

分析、診断等に使用される酵素

1 はじめに

血糖値等を測定する際に酵素が使用されていることをご存じの方はどのくらいいるのでしょうか。血液のような様々な物質が含まれているサンプルにおいて酵素は血糖だけを識別してシグナルをだす触媒であることが最大の利点である。

酵素は、鍵と鍵穴の関係で例えられるように特定の物質にのみ反応する優秀な触媒として注目をされてきた¹⁾。そのため酵素を用いた様々な分析機器、センサー、診断薬等がこれまでに開発、販売されている。

酵素の働きは一般的にユニット（Uや単位）で表されることが多く、これは単位時間あたりにどの程度の仕事（基質を切断、結合、酸化還元等）を行うかの表示である²⁾。ユニットの定義には特に定めはなく各酵素の取扱説明書にはそれぞれ定義および測定条件が明記されている。

例えばある緩衝液中で 37℃ において 1 分間あたり 1 μmol の基質を処理する能力を 1 ユニットとする、などと表記される。また、酵素 1 mg あたりのユニット数を比活性（U/mg）と称し酵素使用時の目安とする。

酵素は優秀な触媒である反面、その正体はタンパク質であり熱、酸、アルカリ、界面活性剤、有機溶媒などタンパク質の変性を促すものに対して弱いという性質がある。

また、酵素の製造は生物本体からの抽出、または微生物等を宿主とした組み換え体からの抽出によるため一定の不純物の混入が避けられない。不純物が目的以外の活性を持ってしまうと必然的にその酵素は触媒として使用できないものとなる。

ここでは上記のような難点をいかにして克服し、優秀な触媒を手に入れるかを論じたい。

2 酵素の耐久性

先に述べたように酵素がタンパク質である以上何らかの刺激による変性・失活とは常に隣り合わせである。また、保管状態によってもその性能が左右される可能性がある。そこで凍結乾燥等の保存技術が開発され、粉末酵素としてはある程度の保存安定性が担保されるようになった。しかしながら酵素そのものが丈夫になったわけではなくあくまでも乾燥状態での保存安定性が向上したに過ぎない。酵素が作用する際には水分が必要なため酵素そのものの安定性を向上させる必要がある。その解決

手段の一つとして耐熱性酵素の使用が挙げられる。

耐熱性の酵素は 50～100℃ 超を生息域とする微生物から取得され、その由来によって耐えうる温度は様々である。有名なものとしては PCR に使用される DNA ポリメラーゼが挙げられる³⁾。

実際にユーザーからの依頼で従来酵素と耐熱性の酵素の比較をした例を図 1 に示す。このユーザーは酵素を使用した分析装置を製造しており、その過程で酵素を塗布した膜を 71℃ のオープンに通し、乾燥させている。その際に従来使用している酵素より丈夫なものということで耐熱性の酵素を比較としてテストを行った。本試験は水溶液中で行ったため条件の違いは多少存在するが 71℃ において耐熱性の酵素は活性を損なわなかった（図 1-上）。このように酵素が熱に対して丈夫であることはその他の厳しい条件においても失活しにくいことが多く、実用性の高さが期待できる。

また、耐熱性は高くとも反応性が従来の酵素と比べて変化していると測定等には使用できない。しかしグラフからも見て取れるように両酵素の基質に対する反応性（反応曲線）は重なって 1 本のように見える。これは従来の酵素と全く同じ反応特性を持つことを示唆しており、置き換えて使用することが容易と考えられる（図 1-下）。

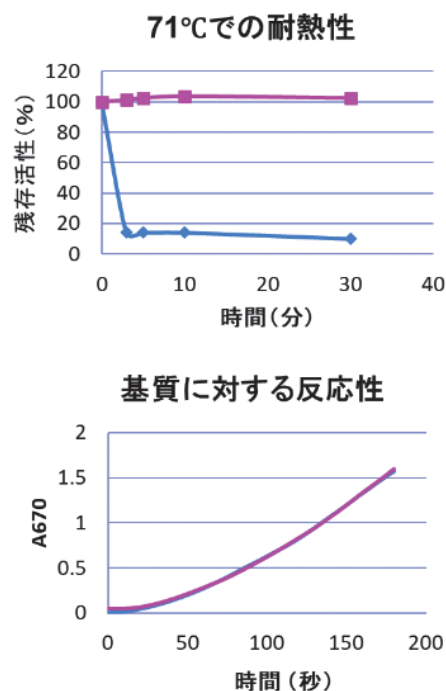


図 1 酵素の耐熱性の比較
(青線：従来酵素；赤線：耐熱性酵素)

3 酵素の純度

酵素が希望通りの反応をするためには抽出した酵素ができるだけ不純物を含まないことが求められる。低分子化合物は透析などで除去が可能であるが、生体由来の他のタンパク質等高分子化合物を除去するためには別の工程が必要となる。具体的にはイオン交換クロマトグラフィーや疎水性クロマトグラフィー等の一般的な精製方法に加え、組換え酵素の作製時に特殊なアミノ酸配列を持たせることで特定の樹脂に結合させる方法⁴⁾や、酵素の持つ性質（耐熱性など）を用いた方法等により精製が行われている。そのような方法で精製された酵素は不純物をほとんど含まず、目的の活性のみを持つ触媒として使用可能である。

図2は大腸菌を用いて耐熱性の酵素を発現させ、精製を行った画像である。ポリアクリルアミドゲルを用いて各たんぱく質をその大きさに分けられる電気泳動法で観察を行っている。左側は大腸菌の中で酵素を大量に発現させた際の抽出液である。右側は左側で示された抽出液を85℃の温度でしばらく置き、大腸菌由来のタンパク質を変性、沈殿させた後に可溶性画分に残存した目的酵素である。

このように酵素によってはその特性を利用した簡便な方法で精製可能となり、目的酵素が比較的安易に入手できるようになった。

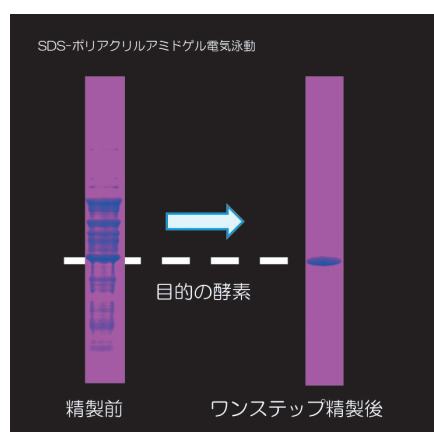


図2 耐熱性酵素を用いたワンステップ精製

4 酵素の大量生産

はじめに、この項でも述べたが酵素の製造は微生物や生物・生体臓器等の本体からの抽出、または微生物や培養細胞等を宿主とした組み換え体からの抽出によって行われている。無細胞系を用いたタンパク質生産といった技術も存在するが、安定して大量の酵素を製造するといった論点からは少し外れるのでここでは論じない。

酵素の大量生産には遺伝子組み換え技術を用いた強制発現系を使用することが多くみられる。これは大腸菌な

表1 遺伝子操作・培養方法による酵素の収量比較

	菌体量	タンパク量	活性
通常培養 (フラスコ)	5 g	22 mg	160 U
遺伝子操作 (フラスコ)	9 g	273 mg	1800 U
遺伝子操作 (ファーメンター)	90 g	2208 mg	16000 U

どの微生物に目的酵素の遺伝子を導入し、細胞内あるいは細胞外へ導入した遺伝子由来のタンパク質を大量に作らせる技術である。この技術によりこれまで少量しか作れなかった酵素が比較的大量に製造できることとなった。

さらには導入する遺伝子の形を宿主の生物に合わせることや培養方法の工夫によって目的の酵素が単位培養当たりこれまでの何倍も取得できるようになった。

表1は弊社で行った酵素の活性収量改善の一例である。1列目に通常の実験で行う組換え酵素の結果を示している。2列目は使用する大腸菌に合わせた遺伝子の操作を行ったもの、3列目はそれに加え培養方法を工夫して高密度に培養を行ったものである。このように結果として約100倍の酵素を取得できることとなり、より安価な酵素の提供が可能となった。

5 おわりに

酵素は特異性の高い優秀な触媒であるが、分析等に使用する場合にはなるべく丈夫かつ精製度の高いものを入手することをお勧めしたい。また、複数のメーカーから同じ名称の酵素が販売されている際にはその由来生物（明記されない場合もある）が違えば反応の特性も変わることがあるので目的に合った酵素がどれなのかは比較検討していただきたい。

本稿で述べたのは酵素技術の中のほんの一面に過ぎない。今後、選択性の高い触媒が必要となった際には酵素のことを思い出して頂きたい。そしてたとえそれらが入手しづらい酵素やカタログ等で見つけれない酵素であっても現在の技術では生産できる可能性があることも併せて頭の隅にでも置いておいて頂きたい。

文 献

- 1) 谷川実：化学と教育，**66**，584（2018）。
- 2) 一般財団法人日本食品分析センター：酵素の基礎知識～酵素の利用と活性測定法～ JFRL ニュース Vol.5 No.3 Dec.（2014）。
- 3) 根本孝幸：岩手医科大学歯学雑誌，**19**，10（1994）。
- 4) E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, D. Stüber：Nature Biotechnology，**6**，1321（1988）。

〔株式会社耐熱性酵素研究所 奥 崇〕