

酵素の生産と利用技術の系統化

Systematic Survey of the Technical Development for Production and Application of Enzyme

中森 茂 Shigeru Nakamori

■ 要旨

わが国における酵素技術、つまり酵素の生産と利用技術の系統化調査を行った。

酵素は動植物から微生物まで、あらゆる生物がもつタンパク質を主成分とする生体触媒である。生物の生命活動は生体内の化学反応によって営まれているが、これらの化学反応を正確、かつ円滑に進行させる触媒が酵素である。

酵素の特徴は常温常圧の穏やかな条件下で反応を進めること、酵素は生体から取り出し、この反応を試験管の中で再現できること、酵素には基質特異性があり、基質（原料素材）を厳密に選択すること、熱などの過酷な条件下では失活すること、などである。

酵素の実体が明らかにされたのは19世紀後半のことであるが、酵素の実体を知ることのなかった古来より、人間は酵素をいろいろの形で有効に活用してきた。チーズの製造や酒類の発酵などである。日本は温暖湿潤なモンスーン地帯に位置し、そこでは米作が行われ、大豆が生産され、カビがよく生育し、醸造技術が発達し、米や大豆を原料として清酒、味噌、ショウユなどが生産された。醸造技術は微生物を活用する技術であり、酵素技術でもある。そのような酵素や微生物技術が発達した土壌の上に、近代の欧米で生まれた微生物学や分子生物学の知見や情報がいち早く導入され、日本独特のアミノ酸や核酸発酵技術が生まれ、酵素や抗生物質の生産技術が発達して、日本は今やこの分野では世界のリーダーの一つに数えられるようになった。

日本の酵素産業には酵素そのものを製品として扱う企業と、酵素を手段として製品の製造に活用する企業がある。日本の酵素産業はアミラーゼの生産からスタートし、その後糖質関連、タンパク質分解など、多彩な製品を生み出し、また日本独特の特徴のある酵素を多数生みだしてきた。酵素の市場規模は世界で4—5千億円程度と言われる比較的小さなものであるが、酵素による生産物の規模は莫大なものがある。

わが国の酵素類の輸出入額を見ると、1960年代から2000年までは輸入超過の状態が続いていたが、2000年を境に輸出超過に変わった。このことは我が国の酵素生産と利用技術が近年大きく進展していることを示している。酵素をアミノ酸や核酸などの最終製品の生産手段として活用している企業では酵素を生産する微生物を酵素源として販売しているわけではないが、製品については特徴のある環境調和型のプロセスをもって、有利な競争力を展開しているケースが多い。

現在活用されている酵素の大部分は微生物に由来する。特に今後新しい酵素の開発は新しい微生物に期待されるし、また動植物由来のものも、組換えDNA技術の進展により微生物による生産が可能となった。したがって、ほぼすべての酵素生産は微生物によるものを中心となると考えられるため、酵素の生産技術の流れはつぎの3項にまとめることができる。

- ① 生産菌株のスクリーニング→生産菌株の改良→大量培養
- ② 培養液からの酵素の単離・精製
- ③ 培養と単離・精製工程のエンジニアリング

生産菌株のスクリーニングは新規な酵素の開発のために最も重要な技術である。生産株の改良については、突然変異、組換えDNA、タンパク質工学などの技術が多面的に活用されている。酵素の単離・精製は溶媒沈澱、塩析、等電点沈澱や、各種のクロマトグラフィーが活用されている。

一方、酵素の利用技術については、酵素標品が粉末状の場合には扱いやすさや、粉末の飛散を防止するために顆粒化技術が、また酵素と生産物との分離が必要な場合には固定化技術が要求される。そのほか、例は多くはないが、医療用に使われる酵素で異種の生物に由来するものでは免疫反応のために使用が制限される場合がある。このため免疫反応の防止のためにポリエチレングリコールなどによる処理が行われている。

このようにして、わが国ではほとんどのアイテムの酵素は品揃えされている状況にあるが、本報告では、デンブンおよび糖質関連、タンパク質関連、アミノ酸関連など、現在市販されている、あるいは工業化されている酵素について、生産株、用途、酵素反応式等について記述した。

今後の酵素技術に期待されるのは有用物質の合成、廃棄物や難分解性物質の分解、物質の分析など、甚だ広く大きい可能性が考えられるが、それらのテーマは世界的な課題とされる「健康と生命」、「資源とエネルギー」、「地球環境」、これらの保全と確保が中心となるであろう。省エネルギーと地球環境にやさしいバイオテクノロジーと酵素技術に寄せられる期待は大きいものがある。すでに多くの実績を積み上げてきたわが国の技術をもって、それらに応えるには、さらに新しい機能をもつ酵素の開発が必須である。現在より一層の密な産学共同体制の中から開発を進めることが重要と思われる。

■ Abstract

Current state of enzyme technology, including techniques for the production and application of enzyme, was systematically surveyed.

Enzymes are living catalysts, namely biocatalyst possessed by all living organisms, from one-celled organisms to multi-cellular animals and plants. Almost all the activities of life within living bodies are maintained by chemical reactions. Enzymes catalyze these reactions precisely and smoothly. There are several characteristics of enzymes necessary for understanding enzyme technology : (a) they catalyze chemical reactions under mild conditions, namely at room temperature, neutral pH, and mild pressure, (b) they can be isolated from living bodies and be tested in test tubes, (c) they have substrate specificities and select the substrates strictly, (d) they have instability and lose activity in harsh conditions such as at high temperatures, (e) and so on.

Humans have used enzymes effectively since prehistoric times without any specific knowledge about enzymes. It was in the late 19th century that understanding of the basic workings of enzymes was achieved.

In Japan, which is located in a monsoon-prone area of eastern Asia with high temperatures and high humidity, molds as well as cereals such as rice and soybeans can grow well. As a result, various brewed products, such as Japanese sake, soybean paste (miso), and soy-sauce were able to be manufactured using these materials. Thus, applications of enzyme technology and microbiology, namely, brewing techniques, have been developed especially in our country.

These traditional Japanese techniques were combined with modern scientific and technical information about microbiology and molecular biology, especially related to antibiotic production techniques, developed in Europe and America. Various unique fermentation techniques have been established after World War II in Japan, such as fermentative production of amino acids, nucleotides, enzymes, antibiotics, and so on. This led to Japan becoming one of the current leaders of enzyme and fermentation technology in the world.

The Japanese enzyme industry consists of two types of companies: those that supply enzymes, and those that produce various products made with enzyme technologies.

The start of the Japanese enzyme industry was the production of amylase for the removal of paste, which was used for processing fibers. Thereafter, various enzymes such as those for sugar processing, hydrolysis of proteins, and so on, have been developed by original Japanese techniques.

The value of the world's enzyme supply in 2000 was estimated to be ¥4,200 billion, of which Japan occupied one-tenth, or about ¥400 billion. From 1970-1990, the amount of enzyme imported Japan exceeded the amount exported. However, the exports have exceeded imports since 1998. From this fact, we can see that Japanese enzyme techniques are progressing faster than those of other countries.

As most enzymes

Originate from microbial sources, the flow of the production techniques of enzyme can be summarized by the following three,

- 1) Screening of producing strains → improvement of producing strains → large scale cultivation → production of enzymes in culture liquid
- 2) Isolation and purification of enzymes from culture liquid
- 3) Plant engineering for large scale cultivation and isolation as well as purification.

Mutations, recombinant DNA techniques, and protein engineering techniques have been applied to improve enzyme producing strains. Improved strains are introduced into large scale cultivations. Techniques to isolate enzymes from culture liquid include precipitation of enzymes by solvents, salting out, and by adjusting pH to isoelectric points.

In order to purify enzymes, impurities of low molecular weight are removed by dialysis and membrane techniques such as ultra filtration. And further, enzymes are purified by the application of various types of chromatography.

Enzyme granulation and immobilization techniques have improved enzymes use. Granulated enzymes were devised for the prevention of allergic accidents, which were caused by the scattering of powder enzymes among workers and consumers when powder enzymes were produced and used for detergent in 1960s. The immobilized enzymes were developed when enzymes were expensive, and separation of enzymes from substrates and products was necessary for repeated uses. Immobilized enzymes or enzyme-containing cells were mainly applied for the production of useful materials, such as amino acids and nucleotides.

Almost all of these enzymes and related materials are available in Japan.

This report outlines producer strains, culture conditions for production, enzymatic reaction formulas, uses, and so on, of enzymes, which are sold on the market or are used in practical production, were described.

Environmentally friendly biotechnology and enzyme technology are expected to play a significant role in the security and preservation of life and health, resources and energy, and the environment-all topics of global concern today. To fulfill these expectations, discovery and development of novel enzymes will be essential. Further co-operation with universities and companies would bring fruitful and useful results.

■ Profile

中森 茂 Nakamori Shigeru

(独)国立科学博物館産業技術史資料情報センター主任調査員

昭和15年(1940)9月生

昭和38年(1963)3月 京都大学農学部

農芸化学科卒業

同年 4月 味の素株式会社入社

昭和50年 1月 農学博士(京都大学)

昭和63年7月 (財)バイオインダストリー協会出向

～平成2年6月

平成5年(1993)3月 味の素株式会社退社

同年 4月 福井県立大学

生物資源学部教授

平成18(2006)年4月 同学 名誉教授

■ Contents

1. はじめに	141
2. 酵素について—酵素の機能と特性—	142
3. 酵素の産業利用の歴史	144
4. 日本の酵素産業の歴史とその特徴	146
5. 酵素市場	148
6. 酵素の生産に関する要素技術の進歩 / 生産菌株の育種、大量培養、酵素の単離精製、製造装置とプロセス管理	149
7. 酵素の利用に関する要素技術 / 酵素の固定化技術、酵素の顆粒化技術	153
8. 酵素の生産と利用 (各論)	155
9. 酵素の生産と利用技術の系統化図	180
10. 今後の酵素技術の課題と展開	182
11. 謝辞	183

1 | はじめに

酵素 (Enzyme) は動植物から微生物まで、あらゆる生物がもっている生体触媒で、その主成分はタンパク質である。生物の生命活動は生体内の化学反応によって営まれている。これらの化学反応を円滑かつ正確に進行させる触媒がすなわち酵素であり、常温、中性 pH、常圧の穏やかな条件下で進行するところに大きな特徴がある酵素の働きで生命活動は維持されている。

人間は古くから、このような酵素反応を巧みに利用してきた。酵素というものの実体と性質を理解するはるか以前からのことである。それらに利用された酵素は、食品の製造に関与するものが多く、たとえばアルコール発酵や乳酸発酵による清酒、ワインやヨーグルトなどの生産に関与するものは微生物に由来し、またチーズの生産に使用された酵素は若い羊や牛などの動物の腸に由来するものである。

日本は温暖で湿潤な東アジアのモンスーン地帯に位置する。そこでは米や大豆が栽培され、カビがよく生育し、これらの材料から清酒、味噌、醤油などの醸造製品が作られ、微生物を取り扱う醸造技術が発達した。そのような土壌の上に、近代の欧米で生まれた微生物学と生化学や分子生物学関連の育種や培養法、特に抗生物質の生産に関する科学と技術が導入され、これをベースにして第2次大戦後のわが国ではアミノ酸や核酸発酵のような独創的な科学と技術が生まれ、また独自の技術による抗生物質や酵素の生産技術も開発された。これらの技術の多くは微生物に由来する酵素を取り扱うものであって、この酵素をより積極的、かつ多角的に活用する技術が並行して進められ、日本はこの分野では先進国の一つになった。微生物は、酵素の詰まっている“Enzyme bag”であり、微生物の活用はすなわち、酵素の活用と考えられる所以である。

人間の生活に必要な物質を獲得するために数多くの工場では化学反応が行われている。これらの反応は通常、高温、高圧条件が必要なエネルギー多消費型で、また酸、アルカリを多使用するプロセスであって、地球環境への負荷が大きいことが問題点にあげられている。これらの反応に酵素が応用できれば、省エネルギー型で環境負荷の少ないプロセスを作ることができる。この分野で日本はすでに多くの実績を出して来たが、世界的なスケールで省資源とエネルギー、環境保全が注目される中、技術をさらに進め、グローバルに真価を発揮することが期待されている。

新しい酵素の利用のためには、対応する新しい酵素の生産と、酵素の性質の解明が伴っていなければならないことは言うまでもない。したがって、これらのプロセスの開発のためには、酵素の生産と利用技術が車の両輪として重要である。一方、新しい酵素技術の可能性については一言では言い表せないほどの種類と応用の領域の広さがある。

このような酵素技術に対する期待が大きい中で、日本の酵素の生産と利用技術の歴史を振り返り、今後を展望することは意義深いことと考え、産業技術系統化のテーマの一つとして選択した。

本報告はこれまでの酵素技術の大略をまとめたもので、11章から構成されている。1章の「はじめに」に続く2章では一般的な酵素の特性と機能、および命名法などについて解説した。3章では世界における酵素の産業利用の歴史を簡単に振り返り、4章では日本の酵素産業の歴史の大略と産業の特質を記し、5章では酵素市場の概略を記した。6章では酵素の生産に関する要素技術について記した。有用酵素の大部分が微生物に由来していることから、生産微生物菌株のスクリーニングから菌株の改良と大量培養を経て、酵素の単離精製、さらに工業生産に至る技術の進歩、としてまとめた。7章では酵素利用に関する要素技術として酵素の固定化および顆粒化技術を取り上げ、これらの進歩を記した。8章では市販されている、あるいは産業として活用されている酵素が、どのような反応を触媒し、またそれらの酵素がどのような微生物によってどのようにして生産され、活用されているかを解説した。9章では酵素生産と利用技術の系統化をまとめて図化した。10章では酵素の生産と利用についての今後の課題と展開を考察した。

子が付加して起こる分解反応を触媒する酵素である。たとえば、グルコアミラーゼはアミロース（デキストリン）に水分子を与えてグルコースを生成する反応を触媒する。

4) 脱離・付加酵素 (lyase)

加水分解を経ずに基質分子の C-O, C-N, C-C などの結合を開裂して、さまざまな官能基を脱離させて二重結合や環状化合物を生成する反応を触媒する。またこの逆に C=C, C=O, C=N などの結合に官能基を付加する反応を触媒する。

たとえば、アスパラギン酸デカルボキシラーゼは図 2.3 に示すように、アスパラギン酸のβ位のカルボキシル基 (-COOH) を脱離してアラニンと CO₂ に変換する反応を触媒する酵素である。

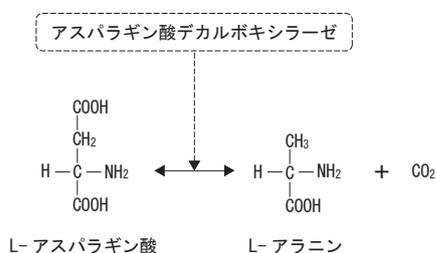


図 2.3 アスパラギン酸デカルボキシラーゼによる L-アスパラギン酸の分解反応

5) 異性化酵素 (isomerase)

基質分子にある官能基を分子内で転移して異性体を生成する反応を触媒する。基質の分子組成は変わらず、分子構造が変わる反応である。たとえば、グルコースイソメラーゼは図 2.4 に示すように、グルコース⇔フラクトースに変換する反応や、D-体のアミノ酸を L-、あるいは L-体のアミノ酸を D-体に変換する反応を触媒する酵素である。

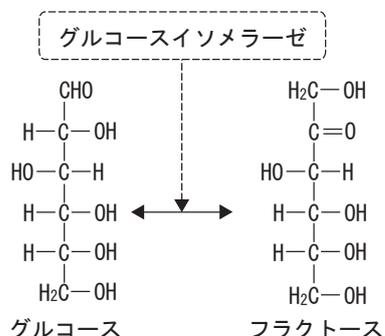


図 2.4 グルコースイソメラーゼによるグルコースの異性化反応式

6) 合成酵素 (ligase)

ATP などがもつピロリン酸基の高エネルギー結合を

分解するときが発生するエネルギーによって基質分子を結合させる反応を触媒する。

2.2.2 酵素の命名法

酵素の名前は基質、あるいは触媒する反応、あるいは両者の末尾に「アーゼ」をつけて行う。たとえば、アミロースを分解する酵素は「アミラーゼ」、さらにグルコースを生成するものは「グルコアミラーゼ」である。尿素（ウレア）に働く酵素はウレアーゼ、アスパラギン酸のアミノ基を転移する酵素は、アスパラギン酸トランスフェラーゼ、あるいはアスパラギン酸トランスアミナーゼである。このような命名法は国際生化学分子生物学連合の酵素命名委員会が、上のような6つの機能分類を行い、さらに反応の種類、基質によって細分化して番号を付与して決められたもので、たとえばアルコール脱水素酵素には EC1. 1. 1. 1 の番号が与えられている。歴史的に慣用的に使用されたものについては常用名も使われている。

3 | 酵素の産業利用の歴史

酵素を実用的に利用したと思われる歴史的な事象は、たとえば、BC2, 300年頃のエジプトの壁画に見られるという、麦芽パンを用いてアルコール発酵をさせたビールの醸造や、BC800年頃のホーマーの「イリアス」の中で、チーズ作りに子山羊の胃袋が使われた記録などがあるが、これらは酵素と言うものを認識して利活用したものではない。

酵素の実体が明らかにされたのは19世紀に入ってからのもので、その頃の酵素の単離や精製、結晶化についての科学や技術の実績には次のようなものがある。

1833年にペイエン (A. Payen) とペルソス (J. Persoz) は麦芽からジアスターゼを単離した。1897年、ビュフナー (E. Buchner) は酵母菌の細胞抽出液 (Cell free extract) をグルコースに作用させるとアルコールが生成することを発見した、つまり、アルコール発酵は多数の酵素の連続反応によって起こり、必ずしも生きて酵母菌が必要ではないということを示した。このことは、生体内の反応を試験管の中で行えることを示し、その後の数多くの生化学の反応の礎を確立したことである。ビュフナーは“生化学の父と”呼ばれている。

キューネ (W. Kühne) は酵素に Enzyme (ギリシャ語で“in yeast”を表す en + zyme) の呼称を提唱した。1926年にはサムナー (J. B. Sumner) はナタマメのウレアーゼを精製して結晶化に成功した。

産業利用を目的とした技術的な業績としては、1874年にハンセン (C. Hansen) はチーズ作りのために、子牛の胃からキモシン (凝乳酵素) を単離し、製剤化したことがあげられる。

さらに、1894年、高峰讓吉が麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のフスマ培養物からジアスターゼを単離し、「タカヂアスターゼ」として商品化したことである。日本人として酵素技術の開発で大きな業績を残した高峰讓吉のことについて少し詳しく記しておく。

高峰は1854 (嘉永7) 年富山県高岡で生まれ、間もなく金沢に移住し、語学や化学を修め、1875 (明治12) 年には工部大学 (後の東大工学部) を卒業後イギリスに留学し帰国後農商務省の役人となった。その後辞職して人造肥料の会社 (日産化学の前身) の設立、有名な麴カビからの「タカヂアスターゼ」の商品化、アドレナリンの商品化、三共の初代社長就任、日米の交流事業への参画、などなど、幅広く大きな事業活動を手がけた科学者であり、また実業家である。特に本報告書に関連する酵素技術の分野では、前記の

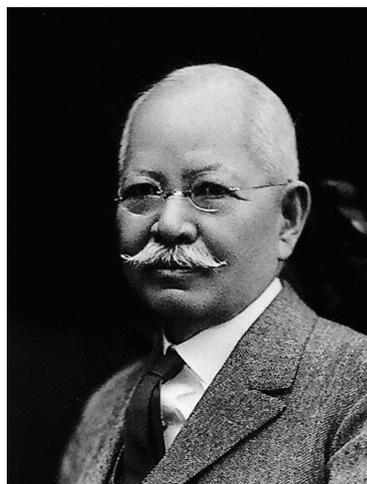


図 3.1 (高峰讓吉 (1854-1922)) (高岡市立博物館提供)

「タカヂアスターゼ」の商品化、あるいは麦芽に代えて麴カビの酵素によるデンプンの糖化技術を確立したことはこの分野の先覚者として特筆される日本人である。その業績は高峰の生誕や成育の地に設立されている高岡市立博物館や金沢市立ふるさと偉人館、あるいは初代の社長を務めた第一三共社の歴史展示室 (高峰讓吉博士記念室) などで顕彰されているし、また多くの人物伝記も出版されている。しかしながら高峰の詳しいことは一般の日本人にあまり知られていないように見える。そのわけは、「タカヂアスターゼ」は日本でも商品化されたが、彼の仕事が主にアメリカを舞台として行われ、日本には情報があまりもたらされなかったし、さらに当時の日本には酵素技術を評価する土壌そのものがなかったためではないかと考えられる。彼がアメリカで設立した Takamine Laboratory は Miles Laboratory として Miles 社に引き継がれ、現在もアメリカでは“バイオインダストリーの父”として敬意を示されていると言われている¹⁾。



図 3.2 「タカヂアスターゼ」 (第一三共株式会社提供)

また高峰の業績を記した出版物も出されている²⁾。高峰がなぜジアスターゼなどの酵素に興味と関心を示したのかは興味深いところであるが、母親の実家が酒造家であったことが理由と言われている。このような先駆的な業績を上げたが、本報告のテーマである技術の系統化の材料となるような技術的な装置や設備などは、上記2つの博物館、あるいは第一三共社にも残されてはいなかった。残されているのは特許の写し、報告書あるいは当時の談話記事の類であった。

5章に記すように、日本の酵素産業が本格的に始まるのは第二次大戦後のことであるが、もし高峰の考え方や技術が、これを継承する日本人の弟子や研究生がいて、日本に移植されていたなら、あるいは日本の酵素技術、あるいは酵素産業が現在とはもっと別の形で発展していた、つまり彼の活躍した1900年ころから、本格的に日本の酵素産業が始まる1935年ころから1950年ころの、およそ40-50年のブランクが埋まった形で展開されていたかも知れない、などと想像するのも一興であろうか。実際に麹菌の酵素を用いて出願された「タカヂアスターゼ」の製法特許の文面などには、現在でも通用するような細かな技術的な記載があり、自ら実験してデータの採取を行い、これらの研究活動の中から酵素の広い応用の可能性を十分感じ取っていたのではないかと推測されるからである。

引用文献

1. 山本 綽 : 高峰讓吉先生に思うこと、醸造協会誌 98、689、2003
2. Miles Inc., TAKAMINE, Documents from the Dawn of Industrial Biotechnology, Elkhart, Indiana, 1988 (非売品)

4 | 日本の酵素産業発展の歴史と特徴

日本の酵素産業には、酵素そのものを製品として扱っている企業と、酵素を手段としてそれぞれの製品の製造やプロセスの改良に生かしている企業がある。

第1章の「はじめに」に記したとおり、酵素技術は応用微生物の技術であり、日本はこれらの技術の先進国である。日本で酵素技術が発達した背景にあるものは、日本の風土と、その風土の中で磨かれた日本人の繊細な感覚に加えて外国の技術を活用する能力である。つまり、東アジアの湿潤なモンスーン地帯の米作地帯にあって、清酒、味噌、醤油などの生産に関わる醸造技術が発達してきた。これらはとりもおさず多くの酵素を生産するカビや酵母菌を中心とする微生物の応用技術である。一方、モンスーン地帯の中でも日本には美しい四季の変化があり、古くから“花鳥風月”という、季節の美しさを感じる感覚が日本人の身についている。この繊細な感覚は、味覚の中でも生きている。つまり、日本の食文化の中心にあった昆布と鰹節のダシの味を感じ取り、その本質がグルタミン酸とイノシン酸であることを明らかにし、さらにこれを商品化しようとさえするという日本人のセンスのことである。実際昆布のうま味成分がグルタミン酸ナトリウムであることを発見した池田菊苗が、この物質を調味料として工業化に成功したことのインパクトは甚だ大きく、その後のグルタミン酸、アスパラギン酸を始めとするアミノ酸、イノシン酸を始めとする核酸類の発酵法や酵素法による製造技術の発展に非常に大きな影響を与えた。さらに、池田菊苗が提唱した「うま味」(Umami)という味の概念は数少ない日本発の国際用語として今日も使用されていることも、その意味を象徴している。このような微生物の能力を活用する歴史的な基本技術の上に、第2次大戦後欧米で進展した微生物学、生化学、分子生物学の知見と技術、特に抗生物質の発酵生産技術はアメリカの直接の技術指導もあって、直ちに日本の技術界に取り入れられ、新たな日本の技術として花開いた。日本のお家芸と言われる、“外国の刺激を受けて日本独自の文化や技術を生み出す能力”がここでも存分に発揮されている。

酵素の実体が明らかにされてからの微生物酵素開発の歴史は、3章で記した高峰讓吉による「タカチアスターゼ」の商品化を嚆矢とするのが一般的な解釈である。しかし上記のとおり、高峰の業績はアメリカで行われたこともあって、これをきっかけにして直ちに日本で本格的に酵素産業が起こったとは言えない。日本

での酵素産業の本格的なスタートは昭和10年(1935年)代のアミラーゼの生産である。つまり、ジアスターゼの業績(1894年)からは約40-50年が経過しているわけである。

アミラーゼの用途は、従来は麦芽由来の酵素処理で行われていた繊維加工の糊抜き工程に、細菌由来のアミラーゼを応用することであった。日本におけるアミラーゼの生産研究は大阪市立大学の福本寿一郎教授らによって始められたが、これらの知見を上田化学社(現株式会社エイチアイビー)や長瀬産業社(現ナガセケムテック)が工業化した。当時の日本では繊維産業が盛況を極めていたので、かなり大きな商品となった。さらに、第2次大戦後にはデンプンの糖化によるグルコースの製造技術が確立されてもてはやされた。福本や辻阪好夫らによる糖化酵素、つまりグルコアミラーゼの製造技術が多くの企業で活用され、林原、天野製薬(現天野エンザイム)、上田化学、阪急共栄物産、新日本化学などの各社がアミラーゼの製造を開始した。背景には戦後の日本には砂糖が不足し、甘藷デンプンが豊富に存在していたので、この処理と砂糖に代わる甘味料の確保のために国としても積極的に取り組まなければならない事情があった。

一方、プロテアーゼを中心とする消化薬の生産も酵素産業のスタートとして大きな役割を果たした。ピオジアスターゼ、パンクレアチンの天野製薬、酸性プロテアーゼのキッコマン、さらに、上田化学、大和化成、名糖産業など各社のアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼなどなどの参入が続いた。

これらの企業はこのような酵素類の着実な需要の増加とともに業績を上げ、新規の酵素の開発とともに、新しい用途と生産技術を取り入れながら今日に至っている。

一方、酵素技術を駆使して、それぞれの業種の製品や製造技術が独自に開発されたものがある。たとえば、核酸系調味料の開発と製造に成功したヤマサ醤油社の核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)、田辺製薬社のアミノ酸を製造するための固定化酵素技術、武田薬品社の医薬(消炎剤)を作るためのプロテアーゼ開発、味の素社の食品加工用のトランスグルタミナーゼの開発などの例である。

表4.1には酵素技術の発展の中で重要と思われる発見や実用化を年表上に示した¹⁾。

表 4.1 酵素技術発展史上に重要な事項¹⁾

年代	海外	日本
1830	ジアスターゼ抽出(1833, A. Payan ら) ペプシン発見(1836, T. Schwan)	
	酵素 enzyme と命名(1878, W. Kühne)	
1900	酵素による発酵現象(1897, E. Buchner)	「タカヂアスターゼ」(1894, 高峰譲吉)
	ミカエリス定数(1913, L. Michaelis ら)	グルタミン酸ナトリウム(1904, 池田菊苗)
1920	ウレアーゼ結晶化(1926, J.B.Sumner)	イノシン酸(1913, 小玉新太郎)
	ペニシリン発見(1929, A. Fleming)	「タカヂアスターゼ」国産化(1914, 第一三共)
1940	ペニシリン発酵、大量培養技術(1943)	α -アミラーゼ(1939, HBI など)
	DNA モデル(1953, J. Watson, F. Crick)	α -アミラーゼ/タンク培養(1950, ナガセ、大和)
1960	オペロン説(1961, F. Jacob, J. Monod)	グルタミン酸発酵(1957, 協和発酵)
	制限酵素(1970, H. O. Smith ら)	グルコアミラーゼ(1959, 福本寿一郎)
	組換え DNA 実験(1972, P. Berg)	グルコアミラーゼ(ナガセ、新日本化、天野エンザイム等)
1980		ヌクレアーゼ P1、イノシン酸(1961, ヤマサ醤油)
		固定化酵素/アミノ酸(1967, 田辺製薬)
		ムコールネット(1967, 有馬啓ら)
		セラチオヘプチダーゼ(1970, 武田薬品)
		酵素法によるアクリルアミド(1980, 山田秀明)
	PCR(1985, K.B. Mullis)	トランスグルタミナーゼ(1995, 味の素、天野エンザイム)
		酵素法トレハロース(1998, 林原)
2000		
		ペプチド合成酵素(2005, 味の素、協和発酵)

引用文献

1. 日本酵素協会編：日本酵素産業小史、p. 122、2009. 4.

5 | 酵素市場

酵素の市場を正確に把握することはかなり難しいとされている。酵素の触媒能力を表す活性表示が統一されていないことや、用途によっても活性表示が異なること、最終製品の中の酵素の割合が正確に表示されないこと、自社開発の酵素技術によって製品を製造するような場合、酵素のコストが不明で数字として表れない、などの理由による。それでも輸出入統計や様々なデータを参考にして数値が推定されている¹⁾。

1970年以降、世界の酵素生産と利用は大きく進展し、市場も急拡大し、1997年1,500億、2004年4,200億円に増加した。そのうち工業用が2,650、医薬・診断約・研究用が1,550億円と推定されている。このうち日本の占める割合は約10%の420億円である。さらに、2009年にはマーケットは5,600億円になると見込まれている。

また、1970年ころから2004年までのわが国の酵素の輸出入は、1980年までは輸入超過であったが、それ以降は輸出が上回るようになった。このことは酵素の国産化が進むとともに、新規酵素をはじめとするわが国の技術開発が他国より進んでいることを示していると読むこともできる。

酵素が“触媒”という性質のものであって、意外に市場は小さいが、仮に酵素で製造される末端製品の価格の1～2%を酵素が占めると仮定すれば、実質的には数兆円の市場の形成に貢献している²⁾、とも考えることができる。

表 5.1 酵素の推定市場¹⁾

用途別項目	市 場 (億円)	
	世界	日本
食品用酵素	1,000	180
飼料用 ”	300	-
燃料用 ”	250	-
繊維用 ”	200	10
洗剤用 ”	700	60
医薬(バルク)用 ”	600	65
研究用 ”	500	55
診断用 ”	350	40
精密化学用 ”	100	
その他	200	20
合計	4,200	430

引用文献

1. 日本酵素協会編：日本酵素産業小史、p. 97、2009. 4.
2. 紀藤邦康：世界の酵素市場、第7回酵素応用シンポジウム講演要旨、p. 14-15、2007. 7.

6 | 酵素の生産に関する要素技術の進歩

酵素生産に関する要素技術は以下の5項目に分けることができる。

- 1) 生産菌株のスクリーニング
- 2) 生産菌株の育種改良
- 3) 生産菌株の大量培養
- 4) 培養液からの酵素の単離・精製
- 5) 製造装置とエンジニアリング

6.1 生産菌株のスクリーニング

工業的に利用される酵素の大部分は微生物に由来する。数多い微生物の中から有力な生産株をスクリーニングすることが酵素生産のスタートになる。酵素の生産に限らないが、微生物のスクリーニングとは、理論では予測することは難しく、いわゆる「運・鈍・根」の勘の勝負と言われる地道な作業であるが、“たゆまざる工夫と必ず成功するという信念とに裏打ちされた独特のスクリーニング法の確立”をもって臨んだ人々が共通して成功を収めている。

動物起原の酵素は動物体や培養細胞から抽出されていたが、得られる量が少ないため実用化が困難であった。遺伝子工学技術の進歩によって、動物起原の酵素を微生物で生産することが可能になって来ている。

6.1.1 スクリーニングの手法

多くのサンプルの中から効率的に生産菌を選択するためプレート上での操作が行われた。一般的には、微生物の生育に必要な基本的な成分と、酵素の基質となる物質を含むプレート上にテストする微生物を接種して培養し、基質がどのように変化するかを調べる工夫がとり入れられる。たとえば、デンプンを分解するアミラーゼ生産株、タンパク質を分解するプロテアーゼ生産株、セルロースを分解するセルラーゼ生産株は、基質の炭素源として、それぞれ、デンプン、カゼイン、濾紙を含む培地を使用し、その上に自然界から採取した微生物を培養し、これらの基質を溶解してできる班（ハロー）の大きさによって判別された。班ばかりでなく、色の変化であったり、さまざまな工夫が取り入れられた。最近ではロボットの操作によって、培養からデータの解析まで、より大量のサンプルを自動的に処理するハイスループット操作が行われている。

6.1.2. 基本培地と培養条件の設定

スクリーニングで得られた候補株を用いて生産用の培地が設定される。炭素源、窒素源、ミネラル、ビタミンなどの生育因子を含む基本培地を設定し、目的の酵素の生産量を指標に、これら各成分の最適濃度が決められる。さらに有効な添加物を選んでこれに加えられることもある。培地成分がそろったところで培養温度、pH、通気などの培養条件が決められ、この条件下で生産株の力価が決められる。以上は試験管あるいはフラスコスケールの実験である。培養条件が揃ったところで再度スクリーニングが行われ、より優秀な菌株が採取されることもまれではない。

6.2 生産株の育種改良

6.2.1. 突然変異による改良

生産株の育種改良の操作や変異株の選択については一般的な方法を記す。1次スクリーニングで選抜された菌株の改良が行われる。細菌では菌体そのもの、カビや放線菌では孢子に変異処理を施す。具体的には菌体や孢子の懸濁液に紫外線を照射したり、ニトロソグアニジンやエチルメタンサルフォン酸などの化学薬剤に曝すことによって行う。この処理によって大部分の生菌は死滅するが、生き残ったものの中には高頻度で突然変異が起こっているため、これらの中から親株より力価の向上したものを選択する。この操作を繰り返すことによってさらに力価を上げる。突然変異の技術が始められた当初は、ランダムに変異株を採取して手当たり次第に調べてゆく方法が取られていたが、タンパク質合成調節のメカニズムが明らかになるにつれて、酵素生産の抑制を除くために、対応する工夫を加えた選択法が工夫されている。たとえば、栄養要求性変異株、糖やアミノ酸などのアナログ、タンパク質合成阻害剤耐性株などの誘導によってしばしば好結果が得られている。

6.2.2. 遺伝子工学技術による改良

6.2.1に記した突然変異がランダムな選択で効率が良くないのに対して、遺伝子工学技術は特定の遺伝子を単離し、これを増幅することを可能にした。遺伝情報の発現の流れの中では、DNA上の変化はタンパク質の変化として発現されるので、このことは、取りも直さず特定のタンパク質（＝酵素）を改変したり増幅したりすることが可能になったことを意味している。し

たがって、酵素の生産向上という目的のためには、この技術はきわめて確率の高い、有効な、応用範囲の広い技術である。

酵素の生成や活性の調節メカニズムが分子のレベルで明らかにされてきた。ジャコブ (F. Jacob) とモノー (J. Monod) によるオペロン説によれば、酵素タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子は、酵素の本体である構造遺伝子と、その発現を調節する制御遺伝子 (プロモーターやオペレーター) から構成されており (図 6.1)、インデューサー (誘導物質) がいない時にはリプレッサーがオペレーターに結合して RNA ポリメラーゼの働きを停止させるため、酵素タンパク質の合成は起こらないが、インデューサーを加えるとリプレッサーに結合してリプレッサーがオペレーターに結合しなくなるので酵素が活発に合成される。このことから、制御遺伝子を改変することによって酵素合成を大幅に向上させることが可能になった。また、遺伝子のコピー数を増幅すれば酵素タンパク質を増加させることも明らかである。こうして遺伝子を改変することによって酵素の生産が向上することが実証されているが、実用化についてはすべてが順調に達成されているわけではない。現時点では南北アメリカでかなり積極的に展開されているのに対して、日本やヨーロッパの諸国では、遺伝子工学技術が必ずしも社会的に受容されていない状況にあり、技術的な価値は出ているにも拘わらず、分野によっては、特に食品関連の酵素では実用化が進んでいない現状にある。この状況は遺伝子組換え大豆やトウモロコシの生産の場合と似ており、南北アメリカでは拡大しているが、日本とヨーロッパでは現在も進んでいない状態にある。

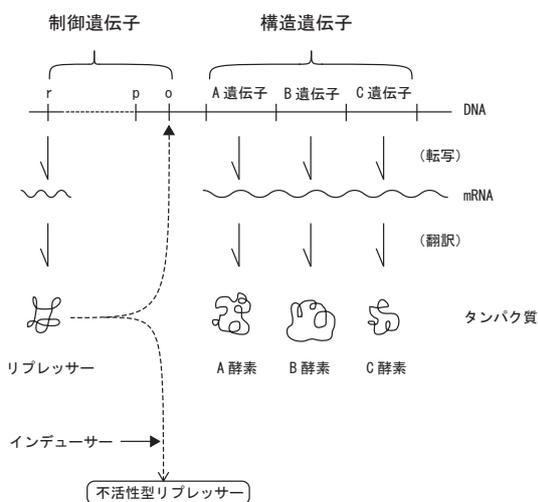


図 6.1 タンパク質合成の調節を示すオペロン説の概略

r: リプレッサー、P: プロモーター、O: オペレーターを担う遺伝子を示す。プロモーターには RNA ポリメラーゼが結合し、mRNA が合成されタンパク質 が合成される。オペレーターにはリプレッサーが結合することによって mRNA の合成が停止する。インデューサーを加えるとリプレッサーに結合することによってオペレーターに結合できなくなり、mRNA が合成され、タンパク質の合成が誘導される。

6.2.3 タンパク質工学技術による改良

タンパク質工学技術は元来の遺伝子 DNA の配列を改変して使用目的に合った機能や性質をもつ人工酵素を創る技術である。次のような操作によって行われる。特定の遺伝子を単離 (クローニング) し、その塩基配列に基づいてアミノ酸配列を決定し、さらに必要に応じて、X線解析による 3 次構造の決定、コンピュータグラフィクスによる高次構造のモデル化、酵素の構造と反応のメカニズムの相関性などの解析を行う。しかる後、酵素遺伝子の塩基配列を変えることによって酵素タンパク質のアミノ酸残基を改変して、酵素の活性、安定性、耐熱性などの向上や基質特異性の変化を図るのがタンパク質工学技術による改良の例である。たとえば、洗剤用に使われる *Bacillus clausii* 由来のアルカリプロテアーゼの 222 番にはメチオニン残基が存在するが、この残基は漂白剤によって酸化を受け、酵素が失活することを意味する。そこでメチオニン残基を酸化を受けないアラニンやセリン残基に置換することによって漂白剤に耐性の洗剤用プロテアーゼがノボノルディスク社で開発されている。このような技術によってほかにも、カビの凝乳酵素、リパーゼなど多くの改良が行われている。

6.3 大量培養

生産株が改良され、試験管やフラスコレベルのテストで生産が確認されると、これを実用生産のレベルにスケールアップされる。微生物の種類と特性に応じて、大量培養には固体培養と液体培養が行われる。

6.3.1 固体培養

平板な容器にフスマや米などをベースにした固体培地を投入し、ここに主にカビの胞子を接種し、30 ~ 40°C で数日間培養した後菌体を集めて、生成した酵素を抽出する。この操作や装置は清酒醸造で用いられる麴蓋 (こうじぶた) で麴を作る操作に相当するものである。1960 年には天野式強制通気製麴装置や、これを改良した円盤型製麴装置が製作され、カビを用いる酵素の製造や醸造用麴の製造に活用されている。

6.3.2 液体培養

液体培地を用いる通気攪拌培養装置である。主として抗生物質の発酵生産のために開発され、これをベースにアミノ酸や核酸発酵など、一般的に使用されるジャーファーマンタ、あるいは発酵タンクである。図 6.2 にその概略を示した。システムの構成は、微生物

を培養する発酵タンクを中心に培養に必要な①空気殺菌、②培地殺菌、③温度制御、④pH制御、⑤全体系の殺菌システムがあり、これらの管理はコンピュータ制御で行われている。ここでは試験管やフラスコレベルの実験で得られた結果を再現あるいは向上させるとともに、フラスコレベルの実験ではやりにくい通気、温度、pH、基質のフィード法、浸透圧の調節、発泡の制御などの条件がテストされる。スケールは数リットルのジャーファーメンタから数百トンの大型タンクまでさまざまであるが、システム自体は基本的に同じである。

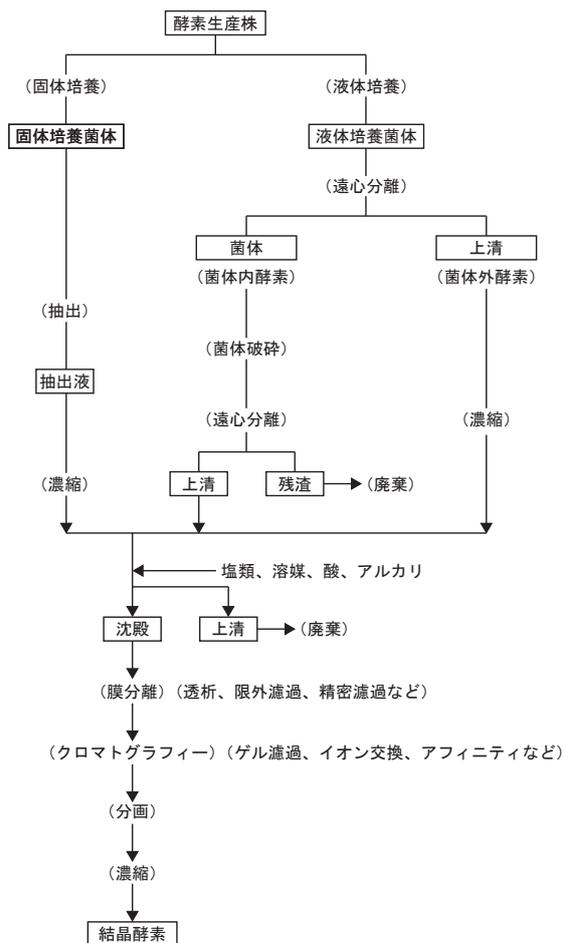


図 6.3 一般的な酵素の単離精製フローチャート

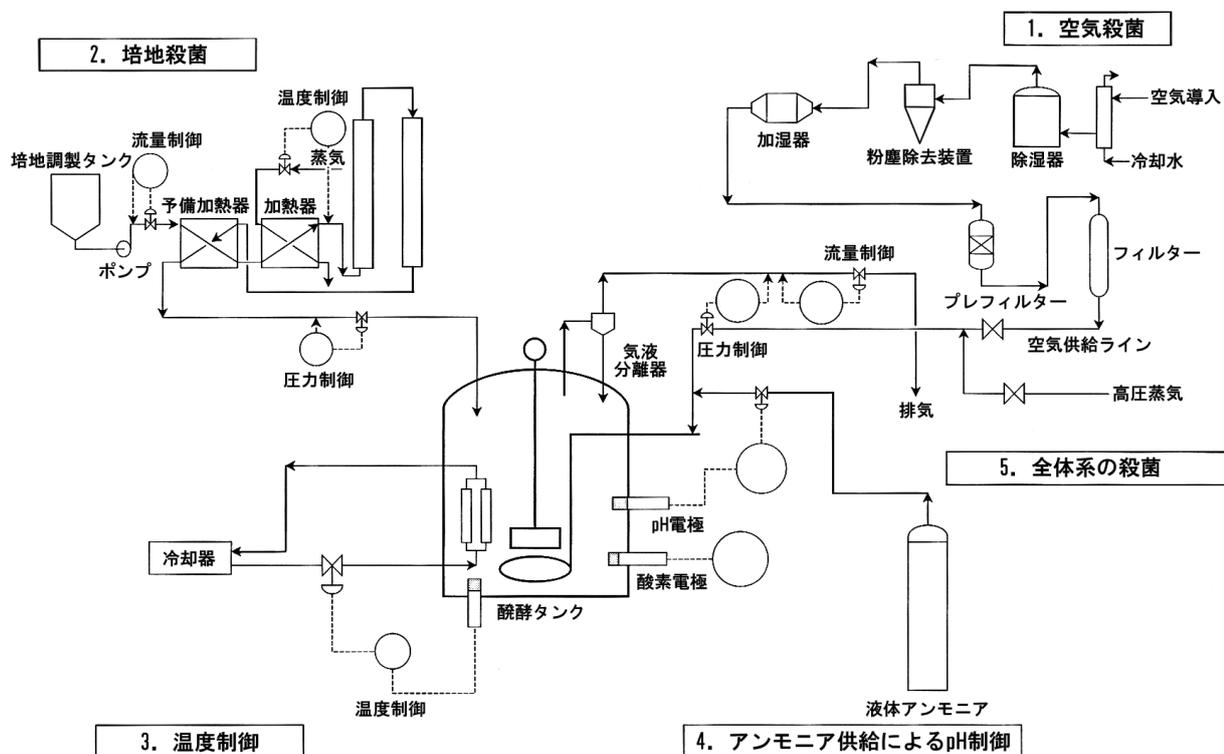


図 6.2 大量培養装置の略図¹⁾

6.4 酵素の単離・精製

酵素生産のダウンストリーム（下流）技術が培養液または培養菌体からの酵素の単離・精製工程である。精製の程度は酵素の使用目的によって大きく異なり、夾雑物が問題にならないような場合には培養物や細胞抽出液がそのまま酵素源として使用される。また、食品用途に使用される酵素については安全性が特に重要視されるので、歴史的に安全に使用されてきた微生物や安全性についてのデータが集積されている微生物が用いられる。一方、医薬品のような不純物の混入が問題になるようなケースでは、酵素は結晶化するくらいまで単一成分として精製しなければならないこともある。いずれにしても大事なことは、酵素の失活を最少に抑えて単離することである。

一般的な単離・精製のフロチャートを図 6.3 に示した。微生物によって生産される酵素が菌体内酵素の場合には、菌体を破碎して取り出す必要がある。菌体破碎の方法は、ブレンダーやダイノミルで物理的に破碎する方法、凍結融解、自己消化、細胞壁溶解酵素を使用する方法などがある。菌体破碎液は遠心分離、または濾過して、上清または濾液をとる。菌体外酵素の場合には酵素は培養液の中にあるので遠心分離で菌体を除いた上清が使用される。この段階では菌体破碎液や培養液中の酵素濃度は低いいため、それぞれの液を低温で濃縮し、さらに酵素タンパク質を沈殿させる操作が行われる。この操作にはアルコールやアセトンによる溶媒沈殿、高い濃度の硫酸などを加えてタンパク質を沈殿させる塩析、さらに等電点沈殿がある。等電点はタンパク質が酸性残基（ $-COO^-$ ）と塩基性残基（ $-NH_3^+$ ）を同時にもつ両性電解質であるが、溶液の pH が変わり両者が互いに打ち消しあって荷電がゼロになる時点の pH のことである。このときのタンパク質の溶解度は最低となるので、この pH に合わせて沈殿させる方法が等電点沈殿である。

次のステップとして、塩類などの低分子物質を除く必要がある場合には、透析や、分子量の違いを利用して篩分けをする限外濾過、ミクロ濾過など、膜による分離工程が入る。

さらに次のステップではゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどで分画して、最終的に酵素を含むフラクション（画分）を集めて濃縮する。かなりノウハウ的な技術が要求されるが、この濃縮液から酵素が結晶化できたら、最高度の精製ができたことになる。上に記したとおり、

この段階まで精製を行うのは実験室段階のことで、実用的にはこのレベルまでの精製度が要求されるケースは少ないようである。

6.5 酵素の製造装置とプロセス管理

酵素の製造装置は菌株の大量培養装置と単離・精製装置である。6.3 および 6.4 に記載のとおり、試験管あるいはフラスコスケールでの実験結果を再現し、これらをスケールアップしたものである。培養においては、培地の調製、殺菌、温度、pH、通気量のコントロールなど、すべてコンピュータで制御されている。同様に単離・精製の工程においては、それぞれの工程の操作は多様に見えるが、6.4 にあげた操作が全て必要であるわけではなく比較的シンプルなものであるが、培養の場合と同様にコンピュータ制御の製造管理が行われている。

引用文献

1. Nakamori, S. and Shibai, H.: R&D Trend Analysis. "Biotechnology in Japan", p. 84, KRI, Jan. 2001.

7 | 酵素の利用に関する要素技術

酵素の製品の形態は溶液、粉末、あるいは生産株そのものであるが、使用目的に応じて加工される。それらの要素技術として酵素の固定化、酵素の顆粒化、と酵素の溶液化を取り上げる。

7.1 酵素の固定化技術

酵素の使用法については過去には7.2に記載する粉末酵素の使用によるアレルギー反応などの問題があったが、これも現在では解決され、特に注意しなければならないと言うことは少ない。これは酵素が一般的に安全性の証明された菌株を使用して作られ、水溶液の中で反応を行い、反応終了後も除去する必要もないからである。ただ、酵素が高価であったり、酵素と生成物を厳密に分離しなければならないような場合には、酵素が固体の化学触媒のように反応液から分離することが可能で、しかも安定に繰り返し使用できることが望ましいことである。このような視点から開発された技術が酵素の固定化（immobilization）である。これによって酵素の利用が大きく拡大された重要な技術となった。酵素の固定化法には担体結合法、架橋法、包括法の3つの方法がある。

7.1.1 担体結合法

この方法は水に不溶性の担体に酵素を1) 物理的吸着法、2) イオン結合、3) 共有結合、のいずれかの方法で、それぞれ結合させるものである。物理的吸着法に使用される担体は、多孔質のガラス、酸性白土、カオリナイト、ベントナイトなどの粘土類、セラミックスやヒドロキシアパタイトなどの陶磁性の物質で、これらの材料に酵素を物理的に吸着させたものが物理的吸着法である。このように操作自体は簡単なものであるが、欠点は酵素が担体から離れやすいことである。イオン結合法は水に不溶性の担体のイオン交換基と酵素を結合させるもので、担体としてイオン交換樹脂が用いられる。共有結合法は酵素がもっているアミノ基、カルボニル基、スルフヒドリル基などを、担体を持つジアゾニウム基、ハロゲン化アルキルなどと反応させて結合させる方法である。いずれの場合も酵素の活性部位以外の箇所でも担体と結合させる必要がある。（図7.1）。

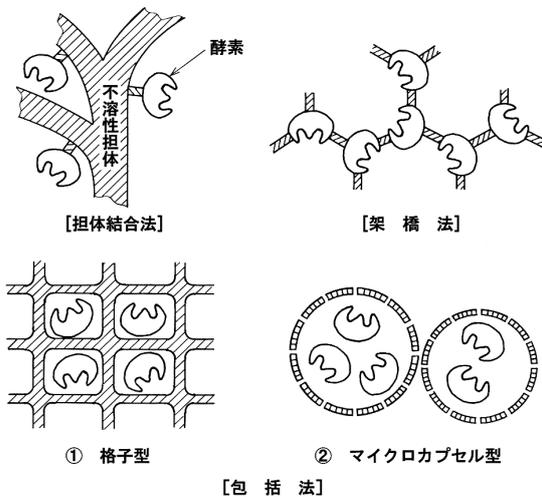


図7.1 酵素の固定化の模式図

7.1.2 架橋法

2個またはそれ以上の官能基を持つ化合物、つまり架橋剤、を介して、酵素分子同士を結合する方法である。架橋剤としてグルタルアルデヒド（ $\text{CHO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}$ ）が良く使用される（図7.1）。

7.1.3 包括法

文字通り、酵素または酵素を含む菌体を包む方法である。その方法によって1) 格子型、2) マイクロカプセル型に分けられる。先に記した担体結合や架橋法では酵素に結合反応を加えたのに対して、この包括法では、酵素はそのまま（native）、手を加えない形で使えるので、取扱いは容易であり、包括の際の酵素の失活にだけ注意を払えばよく、多くの酵素に適用されている。

格子型包括法では高分子のゲルの格子の中に酵素を取り込む。高分子物質にはポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ウレタンポリマー、などの合成化合物、ゼラチン、アルギン酸、カラギーナンなどの天然高分子化合物がある。

マイクロカプセル型の包括法はナイロン、エチルセルロース、ポリスチレンなどの水に不溶性の半透膜の高分子化合物で酵素を包む。反応に関与する基質や反応生成物がこれらの包括剤を透過する必要があるため、高分子化合物が基質や反応生成物である場合には一般的には包括法は適用できない。

固定化酵素の工業化については田辺製薬（現田辺三菱製薬）社から先駆的な多くの実績が報告された¹⁾。また同社で開発された固定化酵素の調製に用いられた

“固定化酵素切断機”はこの技術分野で重要なものと考え、産業技術史資料調査票にリストアップした。

7.2 酵素の顆粒化技術

酵素が利用されるとき一般的な形態は粉末である。しかしこの粉末の形態では取扱いが容易でない上に、1960年代から始まったプロテアーゼを洗剤用酵素として利用した時に、酵素粉末の飛散によって工場の作業員や消費者に呼吸器疾患やアレルギー障害が報告された。このため、酵素の開発も中断されたといわれている。この問題点をクリアしたのが酵素の顆粒化技術である。顆粒化技術は次のような進歩を遂げている²⁾。

1) プリル顆粒

酵素の原末と無機塩類を主成分とする基材、非イオン性界面活性剤、およびワックスを混ぜて噴霧し、これを急速に冷却して球状の小滴としたもの、これはプリル(小さな)顆粒と呼ばれている。プリル顆粒の問題点は、酵素が顆粒表面に出たり、また顆粒の物理的な強度が弱いため、酵素の粉末が飛散する可能性がなお高いことであった。

2) マルメ顆粒

酵素を顆粒の内部に封じ込め、しかも顆粒の強度を高める方法として、酵素の原末、基材と水からなる混合物をマルメライザー(丸める)と呼ばれる円筒状の容器の中で球状の顆粒として水分を蒸発させた後ワックスでコーティングするもので、酵素の飛散がさらに完璧に防止された。1979年に酵素入り洗剤が売り出されたときの製品はこの方式で製造された。

3) T顆粒

顆粒の物理的強度をさらに高めたのがT(tough)顆粒と呼ばれているものである。顆粒の核の中にセルロース繊維を入れ、基材には無機塩、カオリンなどが、またコーティング材はポリエチレングリコール、色の調整には酸化チタンが使われている。低温での溶解性と酵素の保存安定性をさらに高めたTK顆粒も開発されている。

4) CT顆粒

消化を促進するために動物用飼料に α -アミラーゼやセルラーゼが添加される。飼料材料は滅菌とデンプンの糊化のために短時間ではあるが高温に曝されるので、この処理に耐えて安定性を示すと同時に、動物の消化器の中で溶解しやすいことが望ましい。このために融点の高い、消化性の良い油脂でコーティングして(coating & tough)作られる顆粒である。

5) BG顆粒

製パン用および食品加工にも各種の酵素が使用される。酵素の粒子を基材とともに凝集させたものがBG(granule for baking)と呼ばれている。

6) MG顆粒

食塩やデンプン粒などの基材の周りに酵素を噴霧して顆粒としたもの。物理的な強度が高められた。

7.3 酵素の溶液化技術

酵素を液状にして使いやすさと飛散を抑えた技術である。酵素を安定に、しかも安全に溶かすことがポイントで、たとえばプロピレングリコールなどが溶媒として使用される。

引用文献

1. 千畑一郎編:「固定化酵素」、講談社、p. 9、1975.
2. 坂口博脩、T. T. Hansen:産業用酵素の顆粒化製剤、粉体と工業、36、(10) 1-8、2004

8 | 酵素の生産と利用 (各論)

8.1 デンプン分解酵素

わが国の酵素の技術が最も早く応用されたもののひとつがデンプン関連の酵素である。先述の高峰譲吉によって作られ、消化剤に使用された「タカジスターゼ」もデンプン分解酵素が中心的な働きをしている

8.1.1 デンプン分解酵素の分解様式

デンプンの構造は図 8.1、8-2 に示すように、グルコースが α -1,4 結合でつながったアミロースのように、所々で α -1,6 結合によってつながったアミロペクチンの木の枝のような構造から出来上がっている。

このデンプンを加水分解する酵素は分解の様式の違いから 4 種類見出された、つまり α -、 β -、グルコ (γ -) アミラーゼ、およびプルラーゼである。図 8.1 にはそれぞれの酵素の作用点を示している。

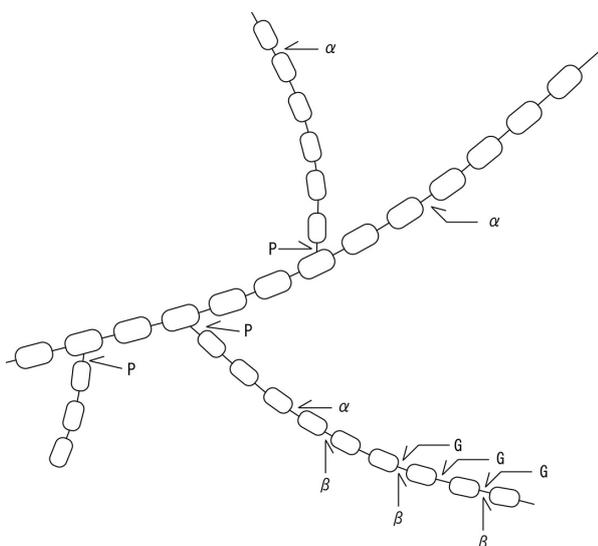


図 8.1 デンプンの構造とデンプン分解酵素の切断箇所

—○—: グルコース \swarrow : 切断箇所 α : α -アミラーゼ β : β -アミラーゼ G: グルコアミラーゼ P: プルラーゼ

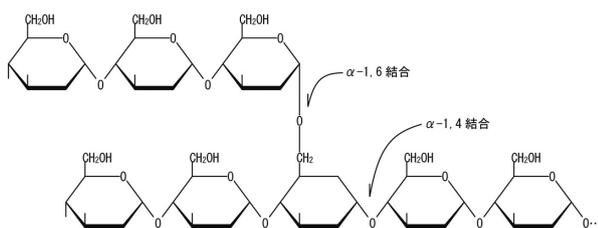


図 8.2 アミロペクチンの構造と α -1,4、 α -1,6 結合

α -アミラーゼは別名液化アミラーゼとも呼ばれ、

図 8.1 に示されるように、アミロースを任意の箇所まで分解し、比較的低分子のアミロースを生成する。この反応によって水に不溶性のデンプンが可溶性になるので液化アミラーゼの名前の由来がある。 β -アミラーゼはアミロースの任意の箇所まで分解し、グルコース 2 分子毎、つまりマルトースを生成する酵素である。グルコアミラーゼはアミロースの非還元末端からグルコースを生成するもので、プルラーゼはアミロペクチンの α -1,6 結合に作用してアミロースを生成する酵素である。表 8.1 にはこれらデンプン分解酵素の反応様式、生成物、用途および生産菌株をまとめて示した。 α -アミラーゼは繊維を加工するときに使われる糊抜き、消化剤、あるいはデンプンからマルトースやグルコースを製造する前段の反応に使用される。現在 (平成 20 年) 特に注目されているトウモロコシからのバイオエタノールの製造にはグルコアミラーゼとともに重要な役割を演じる酵素である。

表 8.1 デンプン分解酵素の種類、分解様式、生成物、用途および生産菌株

酵素の種類	分解様式 (図 8.1 参照)	生成物	用途	生産菌株
α -アミラーゼ	$\alpha \rightarrow$	アミロース	糊抜き、消化剤、 グルコース、マルトースの製造 サイクロキストリンの製造	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> など
β -アミラーゼ	$\beta \rightarrow$	マルトース	水飴、マルトースの製造	麦芽、 <i>B. polymixa</i>
グルコアミラーゼ	G \rightarrow	グルコース	グルコースの製造 (α -アミラーゼとともに)	<i>Rhizopus delemere</i> <i>Aspergillus niger</i>
プルラーゼ	P \rightarrow	アミロース	マルトースの製造 (β -アミラーゼとともに)	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.

8.1.2 α -アミラーゼ

この酵素の生産菌株は、いわゆる枯草菌系統の、*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* などである。わが国におけるこの酵素の生産は 1914 年に *B. subtilis* をふすま麴式の固体培地を用いて静置培養して得た酵素を繊維工業の糊抜に應用したことに始まる。第 2 次大戦後は、現在も行われている通気攪拌培養法が行われている。この培養の基本的な培地には、炭素源としてコーンスターチ、窒素源としてコーンステイプリカー (デンプンを抽出した残液)、脱脂大豆粉、酵母エキス、など、ほかにリン酸ナトリウムなどのミネラル成分が補給される。温度 37°C、pH 中性付近、4-5 日間の培養が行われる。菌体を除いた培養液からの酵素の分離はデンプンに吸

着させる方法が行われている。現在の α -アミラーゼの需要は、次項のグルコアミラーゼとともに、グルコースの生産を目的とするものが最も大きい。しかしこの2つの酵素は温度やpHなど反応条件が異なるため、反応条件を変えなければならない不便があるので、両者の差を小さくするような酵素の開発が進められている。

タカアミラーゼAは前に記したとおり、1894年に高峰謙吉が発見した麹かび (*Aspergillus oryzae*) によって作られる「タカジアスターゼ」から精製されたものであり、基本的には高峰による方法が継承されている、つまり、麹かびを用いるふすまの固体培養で生産されている。当然のことに、多くの改良が加えられていることは言うまでもないところで、たとえば、使用菌株である *A. oryzae* はその後突然変異によって生産性が改良されているほか、設備や装置のサニタリー化によって品質の向上をはかり、酵素の抽出工程では強制抽出による回収率の向上、濾過工程ではマイクロフィルタや限外濾過のような膜技術を活用して品質の向上が図られている。この酵素は現在も第一三共の胃腸薬に使用されているほか、一般の α -アミラーゼとしての用途にも使用されている¹⁾。

8.1.3 グルコアミラーゼ

この酵素の生産株は *Aspergillus niger*, *A. awamori* などのカビ、および *Rhizopus delemar* などクモノスカビである。前者は大型の通気攪拌培養で、後者はふすま培地を用いる固体培養で生産されている。通気攪拌培養された *Aspergillus* では他の酵素が同時に生産される、たとえば、副生するマルトースを原料にしてオリゴ糖を生成するグルコシルトランスフェラーゼなどである。このため副生物などに注意しなければならない場合などには酵素の起源に注意を払う必要がある。

グルコアミラーゼはアミロースを非還元末端からグルコース単位で分解する酵素で、グルコースの生産に不可欠の酵素であるとともに、グルコースイソメラーゼを用いる異性化糖の生産にも重要な酵素である。また、4章で記したように、グルコアミラーゼは多くの企業が生産を開始した酵素であり、わが国の酵素産業のスタートに大きな意味をもっている。

8.1.4 プルラナーゼ

プルラナーゼは1961年にプルランを分解する酵素としてベンダー (*H. Bender*) らによって、*Krebsiella aerogenes* から発見された。プルランとは黒色酵母の一種である *Aureobasidium pullulans* (旧名 *Pullularia pullulans*) が細胞外に作る高分子

の多糖である。マルトトリオース (グルコース3分子がつながったもの) が α -1,6結合で重合した規則的な構造をもっている。プルラナーゼはプルランだけではなく、デンプン、グリコーゲンなどの α -1,6グリコシド結合を加水分解する。一方、プルランには作用せず、デンプン、グリコーゲンの α -1,6グリコシド結合を切る酵素イソアミラーゼも発見されている。

この酵素の作用は図8.2のデンプンの構造から見られるように、デンプンの“枝切り”の酵素であり、 β -アミラーゼと併用してマルトースの生産に、また他のアミラーゼと併用してグルコースの生産向上に利用されている。工業的に利用されている生産株は *Krebsiella aerogenes*, *Bacillus sp.* で、通常の通気攪拌培養が行われている。

林原 (株)、天野エンザイム、ノボノルディスクバイオインダストリー社などが主なメーカーである。

8.1.5 β -アミラーゼ

この酵素はデンプンの α -1,4グリコシド結合を非還元末端からマルトース単位で加水分解してマルトースを生成する。麦芽由来の酵素が使用されている。麦芽糖の水飴、マルトースシロップなどに用いられている。微生物では *Bacillus* 属の細菌が生産する。

8.2 糖質関連酵素

8.2.1 グルコースイソメラーゼ

この酵素の開発は1957年マーシャル (R. O. Marshall) らが、5単糖であるD-キシロースをD-キシロースに異性化する酵素、キシロースイソメラーゼが *Pseudomonas hydrophila* によって生産され、この酵素はまたグルコースをフラクトースに異性化することを見出したことから始まる。この酵素の名前はこの反応に由来する。この酵素を有効に活用して、比較的安価で甘味の少ないグルコースから、果物のさわやかで高い甘味を示すフラクトース (果糖) を生産しようという試みが行われた。この反応はグルコースとフラクトースが平衡状態を保っているため、2つの糖の混合物として異性化糖が得られた。反応式は図3.4に示す通りである。異性化糖はフラクトースの甘味をもつことから飲料に多用され、1999年の我が国の生産量は砂糖の消費量とほぼ同量を占めるまで増加したと言われている。

1960年ころからわが国でもこの酵素生産株のスクリーニングが開始され、放線菌である *Streptomyces phaeochromogenes*, *S. albus*, *S. murinus* などが得ら

れた。これらの菌株の培養には炭素源としてグルコース、コーンスターチを α -アミラーゼで液化したもの、窒素源として脱脂大豆、その他ミネラルのほかに、酵素の誘導物質としてキシロースが必要である。培養は35°C程度で行われる。この酵素は固定化することによって威力を発揮した。固定化酵素は菌体をキトサンや親水性乳液状のアニオン交換樹脂に混合して凝集させてこれを顆粒状にし、グルタルアルデヒド溶液に浸して架橋反応させて乾燥させて調製する。固定化酵素を用いる異性化糖の生成反応はグルコースを原料として、55°C付近で行われる。酵素の安定性を示す活性の半減期は2,000~3,000時間と言われている。

8.2.2 トレハロース生成酵素

トレハロースは、動物、植物および微生物界に広く分布している化合物で、生理学的な役割は細胞の浸透圧の調節、耐乾性の付与などと考えられている。このトレハロースを生成する酵素が林原生化学研究所によって1990年代に見出された。この酵素の応用によってデンプンから300~400円/kgという、従来に比較して非常に安価なトレハロースが供給されるようになり、トレハロースの利用が大きく拡大されることになった。すなわち、食品などの品質劣化防止作用として色の変化、デンプンの老化、油脂の変敗、タンパク質の変性、吸湿、などの防止に有効であるほか、好ましくない味（苦味、渋味、えぐ味など）の低減、抗酸化物質を安定に維持する作用、鮮度の保持、虫菌予防効果、などなど、さらに医療用途として臓器の保護や手術後の癒着の防止にまで、広範囲の効果が示されている。

1) トレハロースの構造式

この物質の構造式は図8.3に示すようにグルコースが α 、 α -1.1結合した非還元性の甘味をもつ二糖である。

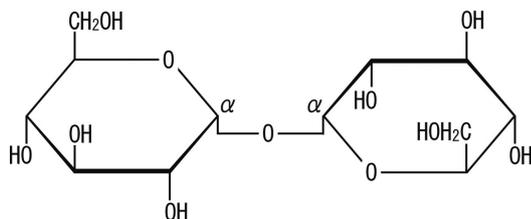


図8.3 トレハロースの構造式

2) トレハロースの生成反応経路

トレハロースのデンプン(→アミロース)からの生成経路は図8.4に示す通り、アミロースの末端のグル

コースが反転して α 、 α -1.1結合を形成し、これをグルコース2分子単位で切断するという2段の反応を触媒するマルトオリゴシルトレハロース合成酵素(MTSase)とマルトオリゴシルトレハロースヒドロラーゼ(MTHase)の作用によるものである。

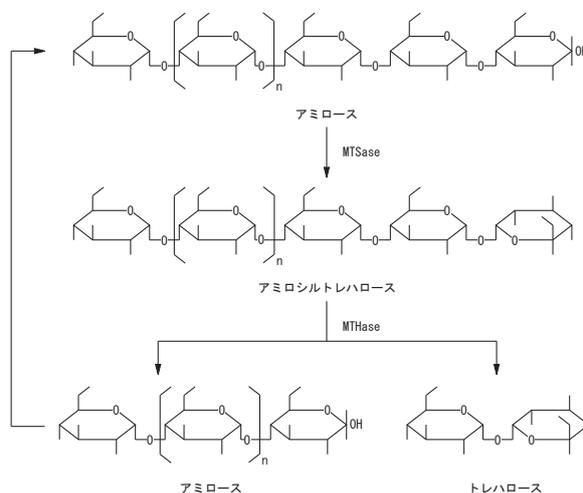


図8.4 アミロースからのトレハロース生成反応式

MTSase、MTHaseの生産株は*Arthrobacter*、*Sulfolobus*、*Brevibacterium*などに属する細菌であるが、実用生産には*Arthrobacter*属の細菌が突然変異によって改良された菌株が使用されている。トレハロースの供給は林原(株)の独走状態と思われる。

8.2.3 サイクロデキストリン生成酵素

サイクロデキストリン(CD)はデンプンから生成するデキストリン(アミロース)が α -1,4グルコシド結合でリング状に結合した化合物の総称であるが、これらのうちグルコース分子が6、7、8個繋がったものが、それぞれ、 α -CD、 β -CD、 γ -CDと呼ばれる。これらのリングの外側は親水性、内部は疎水性の性質があるため、まずCDに取り込まれた色素が溶液中で安定に保存されることが示されて以来、多くの用途に活用されるようになった重要な物質である。これらのCD類を生成する酵素がサイクロデキストリン生成酵素(cyclomalto-dextrin-glucanotransferase: CGTase)である。

原料のデンプンからのCDの生成経路の概略を図8.5に示した。また各種CGTaseの生産株とそれらの性質を表8.2に示した。

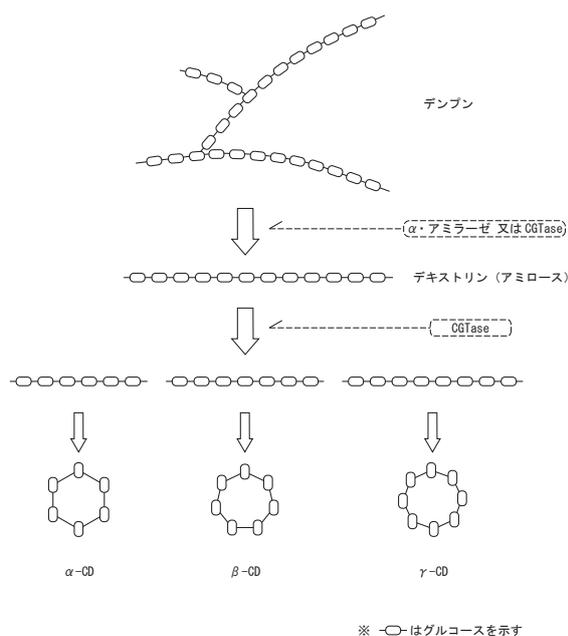


図 8.5 デンプンからのサイクロデキストリン (CD) の生成反応

表 8.2 各種起原の CGTase の性質

微生物名	最適 pH	最適温度 (°C)	デンプンからの初期反応生成物
<i>B. macerans</i> (IFO3490)	5.0~5.7	55	α-CD
<i>K. ozytoca</i> (M5al)	5.0~6.0	—	α-CD
<i>B. stearothermophilus</i> (TC-60)	5.0~5.5	75	α,β-CD
<i>B. coagulans</i>	6.0~6.5	65	α,β-CD
<i>B. circulans</i> (ATCC9995)	5.2~6.1	55	β-CD
<i>B. megaterium</i> (No.5)	5.0~5.7	55	β-CD
<i>B. ohbensis</i> (C-1400)	5.0~6.0	60	β-CD
アルカリ性 <i>Bacillus</i> sp. (ATCC21783)	4.5~9.5	65	β-CD
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. (ATCC53627)	約 5	95	β-CD
<i>Micrococcus</i> sp. (ATCC31606)	5.5~6.5 および 10	60	β-CD
<i>B. subtilis</i> (No.313)	7.5~8.5	65	γ-CD
<i>Brevibacterium</i> sp. (No.9605)	約 10	45	γ-CD

CD は分子の空間の中に種々の物質を取り込み、包接化合物を形成して物質の物性を安定化するので、応用が拡大されてきた。たとえば、香料や香気成分などの揮散しやすい物質の安定化、空気や紫外線、水などで分解や変質する物質の安定化、水に溶けにくい物質の可溶化、脂肪など油性物質の乳化や粉末化、苦味や渋味などのマスキング、さらに、医薬や食品の有用成分の体内での吸収性の向上、などなど多くの用途が開発されている。

身近な例としては、茶製品のカテキン量の増加なども CD の活用で行われているという。

一方、サイクロデキストリンを合成する反応系にシュウクロース (砂糖) を加えるとシュウクロースのグルコース側にグルコースやマルトースが α-1,4 で結

合したオリゴ糖が生成する。これらはグリコシルシュウクロースと呼ばれ、これを主成分とする水飴がカップリングシュガーである。例としてグルコースが 1 分子結合したグリコシルシュウクロース (エルロース) の構造式を図 8.6 に示す。カップリングシュガーの特徴は虫歯にならない、抗う触性をもつこと、およびまろやかな甘味を示すことで、年間 6,000 トンほど生産されている。

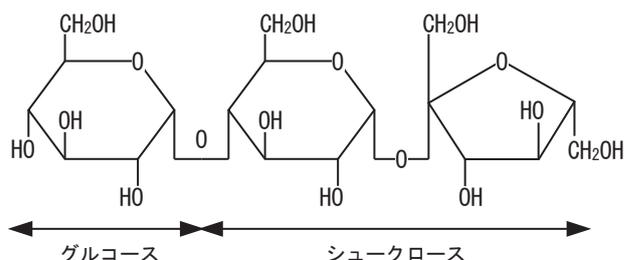


図 8.6 グリコシルシュウクロースの構造式

8.2.4 α-グルコシルトランスフェラーゼ

シュウクロース (砂糖) 分子内のグルコースとフラクトースの α-1,2 結合を α-1,6 結合に変えて、パラチノースを生成する反応を触媒する酵素で、*Protaminobacter rubrum* が生産する (図 8.7)。パラチノースは抗う触性の甘味料でキャンデーなど多くの菓子類に使用されている。三井製糖による年間の生産量は 5,000 トンを超えていると言われている。

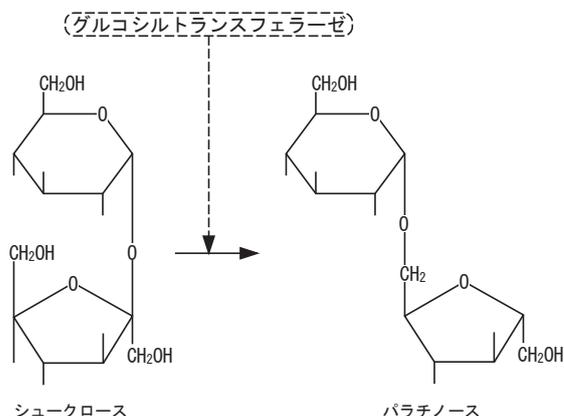


図 8.7 グルコシルトランスフェラーゼによるシュウクロースからパラチノースの生成

8.2.5 グルコースオキシダーゼ

グルコースを酸化してグルコン酸に変換する酵素である。この酵素は植物、微生物界に広く分布しているが、1926 年にミュラー (D. Muller) が黒麹カビ (*Aspergillus niger*) の菌体抽出液から得たのが最初で、その後 *A. niger* のほか *A. oryzae*, *Penicillium glaucum*, *P. notatum*, *P. chrysogenum*, *P. amagasakiense* などのカビ類の多くが生産する

ことが見出されたが、工業生産は *A. niger*、*P. amagasakiense* を用いて行われている。

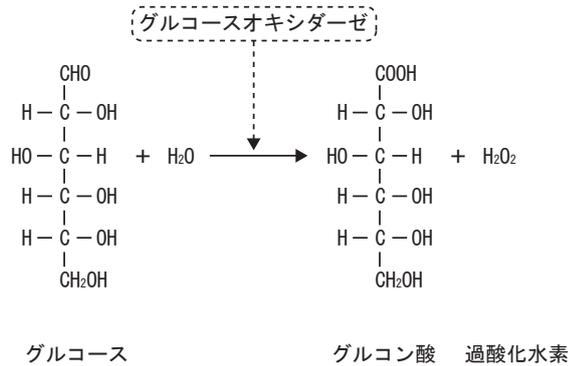


図 8.8 グルコースオキシダーゼによるグルコースの分解反応

この酵素の反応系は図 8.8 の通りで、グルコースを基質としてグルコン酸と過酸化水素 (H_2O_2) を生成する。過酸化水素をセイヨウワサビから得られるペルオキシダーゼを用いて分解し、発生する酸素で酸化されると発色する色素を比色することによって定量する。

この酵素の基質特異性は非常に高く、グルコース以外の糖類あるいはグルコースの誘導体にはまったく作用しない。この性質を利用して、血液や尿中のグルコースの定量、あるいは食品中のグルコースの除去に使われる。グルコースが原因で起こる褐変反応や溶解性の変化を防止するためである。

グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、色素を組み合わせたグルコース定量用キットも発売されている。またグルコース定量用のバイオセンサーも開発され、わが国で 700 万人と言われる糖尿病患者あるいは予備患者の人々のグルコース量の管理に使われている。

8.2.6 β -ガラクトシダーゼ (ラクターゼ)

乳糖を加水分解してグルコースとガラクトースに変換する酵素である。分解反応式を図 8.9 に示す。かなり多くの人々は通常の牛乳が飲めないと言われている。ラクターゼが欠損し、牛乳に含まれる乳糖を消化出来ないため下痢症状などを示すためである。わが国ではこの乳糖不耐性症の治療に *Aspergillus niger* が作るラクターゼの製剤が使用されている。アメリカではサプリメントとして市販され、牛乳だけではなく乳製品による下痢症状の回避に使用されている。

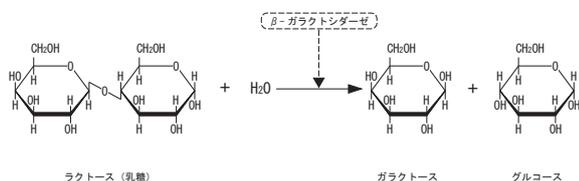


図 8.9 β -ガラクトシダーゼによる乳糖の分解反応式

また、低乳糖の牛乳が *Kluyveromyces lactis*、*K. fragilis* などが作るラクターゼを固定化したバイオリアクターで処理することによって製造されている。

一方、 β -ガラクトシダーゼは腸内細菌であるビヒズ菌の増殖に有効で、整腸作用があるとされるガラクトオリゴ糖の生産に活用されている。ガラクトオリゴ糖のそのほかの特徴は、甘味の質の良さや胃の中の酸性条件下での安定性など、用途範囲の広い素材である。たとえば、*Aspergillus oryzae* 由来のこの酵素を乳糖に働かせると、乳糖が分解され、その構成糖であるガラクトシル基を乳糖分子のガラクトシル基に転移させる。その結果、 β -1,6 または β -1,3 結合で転移した Gal11-6Gal1-4Glu、Gal11-3Gal1-4Glu (Gal はガラクトース、Glu はグルコースを、また肩つきの数字は結合する炭素の位置を示す) のガラクトオリゴ糖の混合物が得られた。

8.2.7 β -フラクトフラノシダーゼ (インベルターゼ、サッカラーゼ)

β -フラクトフラノシダーゼはシュクロース (砂糖) を加水分解してグルコース (ブドウ糖) とフラクトース (果糖) に変換する酵素である。分解反応式を図 8.10 に示す。菓子類の製造に使用されるシュクロースは条件によって結晶を析出することがある。この酵素を用いて、シュクロースをグルコースとフラクトースの等量混合物である転化糖にすれば結晶の析出を防止することが出来るわけである。転化糖の甘味度はシュクロースと変わらない。この酵素の生産株はサッカロミセス酵母である。

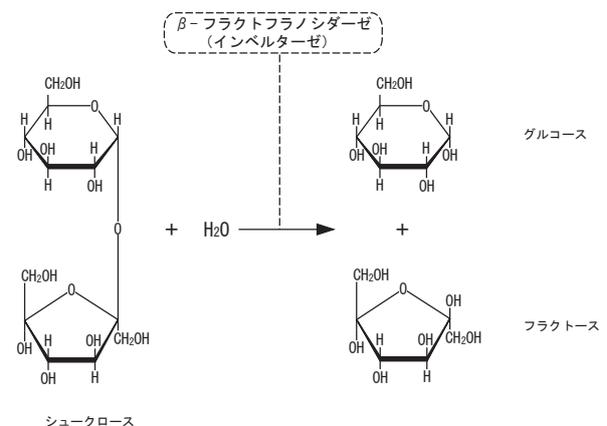


図 8.10 β -フラクトフラノシダーゼによるシュクロースの加水分解反応

一方、*Aspergillus niger* が作る β -フラクトフラノシダーゼを高濃度のシュクロース溶液に作用させると、シュクロースが分解されると同時に、その構成

糖であるフラクトシル基がシュークロースのフラクトシル基側に β -2,1結合で転移され、フラクトオリゴ糖が生成する。これらの主な成分は、Glu1-2Fru1-2Fru、Glu1-2Fru1-2Fru1-2Fru (Gluはグルコース、Fruはフラクトースを示す)である。

フラクトオリゴ糖は消化管の酵素で分解されず腸内まで送られ、ここでビヒズス菌の増殖に役立つとされている。明治製菓の「メイオリゴ」など、年間4,000~5,000トンが生産され、菓子類、ヨーグルトなどに用いられている。

8.2.8 ペクチナーゼ

植物体の非木質化組織に特有の酸性の多糖類がペクチンで、柑橘類の皮、リンゴなどの果実など、多くの細胞間物質を形成し、糖や酸を加えるとゲル化してゼリーとなる。ペクチナーゼはペクチンを加水分解して低分子化する酵素で、*Aspergillus*や*Rhizopus*などのカビから生産された酵素が、欧米では1920年代から果汁やワインの清澄化に使用された。我が国では三共社での開発が比較的早く、ブドウ白腐病菌(*Coniothyrium diplodiella*)から高い活性をもつものを選択して、「スクラーゼS」として発売されている。上のように、果汁、ワインの清澄化のほか、ミカンの果皮の除去に使用されている。

8.2.9 ヘスペリジナーゼ

ミカン等に含まれる配糖体の一種がヘスペリジンである。ヘスペリジンを分解する酵素がヘスペリジナーゼで、ミカン缶詰の白濁の防止に使用される。

A. niger (黒コウジ菌)などのカビが生産する酵素である。

8.2.10 アントシアナーゼ

植物の花や果皮に存在して赤や青の色を示す配糖体がアントシアニンで、この物質を分解する酵素がアントシアナーゼである。桃の果汁やブドウ果汁の脱色に使用される。

A. oryzae, *A. niger*などのカビが生産する酵素である。

8.2.11 リゾチーム

リゾチームは細菌の細胞壁中のN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸の β -1,4結合を加水分解する酵素である。食肉加工品の防腐、医薬、さらに実験用に細菌の溶解用に使用される。卵白から調製される。

8.2.12 キシラナーゼ

キシランは主に5単糖であるD-キシロースが β -1,4結合して構成されるヘミセルロースで、ワラや植物の穂軸の主成分である。キシランを加水分解する酵素がキシラナーゼで*Bacillus*属の細菌が主な生産株である。この酵素の応用はパルプの漂白である。パルプの着色の原因はリグニンと考えられ、リグニンとキシランの結合を切るため、従来の方法は塩素系化合物による漂白であるが、ダイオキシン等の発生が懸念され、この酵素が活用されている。

一方、*Trichoderma*由来の酵素を用いてキシランを加水分解するとキシロオリゴ糖が生成するが、このキシロオリゴ糖はビヒズス菌の良好な増殖因子として食品に使用されている。

8.2.13 タンナーゼ

タンニンは広く植物界に存在し、多くのフェノール性水酸基をもつ構造の芳香族化合物の総称で、一定の化合物ではない。収斂性の味をもつ。タンナーゼはこれらの化合物を加水分解する。たとえば次のような反応である。

タンニン類はカフェインやアミノ酸が存在するときに沈殿を生じる(クリームダウン)ので事前にタンナーゼで処理することによって防止することができる。*Penicillium*や*Rhizopus*などのカビが生産する。三共社では早くから開発を始め、ブドウ酒、紅茶、果汁飲料などへの応用が図られている。ポッカコーポレーション社では缶入り紅茶の工業化に最初に成功している。

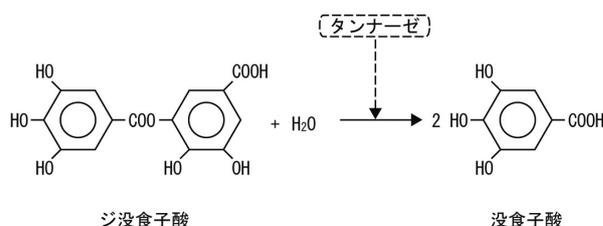


図 8.11 タンナーゼによる没食子酸の分解反応

8.3 タンパク質関連酵素

8.3.1 プロテアーゼ (タンパク質分解酵素)

タンパク質を分解する酵素はプロテアーゼ、ペプチドを分解する酵素はペプチダーゼと呼ばれている。ここではプロテアーゼとして扱うことにする。動植物および微生物由来のプロテアーゼが多数知られ、また特性から構造まで明らかにされているものも多数に及んでいる。

(1) プロテアーゼ（ペプチダーゼ）の由来

プロテアーゼの種類は多く、たいいていの微生物はプロテアーゼを生産するので、これらの中から、生産量が多いもの、あるいは特徴のある機能をもつものが選ばれて有効に活用されている。麴カビ (*A. oryzae*) は清酒や醤油の醸造に使用されているとおり、高いプロテアーゼ活性をもつ。そのほか *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* などの細菌類、放線菌類も高い活性を持っている。植物由来の酵素ではパパイヤの実から得られるパパイン、パイナップルから得られるブロメラインが有名であるし、さらに動物由来の酵素では胃液のペプシン、膵臓のトリプシン、キモトリプシンがよく知られている。さらに若い反芻動物の胃から得られるキモシンはチーズの製造に使用されている。

(2) プロテアーゼ（ペプチダーゼ）の利用

プロテアーゼは基本的にはタンパク質のペプチド結合を加水分解してペプチドあるいはアミノ酸を生成する反応である (図 8.12)。

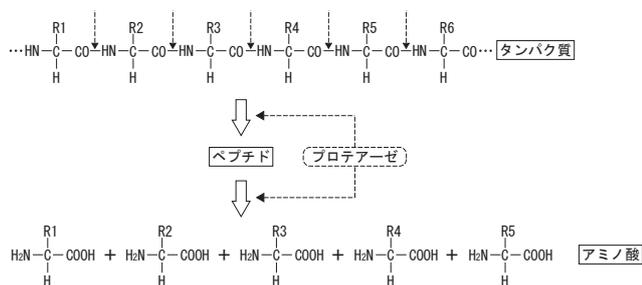


図 8.12 プロテアーゼによるタンパク質の加水分解

-->矢印で示した箇所では加水分解が起こりやすいことを示す。起こるかどうかは酵素の基質特異性で決まる。

この酵素は応用範囲が広く、以下に示すような用途に使用されている。食品の製造や加工分野では、動物および植物タンパク質を原料とする調味料の製造、食肉の軟化剤、カゼインを原料とするチーズの製造などがあり、一方プロテアーゼのタンパク質分解の逆反応を利用したペプチド合成に活用されている。医薬品の分野では消化剤、抗炎症・去痰剤など、さらに大きな用途は洗剤用酵素である。そのほかには皮革製造の処理工程にも使用されている。これらを以下に記す。

1) 調味料の製造

天然物を原料として味と風味を向上させる調味料がプロテアーゼの活用で製造されている。タンパク質を分解する方法と、魚介類、肉類、野菜類を原料として

成分を抽出する方法があり、両方にプロテアーゼが利用されている。

前者は HAP (hydrolyzed animal proteins: 動物タンパク質加水分解物)、HVP (hydrolyzed vegetable proteins: 植物タンパク質加水分解物) と呼ばれ、以前は塩酸による分解が行われていたが、塩酸法では原料の風味が失われやすい上に、生成するアミノ酸の内、トリプトファンやメチオニンのように塩酸で分解されるものがあるので、酵素法に置き換えられてきている。ただ、プロテアーゼの種類によっては苦味が生じるものがあるので、種類をよく吟味する必要がある。一般的には *Bacillus* 属細菌由来のプロテアーゼは苦味が生じる傾向があり、カビのものは少ないと言われている。後者 (抽出法) では肉エキス、ハマグリエキスなどの風味成分がプロテアーゼの利用によって効率よく抽出される。

2) 洗剤用アルカリプロテアーゼ

1960 年代にプロテアーゼがタンパク質性の汚れを分解する効果があることが証明された。洗剤にこの酵素を添加する方法が開始され、多くの企業がプロテアーゼの生産を始めた。しかし、酵素の粉塵がアレルギーの原因となることが示されて、多くの企業の計画は頓挫せざるを得なかった。ここに登場したのが酵素の顆粒化技術であり、これによって洗剤用酵素の生産は一挙に増加をたどることとなり、酵素製品の中で最も大きな比重を占めるまでに成長することになった。洗剤用酵素として、プロテアーゼが最初に活用されたが、後にセルラーゼやリパーゼ、アミラーゼなども活用されることになった。

洗剤用酵素にはどのような条件が必要かを見る前に、洗剤はどのような成分から構成されているかを見てみる。一般的には界面活性剤、キレートビルダー、アルカリビルダー、蛍光増白剤、および漂白剤である。界面活性剤は洗剤の中心的な働きをし、界面張力の低下、可溶化、分散化などの作用で汚れを除く働きがある。アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル硫酸塩などが使われる。キレートビルダーは水に溶けているカルシウムなど、ミネラルの硬度成分を捕捉して洗浄効果を高める働きがある。クエン酸塩、ゼオライトなどが使われる。アルカリビルダーは粒状形成剤で炭酸塩やケイ酸塩が使われる。蛍光増白剤のほか、漂白剤として次亜塩素酸ソーダなどが加えられる。

このような混合物の中で酵素が力を発揮するには、界面活性剤、キレートビルダー、蛍光増白剤、漂白剤などの影響がないか、あっても最小のもの、さらに

pHはアルカリ条件下、温度は冬場の比較的低温でも活性が認められることである。

このような条件を備えたアルカリプロテアーゼがノボルディスク社で開発された。*Bacillus licheniformis* が生産するズブチリシン Carlsberg と呼ばれているプロテアーゼである。この酵素は pH5 ~ 11 で活性を示すが、のちにさらに高い pH で活性を示すもの、低温で活性を示すものが開発されている。またこの酵素は構造と機能の相関性が最もよく解析されている酵素で、6.2.3にも記したが、*B. clausii* 由来の酵素タンパク質の中の 222 番目のメチオニンが漂白剤によって酸化されやすいことが示された。このことは漂白剤による酵素の失活が起こりやすいことを意味しているわけで、したがって最近ノボザイム社ではタンパク質工学技術によってメチオニン残基をアラニンやセリン残基に置換することによって漂白剤に対する安定性が格段に向上した酵素が造成され、商品化されている。そのほか各社各様のプロテアーゼが販売されている。これらの酵素は菌体外酵素として培地中に蓄積されるので、通常通気攪拌培養により、また単離・精製も常法によって行われている。

3) 食肉軟化剤

品質の落ちる硬い肉類の軟化剤として、植物由来のプロテアーゼであるブロメラインやパパインが使われている。この酵素の利用によって、肉全体が分解されてしまうので、肉の硬さの原因である筋を特異的に分解する酵素の探索も行われている。

4) チーズの製造／キモシン

チーズの製造の概略は、原料の牛乳に乳酸菌のスターターを加えて乳酸発酵を行い、その後キモシンと呼ばれる凝乳酵素を加えて固めるというものである。酵素利用という視点から重要なプロセスは凝乳酵素の添加の工程である。凝乳酵素は子牛、子羊の第 4 胃から得られるもので、以前はレンネットと呼ばれていたものであるが、これを得るためにこれらの家畜を若いうちに屠殺しなければならないが、これは経済的にはかなり生産性の低いことをしていることになる。したがって、この酵素を微生物の世界にもとめてスクリーニングに成功した人がいた。東大の有馬 啓、名糖産業社の岩崎伸二郎で、凝乳酵素を生産するケカビ *Mucor pusillus* (現在は *Rhizomucor pusillus*) を発見した³⁾。引き続いて *R. miehei* や *Cryphonectori aparasitica* などの有力な凝乳プロテアーゼ生産株がほかの研究者によって見つけられた。ムコールの凝乳

プロテアーゼ (ムコールレンネット) の安全性は我が国の厚生省や FDA でも確認され、2000 年の世界のチーズ生産の約 7 割が微生物の酵素で賄われていると言われている。この酵素の発見によって世界では数百万頭の子羊 (あるいは子牛) の生命を救ったとも言われている。有馬はこれらの業績で 1983 年に国際的な第一回バイオテクノロジー賞を受賞している。

一方、遺伝子工学的なアプローチで子牛の凝乳プロテアーゼを大腸菌に生産させる方法も成功している⁴⁾。つまり、凝乳プロテアーゼ (キモシン) の前駆体であるプロキモシンの mRNA を第 4 胃の粘膜から取って精製し、これを鋳型として逆転写酵素によってプロキモシンの相補的な DNA を合成してプラスミドに組換えて大腸菌に導入し、大腸菌でのプロキモシンの生産に成功したものである。この研究ではヒトなどの真核生物の遺伝子の発現を、大腸菌などの原核生物のそれに適合させて強力な発現システムを構築して、大腸菌の菌体タンパク質の 20% に相当する量の生産を達成している。ただこのタンパク質は封入体とよばれる顆粒状の変性タンパク質の形体をしているため、変性剤たとえば、8M の尿素などで可溶化して、つぎに透析で除くような処理をする操作が必要である (このような操作はタンパク質の refolding (巻きもどし) と呼ばれている)。プロキモシンの N 末端に存在する 44 残基のアミノ酸は酸性領域で自触的にのぞかれ、キモシンに変換される。これらの業績をあげた別府輝彦は学士院賞を受賞している。

このような技術によって得られた、いわゆる組換え体キモシンは 1990 年にアメリカの FDA によって GRAS (generally regarded as safe) 物質として認可された。根拠としてこのキモシン活性体が子牛から得られるレンネットのものと同じであること、含まれる不純物には違いがあるが使用に際して安全性には問題がないことが挙げられている。アメリカではファイザー (Pfizer) 社、ヨーロッパではギストプロカーデイス (Gist-Brocades) 社などがマーケティングを行っており、アメリカでは短時間のうちにシェアを拡大したと言われている。日本やヨーロッパでは遺伝子工学についての社会的な受容性がないという状況がある一方、動物愛護や宗教的な理由、あるいは菜食主義者からは支持されるという状況にあるようで、今後どのような展開があるのか興味深いところである。

キモシンによる凝乳のメカニズムも明らかにされている。牛乳タンパク質のカゼインのうち κ (カップ) -カゼインの Phe115 と Met116 の間のペプチド結合を選択的に切断し、主タンパク質である ω (オメガ)

ーカゼインの凝集を引起こすとされている。

5) プロテアーゼを用いるアスパルテームの合成

プロテアーゼの反応は圧倒的にタンパク質の分解の方向に傾斜しているが、基礎的な実験室レベルの研究では、反応条件を選べば逆反応が可能で、ペプチドの合成に利用できることが示されていた。

アスパルテームはL-アスパラギン酸とL-フェニルアラニン・メチルエステル (L-Asp-L-Phe-OMe) からなるジペプチドで (図 8.13)、砂糖の約 200 倍の甘味を示す低カロリー甘味料である。味の素社とニュートラスイート社の共同開発製品で、安全性データも提出され、1981 年にはアメリカの FDA、1983 年には我が国の厚生省から食品添加物の認可が得られている。アスパルテームの製造は化学合成法で行われているが、酵素法による生産が報告された⁵⁾。この合成反応に用いられた酵素は好熱性細菌 *Bacillus thermoproteolyticus* が生産する耐熱性プロテアーゼであるサーモライシンが選ばれ、図 8.13 に示す反応によって z (ベンジルオキシカルボニル)-L-Asp-L-Phe-OMe を合成し、保護基 (z-) を除いてアスパルテームを得る方法である。サーモライシンはL体のフェニルアラニン・メチルエステルにしか作用しないのでD体のものが未反応で残るが、このD体は加熱などの処理によって化学的にラセミ化してDL体が反応系にリサイクルされ、この反応が繰り返されて最終的に全量がアスパルテームに変換される。この方法によるアスパルテームの工業生産は東ソー社とオランダのDMS社の合弁企業であるHSC (Holland Sweetener Company) 社がオランダで実施したが、現在は稼動していない。

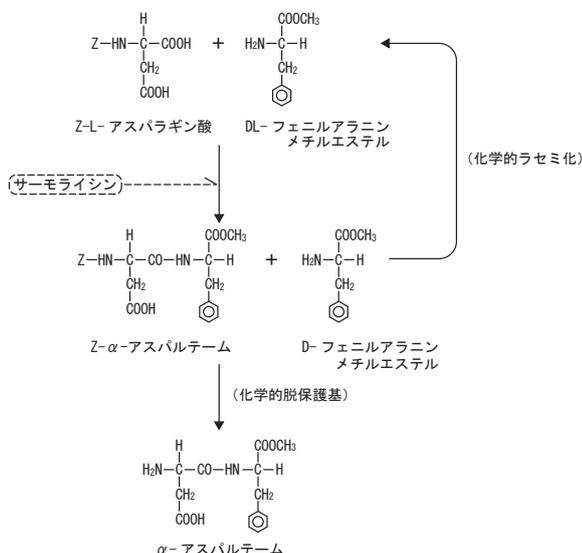


図 8.13 プロテアーゼ (サーモライシン) を用いるアスパルテームの合成反応

6) 消炎・喀痰喀出剤

プロテアーゼが消炎・喀痰喀出効果を示す医薬品として開発された。動物の膵臓から分泌されるトリプシン、キモトリプシン、パイナップルから得られるブロメライン、放線菌由来のプロナーゼなどが医薬品として使用されている。一方、武田薬品社では、カイコの腸から分離された細菌であるセラチア (*Serratia* sp. E-15) が強い活性のプロテアーゼを生産することから、セラチオペプチダーゼと呼び、この酵素を消炎剤としての開発を進めた。この酵素は亜鉛 (Zn) を要求する金属酵素で、強いプロテアーゼ活性による消炎とともに、シャープな喀痰効果を示した。一方、体内では他の酵素によって分解されず、さらに一般的なタンパク質が示す抗原抗体反応を示さないという大きな特徴が明らかにされた。これは体内では α 2-マクログロブリンと複合体を形成して抗原性をマスクされた形で活性を発揮しているためである。セラチオペプチダーゼを主成分とする武田薬品社の「ダーゼン」は 1998 年には 100 億円の商品となったと言われている⁶⁾。特許期限が切れて競争が激しくなっているとも言われている。そのほか、*Asp. melleus* が生産するアルカリプロテアーゼ、*St. griseus* が生産するプロテアーゼなどが消炎酵素剤として市販されている。

7) 血栓溶解用酵素

i) ストレプトキナーゼ

溶血連鎖球菌 (*Streptococcus* 属細菌) が生産する血栓溶解酵素である。血栓とは血液内の細胞や血漿タンパク質成分が血管系の中に沈着した状態のことで、脳や心筋梗塞の症状を起こす原因とされているが、この血栓を溶解する酵素がプラスミンである。プラスミンはその前駆体であるプラスミノゲンから生成するが、ストレプトキナーゼ (および次の項に記すウロキナーゼ) は血液中のプラスミノゲンの Arg-Val 間の結合を切るプロテアーゼであって、プラスミンの生成を促進する酵素である。ただ、ストレプトキナーゼはヒトにとっては異種タンパク質であるため抗原抗体反応の可能性が高く、使用に制限があると言われている。

ii) ウロキナーゼ

ストレプトキナーゼと同様の血栓溶解作用があり、由来はヒトの尿である。ヒト由来であるため抗原抗体反応の心配はなく持田製薬社、ミドリ十字社 (現 田辺三菱製薬社) で製造販売されている。一方、ヒトの腎臓細胞の組織培養による生産法も確立された。ヒトのウロキナーゼ遺伝子を *E. coli* で発現させる研究も行われている。

iii) TPA (Tissue Plasminogen Activator、組織プラスミノゲンアクティベータ)

TPAは血管の内皮細胞で作られるプロテアーゼで、血栓のプラスミノゲンに作用してプラスミンに変換する血栓溶解剤である。アメリカのバイオベンチャー(ジェネンテック社)により遺伝子工学による製法が開発され、協和発酵社と田辺三菱製薬社から、それぞれ「アクティバシン」、「グルトバ」の商品名で発売されている。

8.3.2 ペプチド合成酵素

ペプチドとはひとつの α -アミノ酸のカルボキシル基と別のアミノ酸のアミノ基が脱水縮合してできるペプチド結合によって、2個以上のアミノ酸がつながった化合物である。ペプチドにはホルモンなど、いろいろな生理活性作用が見出され、医薬品などとして注目されている。その従来の製法は化学合成法による調製、あるいはタンパク質の酵素分解物からの分離によって行われていた。化学合成法では、ペプチド結合を形成する時に、アミノ基、あるいはカルボキシル基に保護基を導入したり、保護基をはずす操作が必要で、この煩雑さのため大量調製が難しく、またタンパク質の酵素分解物からの分離法では望みの成分は容易にえられないため、いずれも実用的なプロセスとはならなかった。最近味の素社と協和発酵社から、いずれも酵素法による製法が報告された。

前者は *Empedobacter brevis* などのバクテリアから得られるアミノアシル転移酵素を用いて、アミノ酸メチルエステル ($AA_1-COOCH_3$) に別の遊離のアミノ酸 (AA_2) を結合させるものである(反応式1)。同様に第3、あるいは第4のアミノ酸も順次結合させることができる(反応式2)⁷⁾。このようにいろいろのアミノ酸組成をもつペプチドが作れる新しい技術として注目されている。輸液の成分として活用されるジペプチドが工業生産されている。

一方、後者は遊離のアミノ酸にエネルギーとしてATPを関与させるリガーゼによる反応で、次のような反応式でペプチドが生成する⁸⁾が、アミノ酸の正逆2通りの組み合わせができる可能性があり、収率が悪くなるのかも知れない。

これらの技術開発によってペプチドの生産が可能になったことは、無限のアミノ酸の組み合わせの中から期待される機能を持つペプチドが得られる可能性が大きくなったわけで、将来的には大きなマーケットが開拓される可能性を示している。

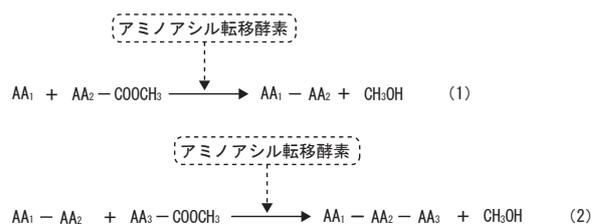


図 8.14 エステル転移酵素によるペプチド合成反応

AA₁: アミノ酸 1, AA₂: アミノ酸 2, AA₃: アミノ酸 3, AA₁ - AA₂: AA₁ と AA₂ のジペプチド, AA₁ - AA₂ - AA₃: AA₁, AA₂, AA₃ から成るトリペプチドを示す。

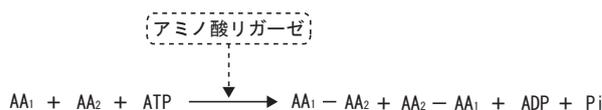


図 8.15 アミノ酸リガーゼによるペプチド合成反応

8.3.3 タンパク質の架橋酵素

(1) トランスグルタミナーゼ

京大の千葉英雄によって哺乳動物のタンパク質の架橋形成反応を触媒する酵素としてトランスグルタミナーゼが指摘されていた。マウスの膵臓から抽出されたこの酵素はカゼインやスキムミルクに作用させるとゼラチンのようにゲル化されることがわかり、味の素社は天野エンザイム社との共同研究で、酵素生産を微生物界にもとめ、生産株として放線菌である *Streptovercillium mobaranense* の分離に成功した⁹⁾。この酵素は菌体外酵素で、通常に通気攪拌培養で生産されている。この酵素は予想されたとおり、食品の組織に弾力性と硬さを与え、耐熱、耐酸、耐水などの性質を付与して食品タンパク質の向上に効果があり、畜肉、水産物、麺類、パンなどの加工に広く応用されている。製品は「アクティバ」の商品名で販売されている。

このほか生産株は *Streptomyces* などの放線菌、*Bacillus* などの細菌でも見出されており、遺伝子工学の技術で *E. coli* での生産も証明されている。

トランスグルタミナーゼによる反応システムは図 8.16 に示すように、タンパク質の中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミドと、同じくタンパク質のリジンの ϵ -アミノ基の間で架橋が形成されたものである。

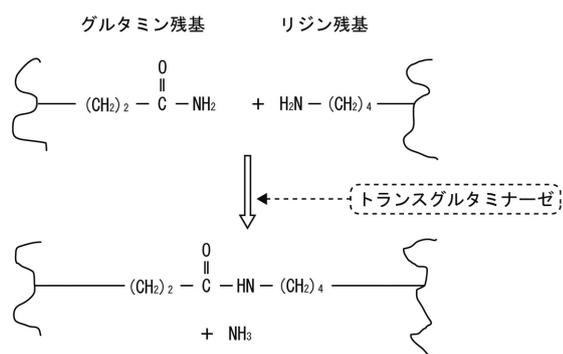


図 8.16 トランスグルタミナーゼによるタンパク質の架橋形成反応

8.4 アミノ酸関連酵素

アミノ酸は分子内にアミノ基とカルボキシル基をもつ化合物の総称であり、一般的にはタンパク質の構成成分である α 炭素にアミノ基をもつ α -アミノ酸を指し、構造式は $\text{R}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ で示される。Rの違いによって20種類のタンパク質性のアミノ酸が存在する。よく知られているように、これらのタンパク質の天然型のアミノ酸はL-体であり、発酵法で生産されるアミノ酸はL-体であるが、化学合成されたアミノ酸はDL-体である。このため通常の使用、特に医薬用に使用するものはL-体が要求されるので、化学合成されたものはL-体に変換する必要がある。この操作は光学分割と呼ばれている。

アミノ酸はうま味調味料（グルタミン酸ナトリウム）、医薬品（アミノ酸輸液、栄養剤）、飼料添加物（リジン、スレオニン、トリプトファン）、サプリメント、界面活性剤（N-アシル-グルタミン酸）など多方面で活用されている。

アミノ酸の製造と利用技術は日本で生まれたオリジナル技術であり、いずれの面でも世界をリードしている。製法は発酵法が中心となっているが、タンパク質の加水分解法、化学合成法も行われている。これらの方法の上に、さらに酵素法がこれも日本の技術で確立された。背景にはアミノ酸というターゲットがあり、このためにいかにして有利な製法開発を行うかという明確な意志がこのような技術成果を生み出したものである。このことは1章の「はじめに」に記したとおり、微生物の応用技術と酵素の生産とはほとんど並行して進展してきたことの証明でもある。酵素法と呼ばれるものに以下の方法がある。

8.4.1 アミノアシラーゼによるDL-アミノ酸からのL-アミノ酸の生産

アミノ酸の製法のうち、発酵法によって得られるアミノ酸はL-体であるのに対して、上記のとおり化学合成法によって得られるものはDL-体であるため、L-体に変換しなければならないが、これがなかなか厄介な操作である。そこで工夫された方法が以下に示す方法（図 8.17）で、DL-アミノ酸から比較的簡単に合成して得られるN-アシル DL-アミノ酸に *Aspergillus oryzae* などのカビから得られるアミノアシラーゼを作用させる。この反応では、アミノアシラーゼはL-体にしか作用しないのでD-体はそのまま未反応で残存する。これを加熱して化学的にラセミ化して再び反応を繰り返し、最終的に全体をL-アミノ酸に変換する方法である。アミノアシラーゼはDEAE-Sephadex にイオン結合させて固定化したものが使用された。なお、この方法は発酵法が確立される以前、化学合成法が盛んに研究されていたころに確立されたもので、医薬用などL-体アミノ酸が要求されるアミノ酸の生産に活用されたが、大部分のL-体アミノ酸が発酵法で生産されるようになった現在では、タンパク質構成アミノ酸としてはL-メチオニンだけがこの方法で作られている。なお、非天然型アミノ酸の光学誘導体の生産にはこの方法が使われている。田辺製薬（現田辺三菱製薬）社で開発された¹⁰⁾。

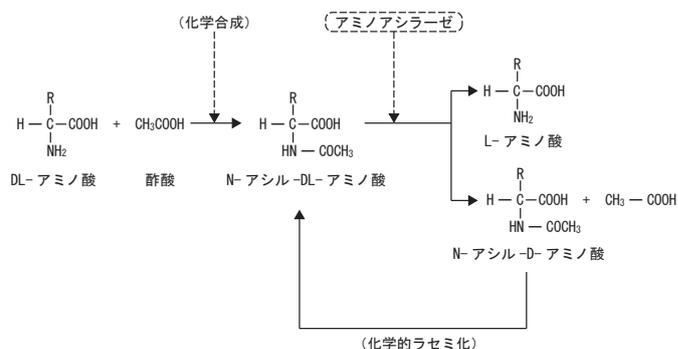


図 8.17 アミノアシラーゼを用いる DL-アミノ酸のL-アミノ酸への変換反応

8.4.2 アスパルターゼによるL-アスパラギン酸の生産

アスパラギン酸はアミノ酸輸液や栄養剤のほかに、合成甘味料であるアスパルテームの原料としての大きな需要のあるアミノ酸であるが、この製造は酵素法で行われている。田辺製薬社では、石油化学製品から比較的安価に製造されるフマル酸をアスパラギン酸に変換する酵素アスパルターゼが大腸菌などで生産されることを見出し、フマル酸からの生産法を開発した。

反応式を図 8.18 に示す。アスパルターゼ、さらにアスパルターゼを含む菌体はカラギーナンなどで固定化して連続的な反応でアスパラギン酸を製造する技術が確立されている。この方法はバイオリクターと呼ばれているが、実用生産でバイオリクターを応用した最初の例として評価されている¹⁰⁾。

この場合、酵素は菌体に含まれたものとして取り扱われるので、通常の粉末や結晶としての形態をとっていない。

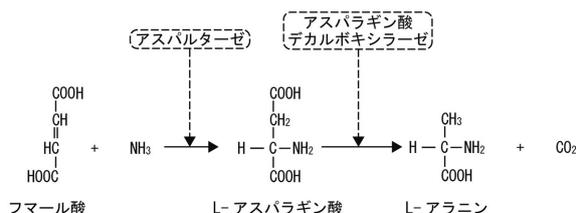


図 8.18 酵素法によるフマル酸からアスパラギン酸とアラニンの生成反応

8.4.3 アスパラギン酸デカルボキシラーゼによる L-アラニンの生産

アラニンはアミノ酸輸液や栄養剤としての用途がある。アラニンは発酵法で容易に生産されるアミノ酸であるが、微生物の体内で簡単にラセミ化されるため、得られるものは DL-体である。このため L-アラニンを得る方法はこの酵素法で行われている。田辺製薬社ではアスパラギン酸の β 位のカルボキシル基を脱炭酸する酵素、アスパラギン酸デカルボキシラーゼを生産する *Pseudomonas dachunhae* を分離し、この酵素（あるいは酵素を含む菌体）を上のアスパルターゼの場合と同様にカラギーナンなどで固定化することによってアスパラギン酸から効率よく L-アラニンを生産するプロセスを開発することに成功した。実質的には、このプロセスはフマル酸 \rightarrow L-アスパラギン酸 \rightarrow L-アラニンと連続するフローであるから、L-アラニンもフマル酸を原料にして製造されているということである¹⁰⁾ (図 8.18)。

8.4.4 β -チロシナーゼによる L-ジオキシフェニルアラニンの合成

L-ジオキシフェニルアラニン（以下 DOPA）は脳の神経機能を調節するドーパミンなどの一連の化合物の前駆体アミノ酸で、パーキンソン病などの老人性脳神経障害にすぐれた効果を示す医薬品である。微生物の生命活動とは無関係のアミノ酸であるため直接発酵法で生産させることは不可能であるが、微生物の酵素を用いる合成法が開発された。京大の熊谷英彦、山田

秀明らはチロシンを β 位で分解する下記の反応（図 8.19）を触媒する酵素、 β -チロシナーゼ（フェノールアンモニアリアーゼ）が *Citrobacter intermedia* や *Erwinia herbicola* などの細菌によって生産されることを見出した¹¹⁾。この酵素反応を解析し、この逆反応によってチロシンが合成されること（図 8.20 (2)）、さらにこの酵素の基質特異性が広いこと、フェノールに変えてピロカテコールを基質に使用すれば DOPA が合成できること（図 8.20 (3)）を見出して DOPA の新しい合成法を完成したものである。この反応の工業化は 1992 年から味の素社で実施されている。この場合も商品形態として β -チロシナーゼがあるのではなく、酵素は菌株の形で維持・保存されている。

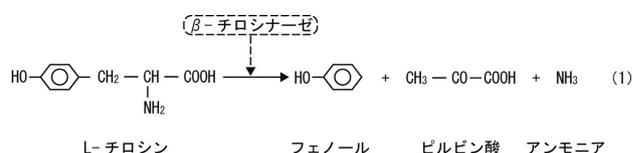


図 8.19 β -チロシナーゼによる L-チロシンの分解反応

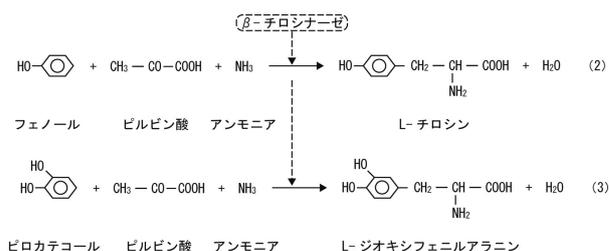


図 8.20 β -チロシナーゼによる L-チロシンと L-ジオキシフェニルアラニンの合成反応

8.4.5 DL-2-アミノチアゾリン-4-カルボン酸ラセマーゼとヒドロラーゼおよび SCC ヒドロラーゼによる DL-ATC から L-システインの合成

L-システインはアミノ酸輸液の成分、肝臓機能改善剤、色素沈着抑制剤、パンの発酵助剤、またこのアセチル誘導体は去痰剤の原料となるなど多くの用途で活用されるアミノ酸である。この製造はシステインの含量の高い原料である毛髪やケラチンを塩酸で加水分解して抽出する方法で行われている。一方、化学合成法によるシステインの中間体である DL-2-アミノチアゾリン-4-カルボン酸 (DL-ATC) を微生物の酵素を用いて不斉加水分解して L-システインを得る方法が味の素社で開発された¹²⁾。得られた酵素生産株、*Pseudomonas thiazolinophilum* は DL-ATC を唯一の N 源として利用して生育できる菌株としてスクリーニングされたもので、図 8.21 に示す反応で L-システインを生成しているが、この反応を触媒する ATC ラセマー

ゼと ATC ヒドロラーゼおよび SCC ヒドロラーゼを持つと推定されている。この酵素反応の工業化は 1982 年から味の素社で行われている。(図 8.21)

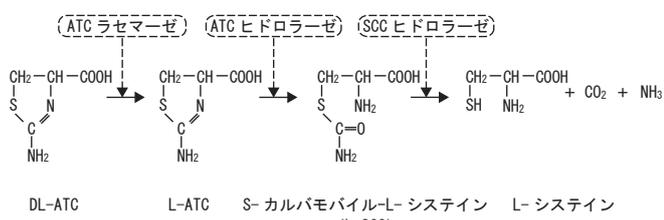


図 8.21 酵素法による DL-ATC から L-システインの合成反応

8.4.6 ヒダントイナーゼと D-カルバミラーゼを用いる D-p-ヒドロキシフェニルグリシンの合成

D-p-ヒドロキシフェニルグリシン (DHPG) は天然のアミノ酸ではなく、半合成ペニシリンであるアモキシシリンを合成する時の修飾剤として開発された D-体アミノ酸である。アモキシシリンの構造式を図 8.22 に示す。アモキシシリンはペニシリン骨格である 6-アミノペニシラン酸の 6 位のアミノ基に DHPG を導入して合成される。DL-体の 5-位置換ヒダントインはアミノ酸化学合成法の中で、これを基質として D-体アミノ酸を特異的に生成する酵素、すなわちヒダントイナーゼを生産する微生物が京大山田秀明らによってスクリーニングされた¹³⁾。

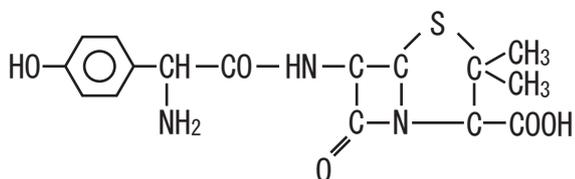


図 8.22 アモキシシリンの構造式

DL-5-(p-ヒドロキシフェニル)ヒダントインを D-N-カルバモイル-p-ヒドロキシフェニルグリシンに変換するヒダントイナーゼの高い活性をもつ *Pseudomonas putida* が選ばれた。次にこの技術を導入したカネカ社では、D-N-カルバモイル-p-ヒドロキシフェニルグリシンを D-p-ヒドロキシフェニルグリシンに変換する酵素、D-カルバミラーゼ、をもつ細菌である *Agrobacterium* sp. をスクリーニングし、この細菌の遺伝子を大腸菌のシステムで発現させ、従来は亜硝酸処理による化学的な方法で行って、副生物が多く収率のよくなかった脱カルバモイルの反応を酵素法に切り変えることに成功した。さらにタンパク質工学的な手法で耐熱性が高く、かつ安定性の高い酵素に改良して、固定化した 2 つの酵素、ヒダントイナーゼと D-カルバミラーゼ、を用いるバイオリクターシ

テムで DHPG の工業生産がシンガポールの工場で行われている。

合成反応の経路を図 8.23 に示す。

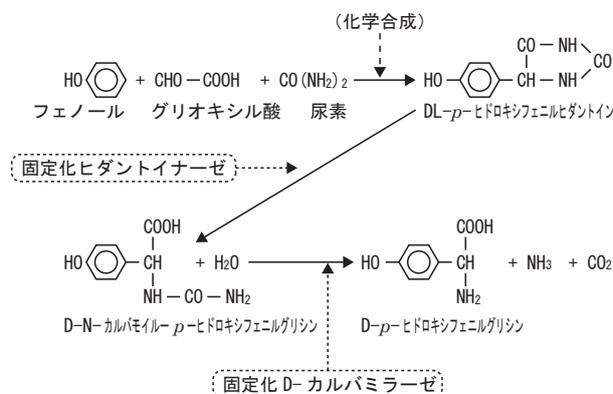


図 8.23 D-p-ヒドロキシフェニルグリシンの合成反応経路

8.4.7 DL-α-アミノ-ε-カプロラクタムラセマーゼとヒドロラーゼを用いる L-リジンの合成

飼料添加物や医薬用に用いられるリジンは動物の栄養に必須のアミノ酸の 1 つであり、現在、日本の技術による発酵法で、フランス、アメリカ、ブラジル、タイ、中国など世界で年間約 80 万トン生産されている大型製品となったが、酵素法による生産も 1980 年代に一時行われた。

東レ社では、ナイロンの原料である DL-α-アミノ-ε-カプロラクタム (以下 ACL) から酵素法によって L-リジンを製造するシステムを開発した¹⁴⁾。反応系は図 8.24 に示すように ACL ラセマーゼを生産する細菌 *Achromobacter obae* と ACL ヒドロラーゼを生産する酵母菌 *Cryptococcus laurentii* を選択し、この 2 つの酵素の組み合わせによって DL-ACL をほぼ定量的に L-リジンに変換する方法である。この方法は宝酒造社と共同で一時工業化されたが現在は行われていない。最終的には立地条件や原料の問題、さらに政策的な判断もあったと推定されるが、トータルとしてのコスト競争力で発酵法に対抗できなかったためである。現時点で工業化は実現できなかったが技術的に新しいので紹介した。

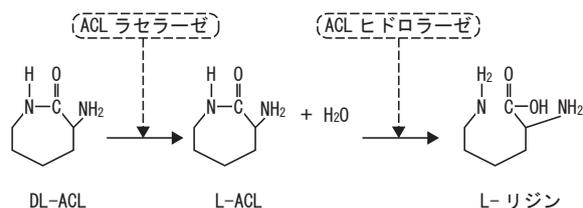


図 8.24 酵素法による DL-α-アミノ-ε-カプロラクタムからの L-リジン合成経路

8.4.8 アスパラギナーゼ

アスパラギナーゼはアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに分解する酵素である

反応式を図 8.25 に示す。1960 年代にモルモット血清中のアスパラギナーゼが急性リンパ性白血病に効果があることが証明された。この作用メカニズムは急性リンパ性白血病の腫瘍細胞がアスパラギンを合成出来ないため、血液中のアスパラギンを分解してその供給を断つことによって腫瘍細胞の増殖を阻止することである。協和発酵社では大腸菌 B 株から得られたアスパラギナーゼ高生産株を、L-グルタミン酸、L-メチオニン、乳酸、コーンステイプリカーなどを含む培地で培養し、菌体から抽出した酵素をクロマトグラフィーなどで精製して結晶化して抗白血病薬として製品化した。しかし、得られた酵素は、人にとっては異種タンパク質であるためアレルギー反応を起こす可能性が高いので、この反応を減らすためポリエチレングリコール (PEG) で化学的に修飾した PEG-アスパラギナーゼも製品化されている。

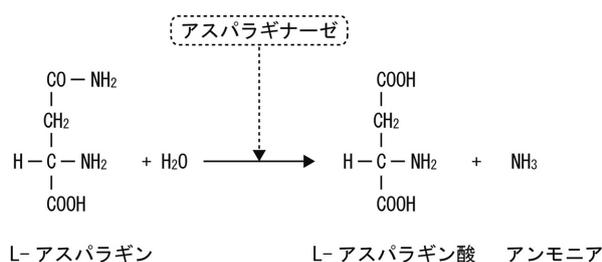


図 8.25 アスパラギナーゼによるアスパラギンの分解反応

8.4.9 グルタミナーゼ

グルタミンをグルタミン酸に変換する酵素である。タンパク質を分解して得られる分解液にはグルタミン酸とほぼ同じ量のグルタミンが存在するが、グルタミンには呈味性がない。グルタミナーゼを作用させてこれを呈味性のあるグルタミン酸に変換できればグルタミン酸含量の高い分解液が得られる。醤油醸造用のカビのグルタミナーゼを高める工夫や、酵素分解液をグルタミナーゼで処理する方法が試みられている。この酵素の生産株は *Aspergillus sojae* などのカビ、*B. subtilis* などの細菌などである。

8.5 核酸関連化合物に関する酵素

核酸と言えば通常は DNA と RNA を指している。核酸に関連する酵素の研究開発は日本で大きな進展が見られたが、そのきっかけとなったものが調味料としてのグルタミン酸ナトリウム (MSG) の事業の成功

であったところがユニークである。つまり、実用的な目的から研究がスタートしたわけである。昆布のうま味成分が池田菊苗によって MSG であることが証明され、実用生産が始められた数年後の 1913 年に、鯉節のうま味成分がイノシン酸であることが小玉によって明らかにされた。しかしながら、その生産についてはまったく手つかずの状態であった。核酸に関する知見、情報がなかった時代としては当然のことである。約 40 年後の昭和 30 (1955) 年頃にヤマサ醤油社の國中明らは、酵母菌の核酸 (RNA) を酵素で分解してイノシン酸を生産する方法を開発した¹⁵⁾。有名なワトソン&クリック (J. Watson & F. Crick) の DNA のラセン構造が発表されたのが 1953 年であり、核酸という用語がまだ一般化していない時代である。さらに、この研究からはイノシン酸ばかりではなくグアニル酸にも呈味性があること、これらと MSG とは強い味の相乗効果を示すという重要な発見がなされ、複合調味料の実用生産という大きな実績を残すとともに、この研究から多くの新しいインパクトのある事実が明らかにされてきた重要なものであった。國中はこれらの成果によって学士院賞を受賞している。

核酸に関連する酵素で有効に活用されているものを大まかに分類すると

- ① RNA を分解してヌクレオチドやヌクレオシド、あるいは塩基を生産するもの
 - ②ヌクレオシドの糖を他の糖に変換するもの
 - ③イノシン、グアノシンのようなヌクレオシドをリン酸化してイノシン酸、およびグアニル酸のようなヌクレオチドに変換するもの
 - ④ DNA を特定の位置で切断する制限酵素、DNA を合成するポリメラーゼや逆転写酵素など遺伝子工学技術の操作に使用されるものである。
- ①で得られたヌクレオチドは上記のうま味調味料の材料として使用された。
- ②で得られるヌクレオシドは制がん剤や抗ウイルス剤などの医薬品、あるいはこれを原料として誘導体が合成されている。③に属するものはイノシン酸、およびグアニル酸の実用生産に使用されている。④に属するものは、いわゆる研究用の試薬で、これらの酵素は DNA の切断や合成などに使用され、機能と性質はまったく異なるものであるが、遺伝子工学技術という操作に使用されるということで、一括してここに記すことにした。呼び方は研究用酵素とは言われているが、すでに産業として実用化あるいは工業化されているものが多数に上っており、これらの酵素は小さな効果で莫大な威力を発揮している。

8.5.1 ヌクレアーゼ P1 (ホスホジエステラーゼ)

RNA を分解してヌクレオチド (アデニル酸, グアニル酸, シチジル酸, ウリジル酸) を生成する酵素である。この酵素は上に記した通り、イノシン酸の製造を目的にして開発された酵素である。やや前後するが、核酸系物質が呈味性を示すには、化学構造の上から3つの条件があることが示されていた。1) 骨格がプリン環であること、2) プリン環の6位の炭素に水酸基をもつこと、3) リボースの5'の水酸基にリン酸基をもつことである。イノシン酸には図 8.26 に示すように、リボースの2'、3'、5'の位置にリン酸基をもつ3つの異性体が存在するが、これらのうち2'、3'には呈味性がなく、5'イノシン酸が呈味性発現の条件を満たしている。(さらに、5'-グアニル酸もこの条件に合っていることが確認された)。

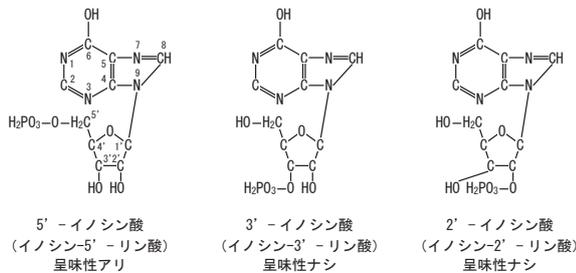


図 8.26 イノシン酸の3つの異性体と呈味性の関係

RNA を分解して目的のヌクレオチドを得るためには、タンパク質を酸で分解してグルタミン酸を得た、というような比較的単純なプロセスでは不可能で、タンパク質よりも複雑な RNA の構造に対応した“ソフトタッチ”の操作が必要なのであった。こうして図 8.27 に示す RNA の構造と対応する分解法を見ると、3'ではなく、5'の位置にリン酸基を残して切断するという条件を満たさなければならなかった。酵素の基質特異性が発揮される反応の例である。

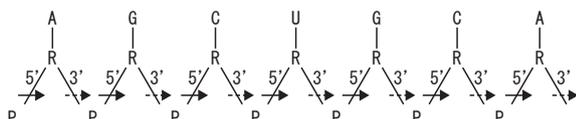


図 8.27 RNA の構造とヌクレアーゼ P1 による RNA の分解

A: アデニン, G: グアニン, C: シトシン, U: ウラシル,
R: リボース, P: リン酸

分解酵素が実線矢印 (→) の箇所では切断すれば、3'-の位置にリン酸基をもつ3'-ヌクレオチドが生成するが、点線矢印 (⇨) の箇所では切断すれば5'-の位置にリン酸基をもつ5'-ヌクレオチドが生成する。呈味性をもつ5'-グアニル酸、5'-イノシン酸を得るためには後者の活性をもつヌクレアーゼ P1 (5'-ホスホジエステラーゼ) が必要であることを示す。

前記のとおり、ヤマサ醤油社の國中からは *Penicillium citrinum* から、武田薬品社の緒方からは *Streptomyces aureus* がこの酵素を生産することを示し、酵母菌から得られる RNA に上記の酵素を作用させ、この分解生成物 5'-アデニル酸、5'-グアニル酸、5'-シチジル酸、5'-ウリジル酸の中から、5'-アデニル酸は麹菌から得られる AMP デアミナーゼで処理して (*S. aureus* はもともとこの酵素を持っているのでこの処理操作は無用) イノシン酸、とグアニル酸を製造する技術を確認した。副生するシチジル酸とウリジル酸は、当時は無用の生産物であったが後に用途開発が行われた。このようにして、前記のイノシン酸、グアニル酸と MSG との呈味性の相乗効果に基づきイノシン酸、グアニル酸と MSG を成分とする複合調味料がヤマサ醤油社からは「フレーブ」、武田薬品社からは「いの一歩」として 1961 年に発売された。味の素社からは当初は煮干しからの抽出法、後に発酵法による製法を確立して「ハイミー」として発売された。

現在イノシン酸とグアニル酸の世界の生産量は約 8~9 千トンに達したと推定されているが、現在の製法は、発酵法によってイノシン、グアノシンを生産し、それぞれ酵素法または化学法でリン酸化して行うものであり、上に記した酵素による RNA 分解法は行われていない。しかし、酵素法は核酸生産の端緒を開き、さまざまな酵素技術の展開の可能性を示した歴史的な意義は大きいので紹介した。

8.5.2 イノシン、グアノシンをリン酸化する酵素

発酵法によるイノシン酸とグアニル酸の大量生産は成功していないが、リン酸のないヌクレオチド、つまりイノシンとグアノシンの大量生産が成功した。したがって、このイノシン、グアノシンを酵素法でリン酸化する方法が最近確立された。このリン酸化に2つの酵素が応用されている。味の素社で開発されたホスファターゼと協和発酵社で開発されたイノシンキナーゼである。

(1) ホスファターゼ

この酵素はリン酸基をもつ化合物に水が供与体となってリン酸を放出する酵素であるが、ピロリン酸も供与体として認識できるのでリン酸化の反応を触媒することも可能である。味の素社ではイノシンの5'位の水酸基に特異的にリン酸を導入して5'-イノシン酸に変換する酵素の生産株として *Morganella morganii* を選出した。しかしこのホスファターゼの本来の反応は5'-イノシン酸を分解するものであるため、改良が必要であった。そこで、この酵素をコー

ドする遺伝子を単離して、酵素タンパク質にランダムなアミノ酸置換を行ったところ、得られた新しい酵素 (Gly92Asp, Ile171Thr) は逆反応が小さくなっていることがわかった。この遺伝子を *E. coli* で生産して分解反応の少ない酵素の構築とともに工業化にも成功したものである。

この酵素はイノシンだけではなく、グアノシンのリン酸化も出来るので、イノシン酸、グアニル酸の実用生産に活用されている。反応式を図 8.28 に示した。

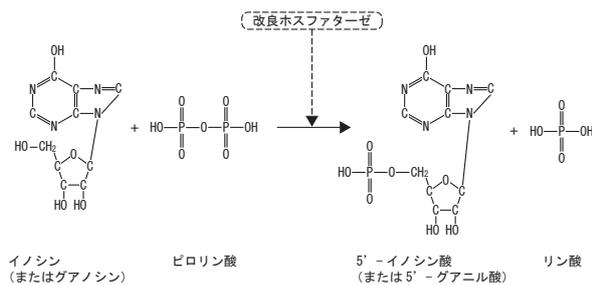


図 8.28 改良ホスファターゼを用いるイノシン (グアシン) のリン酸化による 5'-イノシン酸 (5'-グアニル酸) の生成反応

(2) イノシンキナーゼ

この酵素は ATP をリン酸の供与体としてイノシンにリン酸を導入して 5'-イノシン酸を生成する酵素であるが、協和発酵社では *E. coli* の酵素の発現を高め、*Corynebacterium ammoniagenes* のイノシン生産と、同菌の ATP の再生系を組み合わせることで 5'-イノシン酸の生産システムを確立した (図 8.29)。ただ、実用生産まで行われているかどうかは明らかではない。

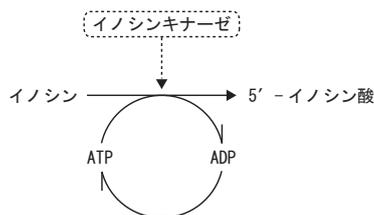


図 8.29 イノシンキナーゼと ATP 再生系を利用したイノシンのリン酸化反応

8.5.3 グアニル酸合成酵素 (GMP synthetase)

この酵素は次の反応式にしたがって、ATP のエネルギーを使って、キサンチル酸にアミノ基を導入してグアニル酸に変換する酵素である。

協和発酵社では *C. ammoniagenes* のグアニン要求株を用いてキサンチル酸を作り、*E. coli* のグアニル酸合成酵素遺伝子を増幅し、*C. ammoniagenes* の ATP 再生系を組み合わせることでグアニル酸を製造するプロセス

の構築を達成している (図 8.30)。この場合、グアニル酸の細胞外への透過性を上げるために、界面活性剤が溶媒が必要である。

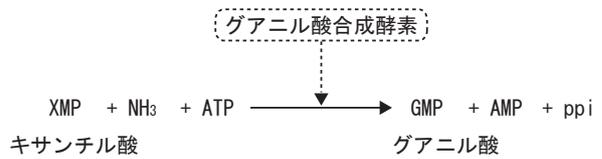


図 8.30 グアニル酸合成酵素によるキサンチル酸からのグアニル酸の生成反応

8.5.4 ヌクレオシドの糖を変換する酵素

核酸の誘導体はしばしば抗ウイルス剤や抗ガン剤として有用な化合物である。作用メカニズムはこれらの誘導体が本来の核酸のアナログとして働き、機能を阻害することによってガンやウイルスの増殖を阻害することである。

アデニンアラビノシド (Ara-A) は *S. antibioticus* の培養液から見出されたヘルペス脳炎や帯状疱疹などのウイルス性疾患に有効な抗ウイルス剤であるが、発酵法では生産量が低く、化学合成と酵素法の組み合わせで効率的な生産法が開発された。合成ルートを図 8.31 に示す。すなわち、化学合成されたウリシルアラビノシドのアラビノースをアデニンに転移する酵素がウリジンホスホリラーゼ (UPase) とプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNPase) である。

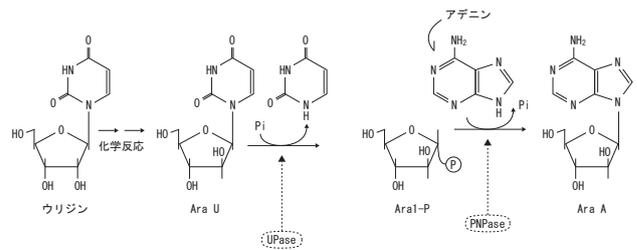


図 8.31 酵素法によるアデニンアラビノシド (Ara-A) の合成経路

ジデオキシイノシン (DDI) は抗エイズ薬として使用されているが、DDI の合成ルートを図 8.32 に示す。すなわち、ウリジンから化学合成されたジデオキシウリジン (DDU) のジデオキシリボースをヒポキサンチンに転移させて DDI を生産するものである。さらにアデノシンを化学的にジデオキシアデノシンに変換し、これを酵素で DDI に変換する改良法が開発されている。Ara-A と DDI は味の素社で開発され工業化されている。酵素の高い生産株は前者は *Enterobacter aerogenes*、後者は *E. coli* から得られている。実用生産の反応は酵素生産菌体、あるいは固定化した菌

体が用いられている。

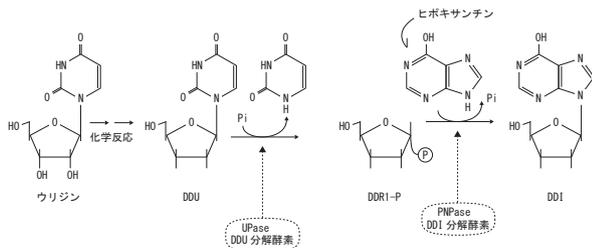


図 8.32 酵素法によるジデオキシシチン (DDI) の合成経路

8.5.5 遺伝子工学に関連する酵素

遺伝子工学技術の生命科学とその応用技術に与えたインパクトは計り知れない大きさである。たとえば、この技術によって得られた成果の例として、ヒトを含めた生物のゲノム解析、ガン遺伝子の同定や解明、タンパク質や酵素、ホルモンの生産や改良、遺伝子組換え作物の創生などのように、非常に幅広い分野の研究の展開に活用され大きな成果が上げられているのは周知の通りである。

遺伝子工学技術を最も簡単に表現すれば、遺伝子 DNA の調製、切断、単離、接続、塩基配列の解析、増幅などから得られた知見と情報を駆使した生命現象の解明と有用技術の開発や有用物質の生産、と言えるだろう。これらの技術の大部分に酵素技術が関与している、まさに酵素技術の集合が遺伝子工学であるといっても過言ではない。関連する酵素類は多数にのぼり、また多岐にわたっているので、すべてを記すことは出来ない、ここでは制限酵素、DNA の増幅に関する酵素、および逆転写酵素に限定して記載することにする。詳細は要領よくまとめられた文献を参考としてあげておく¹⁶⁾。

(1) 制限酵素

制限酵素は DNA を特定の位置を認識してこれを切断する酵素で、“DNA を切り出すハサミ” に例えて説明される。この発見は遺伝子工学誕生のきっかけとなった重要な酵素である。この酵素は細菌など、原核生物がもっている酵素で、自然界では外来の DNA の特定の塩基配列を認識して切断する。このことは自己の DNA への外来 DNA の侵入と混入を制限している、つまり、固有生物の“種”を保存するメカニズムと考えられる。この制限が名前の由来である。ただ、自己の DNA にも同じ配列があるはずで、これを切断しては都合が悪いので、きちんと防止する機構も備えている。メチラーゼという酵素をもち、その配列の中にあるシトシンとアデニン残基にメチル基を導入して分解されないように構造を変換しているのである。

制限酵素には反応に必要な成分の要求性などの違いから、I-III のタイプが知られているが、遺伝子工学に使用されるのはタイプ II である。

この酵素には酵素の発見者スミス (H. O. Smith、1978 年のノーベル賞受賞者) らの提案で、独特の命名法がとられている。制限酵素を生産する菌株の属名のイニシアル 1 字と種名のイニシアル 2 字をイタリック体で表し、さらに付随する性質などをナンバーで表示する。たとえば、*Bacillus amyloliquefaciens* H 株が生産する酵素は *Bam*HI、*Escherichia coli* RY13 株が生産する制限酵素は *Eco*RI である。表 8.3 には代表的ないくつかの制限酵素の生産株と認識する塩基配列を示す。

表 8.3 制限酵素の生産株と認識する塩基配列の例

制限酵素	生産株	認識し切断する塩基配列 (↓:切断箇所)
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G ↓ GATCC (6 塩基認識酵素)。
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	G ↓ AATTC (")。
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A ↓ AGCTT (")。
<i>Sau</i> 3a	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	↓ GATC (4 塩基認識酵素)。

制限酵素の基質特異性が極めて高いことが特徴である。たとえば、*Hind*III で処理すると DNA は下のようになり切断される。切断の結果、酵素によって一定の塩基配列 (-TCGA) をもつ一本鎖部分 (粘着末端) ができるので、同じ *Hind*III で切断した他の DNA の断片をここに当てはめることによって、そっくり挿入が可能となり、さらにリン酸の結合を導入するリガーゼを働かせると、完全に DNA を組換えることができる (図 8.33)。

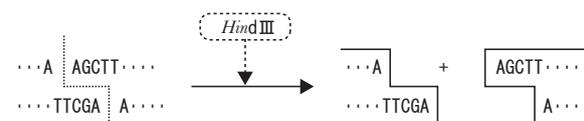


図 8.33 制限酵素 (*Hind*III) による DNA の切断

つまり組換え体 DNA であり、これが遺伝子工学技術の基本反応である (図 8.34 参照)。

制限酵素の数は細菌の種類に対応した数が存在するはずで、1998 年時点で報告されているものが 3,000 以上あり、そのうち遺伝子工学に使用されるものが約 500、切断の配列が異なるもの 143 種が試薬メーカーから販売されている。

この酵素は菌体内酵素なので、菌体を破碎して得られた菌液から硫酸沈澱法などでタンパク質を沈殿させて回収し、クロマトグラフィーを組み合わせて精製し

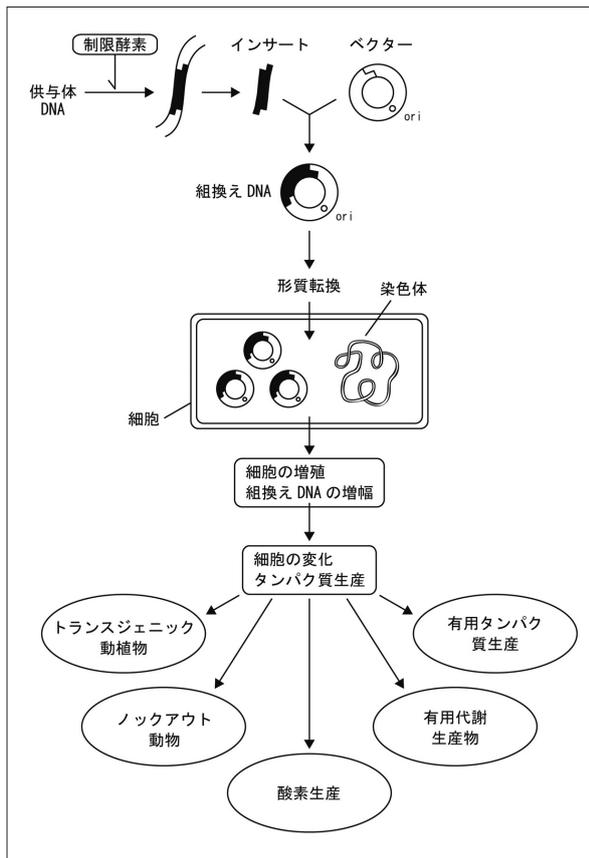


図 8.34 組換え DNA システムの概略図

て作る。また遺伝子工学の手法でタンパク質を増やして生産性を高める方法が一般的に取られている。遺伝子工学の技術が確立された当初には 1ml にも満たない量の制限酵素液が数万円もする高価なものであったが、メーカーの努力によって格段に安く得られるようになった。このように、現在では酵素自体の金額は大きなものではなく、また使用量も μ 1 レベルという微量であるため市場も大きくはないが、その波及効果の大きさを考えると、酵素の威力の大きさに改めて驚かされる。

制限酵素で切断された DNA はどのように処理されるかを知るために、組換え DNA (= 遺伝子操作) のシステムを簡単に示す略図を図 8.34 に示した。

(2) DNA ポリメラーゼ

この酵素は DNA の 4 つの素材となるヌクレオチド、すなわち、デオキシ ATP, GTP, CTP および TTP を、相方の 1 本鎖 DNA の配列に対応して重合して DNA を合成する酵素である。この酵素の革命的な応用をもたらしたのが PCR (polymerase chain reaction、ポリメラーゼ連鎖反応) である。PCR は広い分野で使用される重要な技術となった。たとえば、身近な例を上げれば、犯罪捜査や遺跡などから得られる痕跡程度の微量の材料から DNA 鑑定が行われるが、鑑定に使用される DNA

は PCR によって増幅されているのである。

この DNA ポリメラーゼは DNA の素材となる 4 つのヌクレオチドと鋳型となる DNA およびプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチド、の存在下で DNA を合成するが、PCR では生成する DNA を直ちに次の合成反応に繰り返して使用し、指数函数的に DNA を増幅させる技術である。これを開発したマリス (K. B. Mullis) は 1993 年にノーベル化学賞を受けている。PCR のメカニズムを簡単に図 8.35 に説明する。

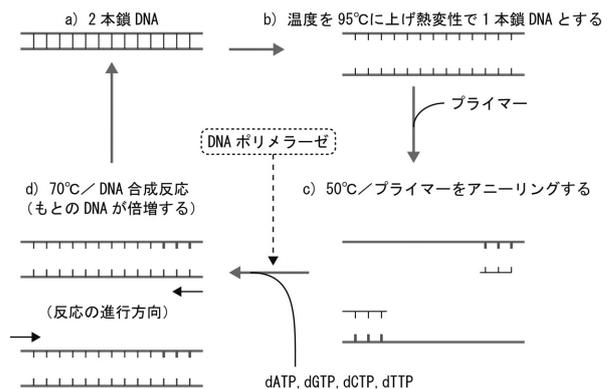


図 8.35 PCR の原理

まず a) では材料となる (微量の) 鋳型となる 2 本鎖の DNA があり、次に (b) では、この DNA を含む溶液を 95°C に加温して 2 本鎖 DNA を 2 つの 1 本鎖 DNA に分離する。(c) 次に溶液の温度を 50°C に下げてプライマーをそれぞれの 1 本鎖 DNA の 5' の端に付ける (アニーリング)。プライマーは何種類かを準備して、結果的にマッチングするものが選ばれる。(d) 次に溶液の温度を 70°C に加温して DNA ポリメラーゼを働かせる。鋳型 DNA の配列順序に対応してヌクレオチドが順次運ばれ、矢印の方向に重合してゆく。このようにして a → b → c → d を 1 サイクルすることにより DNA は 2 倍になり、n サイクルで 2^n となる。

実際の PCR の操作は ① DNA ポリメラーゼ、② 鋳型 DNA、③ プライマー、④ dATP, dGTP, dCTP, dTTP の 4 つのヌクレオチド、⑤ その他の補助因子を混合した反応液を調製しておいて、温度を 95 → 50 → 70 → 95°C に連続的に変えるだけで、DNA は 2^n 単位で増えるので、20-30 サイクルの運転で電気泳動によって検出できる量の DNA に増幅することができる。このシステムのポイントのひとつは、95°C の高温に耐える耐熱性のポリメラーゼが使用されたことである。75°C で生育できる *Thermus aquaticus* から得られた TaqDNA ポリメラーゼである。

また、この理屈から、特定の変異を導入した遺伝子や、特定の制限酵素の認識部位を導入したような遺伝

子なども製作することも可能であり、極めて応用範囲の広い技術であることが理解されるであろう。この酵素も実験に使用される量はごく微量で、試薬として多くのメーカーから販売されているが、市場が大きな商品ではない。しかし、制限酵素の場合と同様に、この酵素を使用して確立される技術や製品の規模を考えると、酵素が果たしている役割が甚だ大きなものであることも理解されるであろう。

(3) 逆転写酵素

遺伝子の情報は DNA → RNA → タンパク質の流れで発現する、いわゆるセントラルドグマ、であるが、例外がある。つまり、ウイルスの中には RNA ウイルスと呼ばれ、DNA ではなく RNA をゲノム遺伝子とするものがある。これらのウイルスでは RNA を鋳型として DNA を合成する、つまり RNA → DNA の流れが存在するわけである。この RNA → DNA の反応を触媒する酵素が逆転写酵素である。

真核生物の遺伝子を得ようとする場合、ゲノムサイズが大きくまた微量であるため直接採取することは非常にむつかしく、また真核生物の DNA には転写されない領域（イントロン）が存在するので、転写される領域（エキソン）を、比較的調製が容易な RNA を採取して、逆転写酵素を使用して cDNA（相補 DNA）を調製する方法がとられる。逆転写酵素はレトロウイルス、マウス白血病ウイルス、好熱性細菌（*Thermus thermophilus*）由来のものが市販されている。因みに抗エイズウイルス薬であるアジドチミジン（AZT）やジデオキシイノシン（DDI）は逆転写酵素の阻害剤である。

8.6 脂質関連酵素

8.6.1 リパーゼ

リパーゼは脂肪を脂肪酸とグリセリンに分解する酵素である。反応式は図 8.36 に示す通りである。

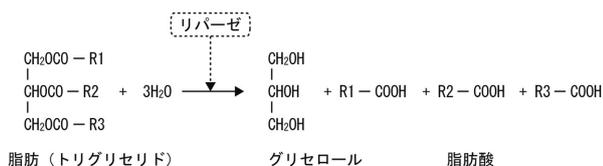


図 8.36 リパーゼによる脂肪の分解反応

リパーゼの生産株は *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* 属などのカビ、*Candida* 属の酵母菌、*Pseudomonas* などの細菌、など微生物界に広く分布している。カビによる生産はフスマ固体培養で、酵母菌や細菌では液

体培養が行われている。

リパーゼの用途は油脂や乳製品の加工、消化薬、臨床検査薬、また *Humicola* のリパーゼが遺伝子工学的に *Asp. oryzae* で高生産され洗剤用として開発された。油の分解ではたとえば日本製紙社で行われている、パルプの樹脂（ピッチ）除去にリパーゼが活用されている例などがある。

またリパーゼによる図 8.37 に示すような反応によってエステル交換が行われる。この反応の応用として、低い融点をもつ安価なヤシ油から、高い融点のチョコレート用のカカオ油脂を作るプロセスが開発されている。また、マグロ油に含まれるドコサヘキサエン酸（DHA：抗動脈硬化作用、抗高脂血症作用が知られている）の含量は 20-25% であるが、DHA を認識しにくい *Candida rugosa* 由来のリパーゼで処理することによって DHA 含量が 50% に向上した油脂が得られる。

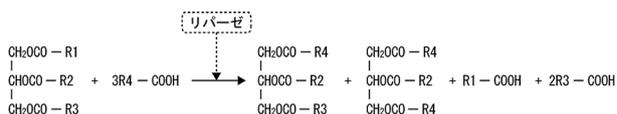


図 8.37 リパーゼによるエステル交換反応

その他のリパーゼの利用として天然油脂の分解、フレーバの改良、洗剤、臨床分析などがある。一方田辺製薬（現田辺三菱製薬）社では *Serratia marcescens* 由来のリパーゼの特徴を生かして有機溶媒中の反応でジルチアゼム「ヘルベッサ」の中間体の光学分割の工程に活用されている。

8.7 セルラーゼ

セルロースはグルコースが β -1,4-グルコシド結合でつながった天然の高分子化合物であり、この結合を切る酵素がセルラーゼである。3つの切り方があり、両末端から順次加水分解してグルコースが2分子のセロビオースを生成するエキソセルラーゼ、グルコース単位で切り出す β -グルコシダーゼ、セルロース繊維の中ほどを切断してセロオリゴ糖を生成するエンドセルラーゼである。同じグルコースの重合体でも α -1,4結合でつながったデンプン由来のアミロースは容易に分解されるのに対して、 β -1,4結合のセルロースは分解に相当な長時間を要する。図 8.38 には比較のためにセルロースとアミロースの構造式を示す。

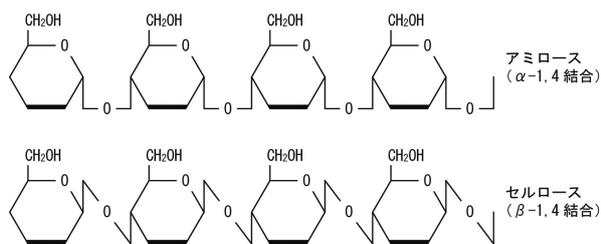


図 8.38 アミロースとセルロースの化学構造

酵素による糖化を主な目的としてセルラーゼの研究は長年行われてきたが、セルラーゼによる天然のセルロース分解は未だ達成されていない。もっとも、もしもセルロース分解が簡単に可能になれば、材木などの木製品が簡単に壊れ、草木類は倒れ、文字通り自然破壊につながる可能性が大きいわけで、“神様が創られた天然物が”簡単に壊されることはないのかも知れない。セルロースの結晶構造を破壊するための強酸などによる前処理が必要とされている。セルラーゼは再生可能な資源としてのバイオマスの活用には必須の酵素である。これまで糸状菌 *Tricoderma viride*, (*T. reesei*) などの生産するセルラーゼが主に使用された。

一方セルラーゼの新たな用途の開発が行われた。その一つが洗剤用セルラーゼである。

ノボルディスク社による *Humicola insolens*、花王社の好アルカリ *Bacillus* sp. によるアルカリセルラーゼである。衣料の 9 割は木綿製品が占めるが、木綿の汚れは繊維の内部に侵入している。アルカリセルラーゼはこの領域に作用して分解し、汚れを放出して洗たく効果を高めると説明されている。洗剤用酵素の中ではセルラーゼの割合が最も大きくなった。

そのほかに、牧草にセルラーゼを添加することによって糖分が増え、乳酸発酵が進んでサイレージに品質が向上したり、ふすまにセルラーゼを添加することによって消化吸収率が向上した報告がある。繊維生地の改良にセルラーゼが活用されている。柔軟性ととも表面の毛羽の除去による光沢の向上や、G パンの洗い加工がストーンウオッシュからバイオウオッシュに変わりつつあると言われている。

8.8 臨床分析（診断）用酵素

酵素反応を臨床分析に応用するには次の 3 つの方法があるが、本報告で扱うのは 3) である。

- 1) 血清や尿などの体液中の酵素活性の増減から病態を間接的に診断する
- 2) 生体組織検査法などにより組織から材料を取

り、組織の酵素活性の変化から診断する。

- 3) 酵素を用いて生体成分を測定する。

8.8.1 コレステロールオキシダーゼ

高脂血症の診断にコレステロールが測定される。図 8.39 に示す反応式によって、(1) まずコレステロールエステルをコレステロールエステラーゼで遊離のコレステロールとし、(2) コレステロールオキシダーゼによってコレステロールを酸化し、(3) 生成する過酸化水素のパーオキシダーゼによる酸化によって還元型色素(4-アミノフェナジンなど)の酸化型色素(キノニンイミン)への変換による吸光度の変化で測定する。

この反応に使用されるコレステロールエステラーゼは *Pseudomonas fluorescens* から、コレステロールオキシダーゼは *Brevibacterium sterolicum* や *Nocardia* sp. から得られる。パーオキシダーゼはセイヨウワサビから得られるが、最近、ヒトヨタケ属のキノコ (*Coprinus cinereus*) のパーオキシダーゼ遺伝子を *A. oryzae* で発現させて生産した酵素(商品名カードザイム)も市販されている。

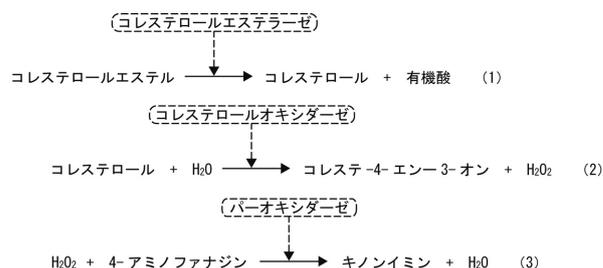


図 8.39 酵素によるコレステロールの分解と定量反応

8.8.2 グルコースオキシダーゼ

血糖値の測定に使用される。詳細は 8.2.5 に記した通りである。

8.8.3 ウリカーゼ(尿酸酸化酵素)

尿酸はプリン代謝の最終産物で、血液、尿中の尿酸の定量は痛風の診断に使用される。ウリカーゼは次の反応を触媒する。尿酸と、反応によって生成するアラントインとの吸光度の差を利用して測定するか、過酸化水素をパーオキシダーゼと共役して測定する。反応系を図 8.40 に示す。

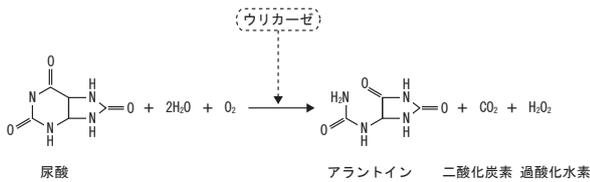


図 8.40 ウリカーゼによる尿酸の分解反応

ウリカーゼの生産株は *Bacillus* 属細菌が知られている。この遺伝子を大腸菌で発現させても生産されている。

8.8.4 中性脂肪

血液中の中性脂肪は生活習慣病の領域の中の重要な検査項目である。測定法はいくつかあるが、その一つは中性脂肪をリパーゼ (8.6.1) で分解し、生成するグリセロールをグリセロールキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼと反応させて、NADH の吸光度の変化で測定するものである (図 8.41)。

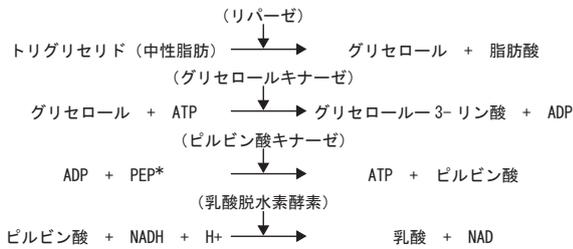


図 8.41 酵素の組合わせによる中性脂肪の定量反応

もうひとつの酵素は同様に生成するグリセロールをグリセロールオキシダーゼで、次の反応によって生成する過酸化水素を定量する方法である (図 8.42)。

グリセロールオキシダーゼは *Aspergillus japonicus* が生産する。

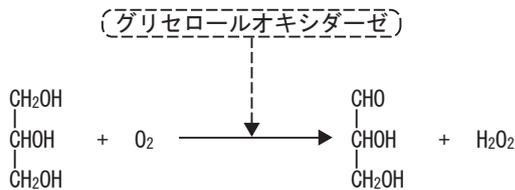


図 8.42 グリセロールオキシダーゼによるグリセロールの分解反応

8.8.5 クレアチニン定量用酵素

血清中のクレアチニンの含量は腎臓機能の診断に用いられる。 *Pseudomonas putida* のクレアチナーゼなどを組み合わせた方法と *Corynebacterium lilium* が作るクレアチンデイミナーゼを作用させて、生成する NH_3 をグルタミン酸デヒドロゲナーゼと共役させて NADH の変化で測定する方法がある (図 8.43)。

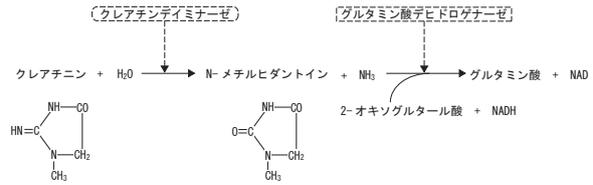


図 8.43 酵素法によるクレアチニンの定量反応

8.8.6 ポリアミン定量用酵素

ガン患者の尿中のポリアミン濃度が異常に高いことからガンとの相関性が調べられている。プトレッシン、スペルミン、スペルミジンなど、それぞれのオキシダーゼ (酸化酵素) が見だし、反応の結果対応するアルデヒドとともに生成する過酸化水素を定量する。

8.8.7 シアル酸定量用酵素

炎症性の疾患やガン患者の血清中のシアル酸 (糖脂質、糖たんぱく質の一種) 含量が高いことから、これらの診断やモニタリングに使用されている。

8.9 抗生物質の生産に使用される酵素

8.9.1 ペニシリンアミダーゼ

1929 年にフレミング (A. Fleming) によって発見されたペニシリンをはじめとして、多くの抗生物質が発見、開発され、第 2 次大戦後多くの感染症の治療に絶大な威力を発揮した。しかし今日では耐性菌の出現などが問題となっていることはよく知られているところである。

抗生物質の生産に使用される酵素にペニシリンアミダーゼがある。この酵素はわが国の村尾、坂口が初めて見出した酵素で、次の反応を触媒する (図 8.44)。

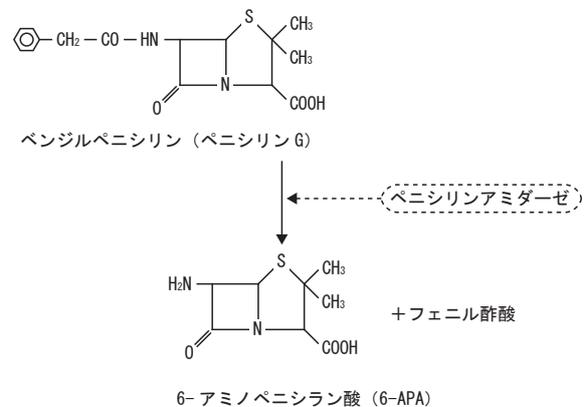


図 8.44 ペニシリンアミダーゼによるベンジルペニシリンの分解反応

ペニシリンアミダーゼの生産株は *Bacillus megaterium* や *E. coli* が知られている。反応は *Penicillium chrysogenum* (の変異株) によって生産されるベンジルペニシリン (ペニシリン G) の 6 位の

アミド結合を分解して6-アミノペニシラン酸(6-APA)とフェニル酢酸に変換する。ここで得られる6-APAは、6位のアミノ基、あるいは3-位のカルボキシル基に各種の官能基を導入して、半合成ペニシリンの原料となる化合物で、ペニシリンの母核と呼ばれている。世界の推定生産量は約5,000トンである。わが国では1973年に旭化成社で*B. megaterium*から得られた酵素を、多孔性のポリアクリロニトリル繊維にグルタルアルデヒドで固定化したバイオリアクターによる連続生産が行われている。

6-APAを原料として、より望ましい性質を持つ誘導体が合成されている。たとえば、経口投与が可能なアンピシリン、さらに有効な菌株の範囲を示す抗菌スペクトルの広いアモキシシリン、耐性菌に有効なメチシリンなど、多くの改良製品となった。しかし、一時的な効果は示されても、いずれも程なく新たな耐性菌が出現し、いわゆる“新薬と耐性菌のイタチの追っかけごっこ”となり、抜本的な対応策は見出されていないこともよく知られている。なお、耐性菌が耐性を獲得するメカニズムはいろいろ考えられるが、最もよく知られているのは、耐性菌はペニシリナーゼ(β-ラクタマーゼ)を作る能力を獲得してβ-ラクタム環を開裂して無毒化するためである。

8.9.2 セファロスポリンアミダーゼ

ペニシリンと同様なβ-ラクタム環をもつ抗生物質で、一般的にペニシリンよりも効果が優れ、安全性も高いとされている抗生物質にセファロスポリンがある。*Cephalosporium acremonium*が生産するセファロスポリンCを原料にして母核となる7-アミノセファロスポラン酸(7-ACA)が作られる。7-ACAから各種のセファロスポリン誘導体が合成されている。7-ACAは以前にはセファロスポリンCから数段階の化学的処理と酵素反応で得られていたが、*Pseudomonas* sp. から新しいアミダーゼが発見され1段階の反応で7-ACAが得られるようになった¹⁷⁾。反応式を図8.45に示す。

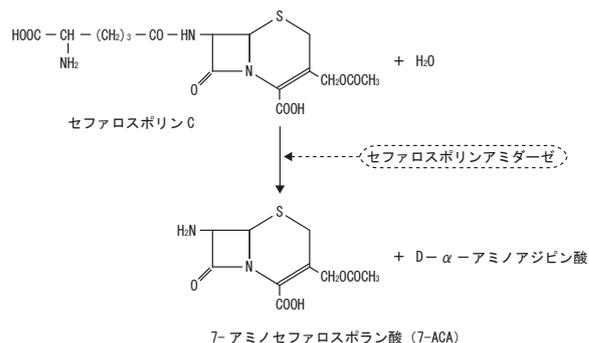


図 8.45 セファロスポリンCからの7-ACAの生成反応

8.10 有用化学品の合成に使用される酵素

8.10.1 ニトリルヒドラーゼを用いるアクリルアミドの生産

アクリルアミドはビニル系ポリマーの原料で世界では約20万トンの市場がある。京都大学の山田秀明らはアクリロニトリルをアクリルアミドに変換する新しい酵素、ニトリルヒドラーゼを見出し、この酵素の生産株として*Pseudomonas chlororaphis*, さらに活性の高い*Rhodococcus rhodochrous*を分離した¹⁸⁾。これらの培養菌体を酵素源として、基質アクリロニトリルをフィード法で加え、pH7.5、約10°C、7-10時間の反応で、ほぼ定量的にアクリルアミドに変換され、濃度650g/Lが得られることを示した。反応系を図8.46に示す。これらの菌株は生成したアクリルアミドを分解してアクリル酸に変換するアミダーゼの活性が弱いものが選ばれている。

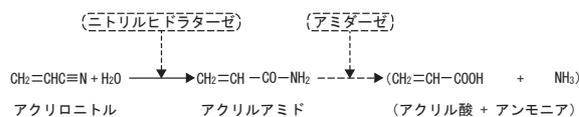


図 8.46 酵素によるアクリロニトリルの変換経路

この実験結果は日東化学工業(現三菱レイヨン)で1991年に工業化され、年間約3万トンのアクリルアミドが生産されている。また三菱レイヨンからライセンスを受けたフランスのSNF社はフランス、アメリカ、中国で生産を行っていると言う。アクリルアミドのようないわゆるコモデティケミカルも生化学的なプロセスで生産されることが示された。

従来の化学合成法では銅、クロムなどの金属系触媒を用いる水和法で行われていたが、触媒の調製が煩雑であり、金属触媒による環境汚染の可能性、高温高圧の反応による高いエネルギー消費などの問題点があっ

たが、酵素法はこれらの問題点の多くを解決した。因みにアクリルアミドの銅触媒法と酵素法の製法における、生産物アクリルアミド当たりのエネルギー消費量と二酸化炭素の排出量の原単位で比較すると、電力や蒸気量などのエネルギーが約30%、二酸化炭素の排出量で約40%削減されるとされている¹⁹⁾。

このように、現在の化学品の大部分は石油や天然ガスを原料として高温高圧の多段階のエネルギー消費型の化学合成反応で行われ、場合によってはハロゲンなどの有害とされる溶媒が使用される。これに対して、省エネルギー、廃棄物削減、環境汚染と温暖化防止を目的とした、いわゆるグリーンケミストリーへの取り組みが世界的に行われている。その手法の一つが酵素の利用を中心とするバイオプロセスであり、これを実証したニトリルヒドラーゼの活用によるアクリルアミドの生産は重要な発見であり重要な技術である。

そのほかアメリカのデュポン社ではプラスチックの原料となる1,3-プロパンジオールをグルコースから、同じくカーギル社では生分解性プラスチックの原料となるL-乳酸の大量供給など、化学プロセスからバイオプロセスへの変換、つまり石油化学工業からの脱却が計画されている。

8.10.2 ニトリルヒドラーゼを用いるニコチン酸アミドの生産

ニコチン酸アミドは、ニコチン酸とともにナイアシンとも呼ばれる水溶性ビタミンであり、生体内ではNAD、NADP（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）などに変換され、脱水素酵素類の補酵素となって酸化還元反応に大きな役割を果たしている。医薬品や栄養剤として使用される。山田秀明らによって*Rhodococcus rhodochrous* 由来のニトリルヒドラーゼを用いる反応の一つとして、次の反応式による高収率でニコチン酸アミドが生産されることが示された²⁰⁾。反応式を図8.47に示した。

この反応はスイスのロンザ社によって1998年中国で工業化され3,000トン規模の生産が行われている。

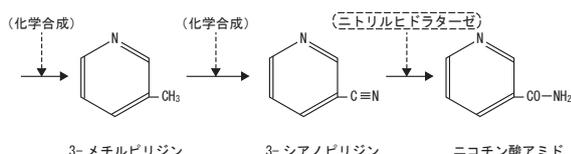


図8.47 ニトリルヒドラーゼによるニコチン酸アミドの生成反応

8.10.3 ラクトノヒドラーゼを用いるD-パントラクトン (D-パントテン酸中間体) の生産

D-パントテン酸は水溶性ビタミンの一つで、生体内ではコエンザイムAの構成成分である。欠乏症として皮膚、副腎、末梢神経、消化管などに障害が起こる。医薬品や飼料添加物として世界で約8,000トンの需要がある。D-パントテン酸の合成経路を図8.48に示す。ポイントになる反応はDL-パントラクトンからD-パント酸を得る光学分割の反応で、従来は煩雑な化学的方法で行われていたが、清水昌、山田秀明らはDL-パントラクトンからD-パント酸を生成するラクトノヒドラーゼを*Fusarium oxysporum*から得て、図8.48に示すルートでD-パントラクトンの製法を開発した²¹⁾。富士薬品工業社はこのフローに固定化酵素を使用する方法で工業化し、1999年から3,000トン/年のD-パントラクトンの生産を行っている。

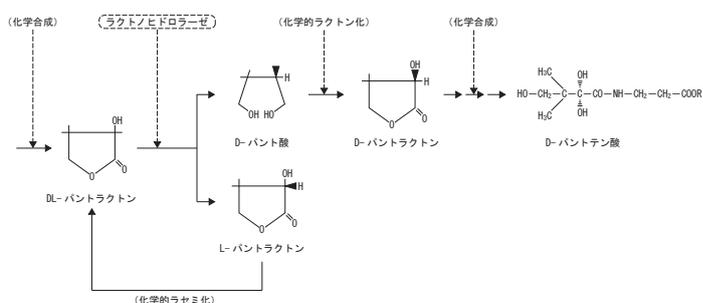


図8.48 ラクトノヒドラーゼによるD-パント酸の生成反応とD-パントテン酸の合成経路

8.11 その他の酵素

8.11.1 カタラーゼ

カタラーゼは過酸化水素を分解して水と酸素を発生する次の反応を触媒する(図8.49)。

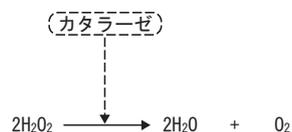


図8.49 カタラーゼによる過酸化水素の分解反応

過酸化水素は繊維加工における漂白、カズノコの漂白など食品加工、ICチップの洗浄など、多くの場所で使用されている。繊維の漂白剤として、酸化系のものには亜塩素酸ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素、還元系のものとしてハイドロサルファイトなどが使用されていたが、塩素系や硫黄系ものは副生物の発生などの問題点が考えられるので、過酸化水

素が環境負荷が最も小さいものとして多用されていた。しかし繊維加工の次の工程である染色の段階で過酸化水素の残存が染色の効率を下げるためにこれを十分に除去する必要がある。水洗を十分に行うことや還元剤で処理する方法が行われていたが、いずれもコストと手間のかかる操作である。カタラーゼ処理が有効であることは分かっていたが、当初は価格が高いため採用されなかった。最近ではカタラーゼが安く供給されるようになって酵素処理が実用化されている。

食品加工の場では、食品衛生法によって過酸化水素の残存量が 30ppm 以下と定められているので、この除去のために従来は水による洗浄、亜硫酸ソーダ、アスコルビン酸による処理などが行われていたが、大量の水が必要、残留性の問題、食品の色の戻りなどの問題点があった。これらの問題点はカタラーゼの使用によって解決された。

IC チップの洗浄は過酸化水素とアンモニア水、過酸化水素と塩酸などで行われている。この排水中の過酸化水素の処理は亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO₄) で行われていたが、この物質の使用による硫酸ナトリウムの生成、酸化硫黄ガスの発生などの問題点があった。これらはカタラーゼの利用によって解決することは予想されていたが、繊維加工の場合と同様にコスト高がネックになっていた。現在ではこの酵素が *A. niger* などを用いて安く生産されるようになり実用的に活用されている。

8.11.2 フィターゼ

この酵素はフィチン酸 (図 8.50) のリン酸を脱離させる酵素である。フィチン酸は穀類、マメ類の有機リンの貯蔵物質で *myo*-イノシトール-6-リン酸である。

問題となる点は、穀類や豆類を飼料として使用する場合のことで、フィチン酸は動物にとって消化されにくく、栄養素としてのリン源とはなりにくく、また腸内でマグネシウムやカルシウムと結合しやすいので、これらミネラルの吸収率が悪くなる場所にある。このため、家畜の飼料にはリン源として無機リン酸塩が加えられているが、しばしば過剰に加えられたリン酸塩は環境中に排出され、河川や湖沼の富栄養化の原因となる。飼料の穀類などを事前にフィターゼで処理しておけばフィチン酸からリン酸が供給され、またミネラルの吸収が向上するわけである。したがって、無機のリン酸塩をわざわざ添加する必要はなくなり、富栄養化は抑えられる。最近では肉骨粉の飼料添加が問題になっており、この点からも需要増加が見込まれている。フィターゼの生産株は協和発酵による

A. niger、ノボルディスク社による遺伝子組換え *A. oryzae* などが知られている。フィターゼによるフィチン酸の分解反応を図 8.50 に示す。

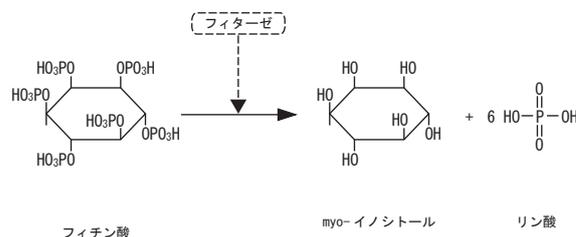


図 8.50 フィターゼによるフィチン酸の分解反応

8.11.3 ウレアーゼ

ウレアーゼは尿素を加水分解して二酸化炭素とアンモニアに変換する反応を触媒する酵素である (図 8.51)。

酒類の製造中に自然発生するカルバミン酸エチルが近年有害物質と同定された。この物質の生成反応は尿素とアルコールによる図 8.52 に示す反応式で進むことが明らかにされ、最終的にカルバミン酸エチルの発生を抑えるためには尿素を除けば良いことがわかった。当初は植物由来の中性ウレアーゼの使用が試みられたが、酒類のような酸性条件下にある状態では酵素が不安定のため大量に使用しなければならなかったが、結局乳酸菌由来の酸性ウレアーゼを用いて目的が達成されている。

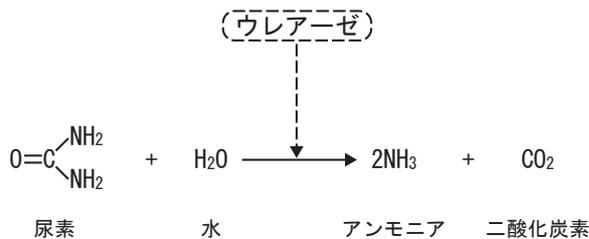


図 8.51 ウレアーゼによる尿素の分解反応



図 8.52 尿素とエタノールからのカルバミン酸エチルの生成反応

引用文献

1. 鈴木晃臣：タカアミラーゼの生産、「発酵ハンドブック」、p. 266、共立出版、2001、7.
2. 津崎桂二、久保田倫夫：蛋白質・核酸・酵素、42、32、1997
3. Arima, K. *et al.* : Agric. Biol. Chem., 31, 540, 1967.
4. 別府輝彦：一島英治編著「プロテアーゼ」、p. 267、学会出版センター、1983.
5. Isowa, Y. *et al.* : Tetrahedron Letters, 28, 2611, 1979.
6. 友田勝巳, ほか：日本農芸化学会誌、56、559、1980.
7. Yokozeki, K. and S. Hara: J. Biotechnology, 115, 211, 2005.
8. Tabata, K. *et al.* : J. Bacteriol., 187, 5195, 2005.
9. Ando, H. *et al.* : Agric. Biol. Chem., 53, 2613, 1989.
10. 土佐哲也: バイオリアクターの工業化、現代化学、p. 90, 1992. 9.
11. Kumagai, H. *et al.* : Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 266, 1969.
12. Sano, K. *et al.* : Appl. Environ. Microbiol., 34, 806, 1977.
13. Yamada, H. *et al.* : J. Ferment. Technol., 56, 484, 1978.
14. Fukumura, T. : Agric. Biol. Chem., 41, 1327, 1977.
15. 國中 明：日本農芸化学会誌、34、489、1960.
16. 榎木治久：遺伝子工学酵素の生産、「発酵ハンドブック」、p. 66、共立出版、2001. 7
17. Matsuda, A. *et al.* : J. Bacteriol., 169, 5815, 1987.
18. Yamada, H. *et al.* : J. Ferment. Technol., 58, 495, 1980.
19. 小林 猛: 日本生物工学会編「生物工程ハンドブック」、コロナ社、p. 782、2005.
20. Nagasawa, T. and Yamada, H. : Trend Biotechnol., 7, 153, 1989.
21. Shimizu, S. *et al.* : Eur. J. Biochem., 209, 383, 1992.

9 | 酵素の生産と利用技術の系統化図

酵素の生産と利用技術の系統化を図示した(図9.1)。この図では年代を上部に掲げて、技術が生まれる背景にある科学(微生物学、生化学、分子生物学および遺伝子工学とタンパク質工学)を次に示し、これらをベースにして生まれてきた技術の関与を示している。

酵素の生産技術は生産菌株のスクリーニング→菌株の育種改良→酵素機能の改良→大量培養→培養液からの酵素の単離・精製へと展開されてきた。微生物学の基本的な技術として微生物の分離と純粋培養の技術がコッホ(R. Koch)らを創始とする多くの先覚者によって19世紀末には確立されていたが、菌株スクリーニングとは、無限に存在する微生物の中から特定の目的にかなうものを最も効率よく選択するために、培地や培養法を工夫することで、1940年ころから欧米で本格的に始まった抗生物質生産菌のスクリーニング技術が大きな指標になったことを記しておかなければならない。さらに、突然変異による菌株の改良、および大量培養、特に液体の深部培養(タンク培養)についても抗生物質生産のために開発された技術が日本の技術開発に大きな影響を与えた。特に第2次大戦後、GH

Qの指導もあって、ペニシリン発酵を中心にアメリカからの指導や応援があり、多くの企業がこれに参画した。特に製薬以外の企業の参加が多いのが特徴であった。ただ、酵素生産で現在も重要な位置づけにある固体培養法は日本古来の麴カビの培養技術が大きな力になって生きていることを示している。

酵素の単離・精製技術はタンパク質の生化学から生まれた学術的に重要な技術である。すなわち、実験室レベルではアルコールやアセトンを用いる溶媒沈殿、可溶性の塩類を加える塩析、等電点沈殿などによってタンパク質を沈殿させ、さらに透析や限外濾過などの膜技術によって夾雑物を除き、さらに必要に応じて種々のクロマトグラフィーなどを活用して精製がおこなわれるが、これらをほぼスケールアップする形で工業生産技術が確立されている。

エンジニアリングは微生物の大量培養と単離・精製工程に関するもので、現在ではいずれもコンピュータ制御による工程管理が行われている。

酵素の利用に関する技術として固定化と粒状化を取り上げた。固定化技術は主として有用物質の生産に活

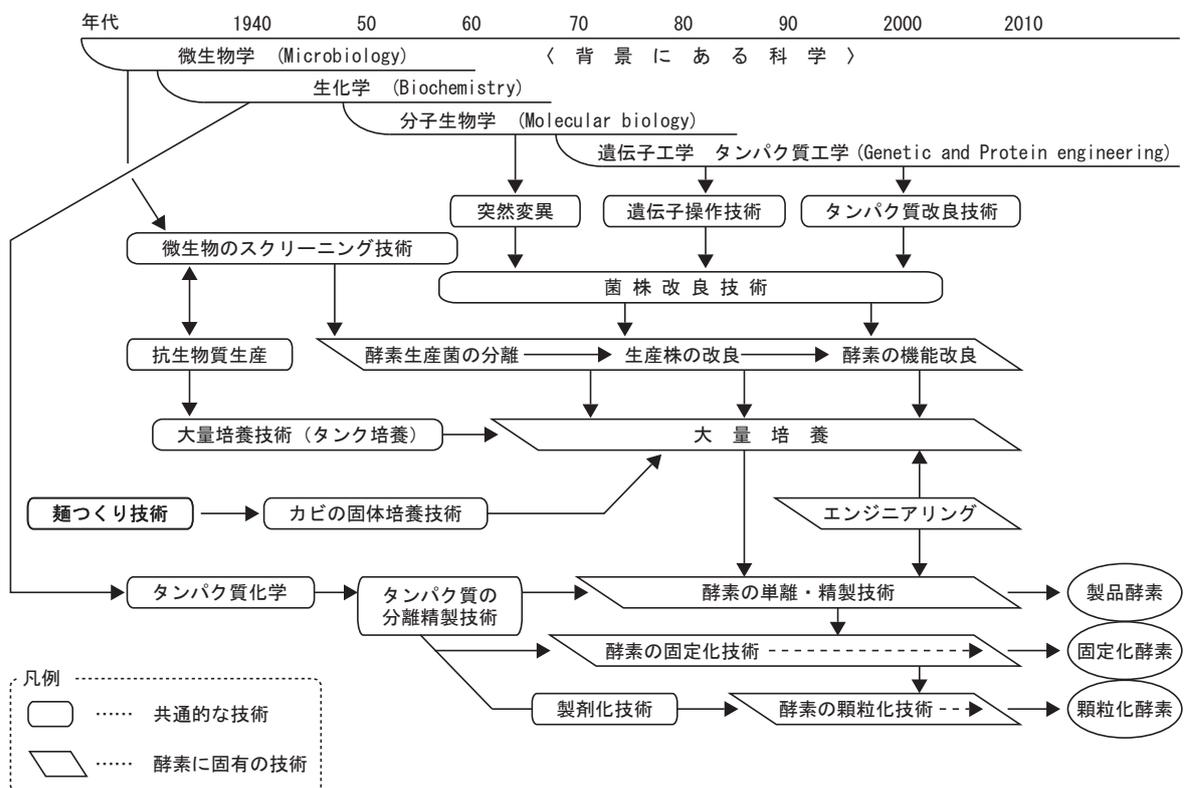


図9.1 酵素の生産と利用技術の系統化図

用されている。酵素は通常は溶液の状態で使用され、回収ができないため1回限りの使用しかできなかった。さらに安定性が良くないものであったが、固定化技術によって、固体触媒のように安定性が高く、繰り返し使用できる大きなメリットが生み出された。実験室レベルの技術では欧米が先行していたが、工業化レベルでは日本が進んでいる場面が多くなっている。粒状化技術では医薬品などの製剤化技術が応用された。

本文に記したとおり、元来が粉末酵素の安全性の問題点を解決するために開発された技術であるが、酵素の安定化と取扱いが楽になるメリットが生まれた。

このようにして酵素は製品化され市販されているが、一方酵素を含む微生物自体が酵素源となっているケースでは酵素は製品となっているわけではなく微生物の菌株自体が酵素源であって、特許出願されたものについては公的な機関に寄託されている。

10 | 今後の酵素技術の課題と展開

現在の世界的な関心事項は、健康と栄養、資源とエネルギー、および環境保全である。これらの確保、維持と増進に向けて様々な努力が傾注されているが、今後とも酵素に関する技術開発も基本的にこれらがターゲットとなるであろう。その中でバイオテクノロジーに期待される場所は大きいし、その中のかなりの部分は酵素技術に期待される場所である。

繰り返し記してきた通り、酵素反応は常温常圧で進行する化学反応である。つまり、この活用によって省エネルギーで環境調和型のプロセスを構築できる可能性が大きいことを示している。多くの医薬品、栄養物質、などのファインケミカルスのみならずコモディケミカルスの製造をはじめ、資源の活用や発掘、廃棄物処理や難分解性物質の処理、などにも活用される傾向が強まると考えられる。

そのためには新しい機能を持つ酵素の探索が第一に必要であり、この開発に多くのエネルギーが注力されると考えられる。一般的には、新しい酵素は新しい微生物に求めるのが定石である。その点で、既知の微生物でも未利用のものはまだ80-90%残っていると言われている。これらの探索が手っ取り早い、さらに地球上とは異なる環境、たとえば深海や地下の微生物の探索も行われている。ここから得られる材料を調べてゆけば新たな機能をもつ酵素の発見も可能である。タンパク質工学による改良も多くの実績が得られているので、この方向は当然強化され期待も大きい。

当然のことにこれらの中で、もっと大事なポイントは如何にしてスクリーニングするか、という方法論である。これがしっかりしていれば、必ずしも特殊な菌株でなくても、身近に有力な候補が得られるものである。

資源やエネルギー確保の面からは未利用資源の活用が考えられる。キッチンやキトサンを分解するキチナーゼやキトサナーゼによる興味深い研究成果が得られている。また、バイオマスが注目されている。その中でもヘミセルロース、リグニンの分解などの分解、あるいは分解産物からの有用物質などがテーマとして考えられる。

本調査研究の中で気がついたことは、酵素特許の権利が意外に小さく、権利の取得を巧妙に進めないと先発の特権をなかなか行使できない、ということである。たとえば、有馬らによって発見されたムコールレンネット（凝乳酵素）の開発は、従来の酵素が若い羊

や牛の胃から得られていたことによる生産性の悪さと動物愛護という問題点を画期的に改善した大発明であるが、すぐに別の菌株による酵素が特許出願され、先発発明の大きさがビジネスの大きさとして反映されていないように見える例である。もちろん権利の広い特許を押さえておけばよいことではあるが、当初から予測することもなかなか難しいことである。したがって酵素自体とともに、用途と連動した製品開発が重要と思われる。たとえば林原によるマルトオリゴシルトレハロース合成酵素とマルトオリゴシルトレハロースヒドロラーゼとトレハロースの生産、味の素と天野エンザイムによるトランスグルタミナーゼの開発とタンパク質の加工技術との連動などの例である。

日本の酵素メーカーはノボザイム社 (Novozyme, デンマーク)、ゼネンコア社 (Genencor, アメリカ)、ギストプロカーディス社 (Gist-procades, オランダ) などの欧米の大手企業に比較して規模は小さいが、これまでは対等以上の競争力を維持している。また酵素の市場は世界で約5-6000億円と推定されているように、意外に小さいのである。酵素というものが、触媒という性質上、“縁の下”の役割を果たしているわけであるが、末端製品ははなはだ大きいものである。たとえば、本文で記したとおり、遺伝子工学の技術は酵素技術の集合体であり、酵素がなければ存在し得ないものである。現在、遺伝子工学に関連する科学や技術が世界に与えているインパクトの大きさから考えると、酵素がいかに偉大な役割を果たしているかが理解されるであろう。

日本の酵素メーカーの健闘は独自の技術力負うところが大きい、さらに日本の技術の強みを伸ばし、弱点はどこにあるのかを見極めて、技術力を確保し新規な製品得るとともに、中国などの安い原料や人件費をもつ途上国の追い上げに対応するために特段の努力が要求される。それらへの技術上の対応法の一つが、(すでに行われているが)産学による共同研究のさらなる強化ではないか。たとえば、日本農芸化学会の発表演題を見ると、酵素を扱っているものが非常に多く、酵素への関心の高さを示しているが、これらを企業的な視点から、新規な機能開発に目を向けさせてゆく目が重要ではないだろうか。

11 | 謝 辞

本報告書の作成に当たっては下記の方々のご協力をいただきました。厚く御礼を申し上げます。

元林原株式会社	辻阪好夫
新日本化学工業株式会社	山本 綽
天野エンザイム株式会社	紀藤邦康
	富永隆一
	和地 昇
	秋葉哲典
	木村茂樹
味の素株式会社	横関健三
ノボザイムズジャパン株式会社	坂口博脩
	橋田みよ子
エイチビィアイ株式会社	佐々木勝
元三共株式会社	田島量造
第一三共株式会社品川開発センター	メシスコ亜紀
ナガセケムテックス株式会社	黒崎隆之
永田醸造機械株式会社	伊藤秀明
高岡市立博物館	藤井恵里
金沢市立ふるさと偉人館	野村 信

本報告書の作成に当たっては以下の資料を参考にさせていただいた。

- 1) 上島孝之:「産業用酵素」、丸善(株)1995年7月。
- 2) 上島孝之:「酵素テクノロジー」、幸書房、1999年11月。
- 3) 左右田健次編著:「生化学—基礎と工学」、化学同人、2001年3月。
- 4) 一島英治:「酵素—ライフサイエンスとバイオテクノロジーの基礎」、東海大学出版会、2001年3月。
- 5) (財)バイオインダストリー協会発酵と代謝研究会編:「発酵ハンドブック」、共立出版、2001年7月。
- 6) (社)日本生物工学会編:「生物工程ハンドブック」、コロナ社、2005年6月。
- 7) 日本酵素協会編:「日本酵素産業小史」、2009年4月。

国立科学博物館 技術の系統化調査報告 第14集

平成21(2009)年5月29日

- 編集 独立行政法人 国立科学博物館
産業技術史資料情報センター
(担当：コーディネイト・エディット 永田宇征、エディット 大倉敏彦・久保田稔男)
- 発行 独立行政法人 国立科学博物館
〒110-8718 東京都台東区上野公園 7-20
TEL：03-3822-0111
- デザイン・印刷 株式会社ジェイ・スパーク