 275 (2018).
- 10) Inouye, K.: *J. Biochem.*, **112**, 335 (1992).