

排水処理用酵母が生産する酵素の環境保全への利用

醸造技術応用研究部門 正木 和夫

1. はじめに

醸造技術応用研究部門では酵母やカビといった真核微生物を用いた排水処理技術をはじめとした環境保全に関わる研究を行っている。また、それら微生物が生産する環境保全技術に有用な酵素の探索・解析を行っている。酵素とは、生命活動に必須のタンパク質からなる生体触媒であり、生物における物質変換の中心的役割を担っている。麹菌由来のグルコアミラーゼ、タカアミラーゼなど糖質の分解に関わる酵素や、プロテアーゼ、ペプチダーゼやリパーゼといったタンパク質や油脂成分を分解する酵素などは酒造りにおいてもなじみの深いものである。この講演では、当研究所で新たに単離された酵母から、いかにして環境保全に有用な酵素を新規に取得し酵素機能の解析や環境保全利用に向けての研究を行っているか、その研究内容や成果について紹介する。

2. 担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2

担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 は、排水処理に有用な酵母として当研究所で単離された。この酵母は、生澱粉 (raw-starch) を分解する能力が高く、詳細な酵素研究から難分解の結晶性澱粉である生澱粉を分解するアミラーゼを分泌生産することがわかった。さらに、この酵母は耐酸性のキシラナーゼ、耐熱性のセルラーゼ、リパーゼ (CS リパーゼ、後に CLE と呼ぶ) など特徴的な酵素を菌体外に分泌生産することがわかってきた。これまでに、我々は本酵母が分泌生産するこれら酵素の研究や本酵母の遺伝子導入技術の開発を行っており、さらには酵素高生産宿主としての研究開発も行っている。

3. *Cryptococcus* sp. S-2 のリパーゼは、クチナーゼ様酵素 (Cutinase-like enzyme; CLE)

このリパーゼの発見当初は米糠油などの副産物の有効利用や環境に優しい新しい技術の検討という観点から CS リパーゼによるバイオディーゼルの生産を試みた。バイオディーゼルとは植物油のようなトリアシルグリセロールとメタノールなどアルコールとのエステル交換反応で生じる脂肪酸アルキルエステルのことであり、現在使われているディーゼルエンジンにそのまま使える燃料として近年バイオエタノールとともに注目されている。

さらに、遺伝子解析から CS リパーゼは、分子量 20917、構成アミノ酸数 205 からなるものと推測された。そのアミノ酸配列解析からは 20%以上の相同性を示す既知のタンパク質はデータベースに見出せず、一次構造上は非常にユニークな構造を示していた。さらに詳細な配列解析を行うと、リパーゼ同様にエステル分解活性を示すクチナーゼとの部分的な配列類似性が見られ、さらには、CS リパーゼの X 線結晶構造解析 (図 1) からは、その立体構造は従来報告されているリパーゼというよりはクチナーゼやアセチルキシランエステラーゼと似ていることがわかった。したがって、当初リパーゼとして単離された酵素であるが、現在ではクチナーゼ様酵素 (Cutinase-like enzyme; CLE) と呼んでいる。また活性触媒残基周辺には基質が結合すると予想される広く長い溝が見られ、立体構造から高分子鎖を分解するのに適した構造である



図 1 CLE の立体構造
X 線結晶構造解析による (1.05Å)

ことが推測できる。また、リパーゼというよりはクチナーゼと近い性質の酵素であることが予想され、CLE と既知のクチナーゼとの機能比較を試みたが、現在のところ容易に入手できるクチナーゼはなかったため、クチナーゼ研究で一番進んでいる *Fusarium solani* や貴腐ワインの原料ぶどうに寄生する貴腐菌として知られている *Botrytis cinerea* からクチナーゼ遺伝子を取得し、酵母にて生産させた各クチナーゼと CLE の機能比較を行った。その結果、基質特異性や最適 pH など、既知のクチナーゼと比較して CLE は特徴的な酵素特性を示した。特に長鎖脂肪酸からなるエステルについても分解活性が高く、短鎖脂肪酸からなるエステルに特異的であった上記クチナーゼとは基質特異性の点で大きく異なっていた。

4. クチナーゼ様酵素 (CLE) の環境保全への利用

この酵素のバイオディーゼル生産に加えて新たな環境保全利用を検討すべく、近年注目されているバイオプラスチック（生分解性プラスチック）の分解を検討した。バイオプラスチックは再生可能な生物資源を利用したプラスチックであり、その中で最も注目度が高いポリ乳酸は乳酸発酵で生じた乳酸を高分子化したものである。またほとんどのバイオプラスチックは生物由来原料からなり使用時にはこれまでのプラスチック同様に使用でき、使用後の生分解性（生物、特に微生物による分解）を発揮するという特徴を持つ。しかしながらポリ乳酸については、他のバイオプラスチックに比べ非常に生分解性が悪いことが知られている。また、他のバイオプラスチックについても生分解性の大小はあるもののその生分解に寄与する酵素についての研究

はあまり進んでいない。我々の単離した酵素 CLE によるポリ乳酸をはじめとする各種プラスチックの分解触媒能力を調べた。ポリ乳酸分解能力の評価では、これまでポリ乳酸の分解に最も有効であるとされてきたセリンプロテアーゼである Proteinase K との分解能力の比較を行った。ポリ乳酸エマルジョンを用いた分解活性の比較では CLE は 500 倍濃度の Proteinase K よりも速く分解することができることがわかった（図 2）。また、Proteinase K では分解できないポリブチレンサクシネート (PBS)、ポリ ε カプロラクトン (PCL) に対しても非常に高い分解活性を有することがわかった。

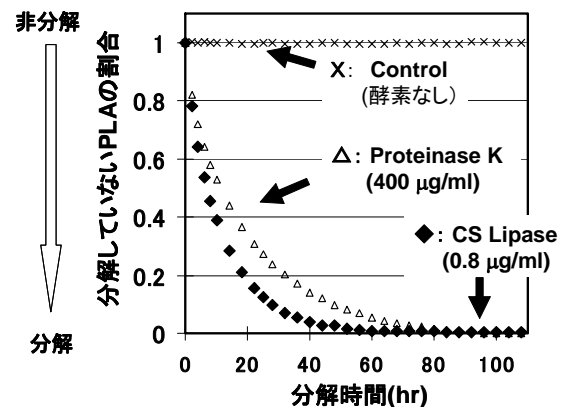


図 2 ポリ乳酸 (PLA) エマルジョンの酵素分解

さらにペレットやシート状に加工された固体状の PBS、PCL についても良好に分解することがわかった（図 3）。現在では、このような酵素の機能解析に加えて、CLE を各種微生物により大量に生産する技術についての研究も進行している。

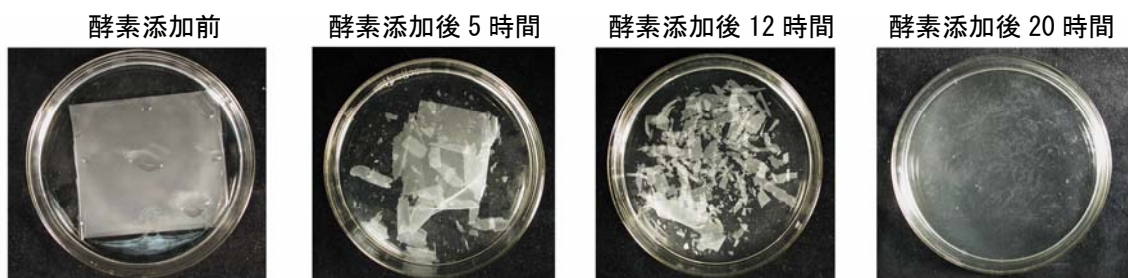


図 3 CLE によるポリブチレンサクシネート (PBS) シートの分解
使用した PBS シートは 10cm x 10cm、重量約 0.3g 厚さ 16µm、分解反応温度 30°C。酵素添加 20 時間後にはプラスチックが全て分解され、溶けてしまう。