

## < 定例セミナー >

# バイオエレクトロニクスと耐熱性酵素の利用

埼玉大学工学部応用化学科 飯田 武揚

### 1. バイオセンサの歴史的経緯

バイオセンサは1962年に固定化した酵素膜と電気化学デバイスを組み合わせた Clark の酵素電極から出発した。これを第一世代のバイオセンサとしよう<sup>1)</sup>。1970年代に入って第二世代のバイオセンサが開発され、酵素免疫サーミスタ、酵素サーミスタ、動植物組織、オルガネラ (organelle, ミトコンドリアや葉緑体のような細胞小器官で一定の機能をもつ構造単位)、微生物をレセプタとするセンサが開発された。さらに1980年代になってバイオセンサは構造を微小化の方向にむかい、半導体素子を用いた第三世代の Bio-FET センサへと進展した<sup>2)</sup>。Ion Sensitive FET センサは Si チップの表面を  $\text{SiO}_2\text{-Si}_3\text{N}_4$  膜で覆い、表面に吸着する化学種によって生ずる電位変化を電界効果トランジスタ (FET) で増幅する方式を取っている。これによって超微小グルコースセンサなどが可能になり、生体内への直接植込みが可能な人工臓器が開発された<sup>3)</sup>。このほかバイオアフィニティセンサ、発光免疫センサ、発光酵素免疫センサなどは第三世代のバイオセンサであろう。

バイオセンサが微小化されるに伴い、集積化が進み、多くの化学種の同時計測が可能になり、味覚やおいのセンサも実用化されると、ロボット技術と合流して新しいメカトロニクスの技術が誕生するであろう。バイオセンサは、第四世代を迎えて新たな展開をみせようとしている。ここではもうバイオセンサの範囲を超えて、バイオエレクトロニク

スという新分野へ突入している。神経工学、生物化学素子、およびバイオコンピュータの時代である。

### 2. 酵素の安定性の向上

バイオセンサを実用化してゆく際に問題になることはレセプタに用いる酵素の安定性を向上させることである。酵素は固定化することによって多少安定化されるが、酵素がタンパク質である限り、本来不安定なものであるから、数週間で変性し失活するのが普通である。

そこで酵素そのものを安定化することはできないかという研究が行なわれている。この分野の研究には二つの流れがあり、一つは好熱菌のような高温環境下 (50~90℃) で生育している微生物より耐熱性酵素を抽出しようという研究であり、二つは遺伝子工学の技術を利用するプロテインデザインにより酵素に耐熱性を持たせる研究である。

確かにこの二つの研究は相補的に進める必要があると思われるが、酵素がなぜ耐熱性をもってい

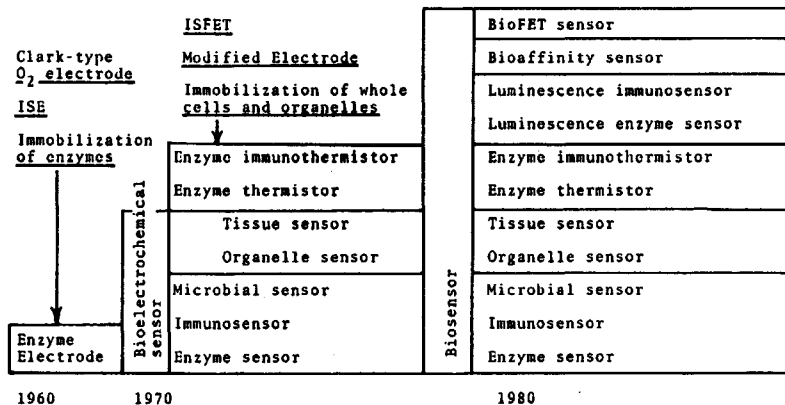
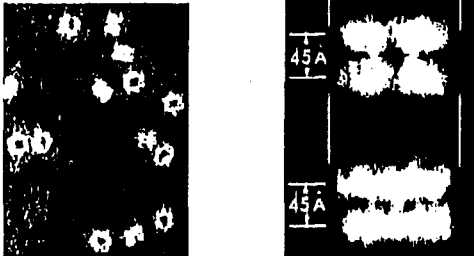


Fig.1 Historical background of the biosensors

(M.Aizawa, Proc. Inter. Meeting on Chemical Sensor, Fukuoka, Sept. 1983)



Fig.5 Electron micrographs of glutamine synthetase molecules from *E.coli*, showing the arrangement of the 12 subunits (R.C.Valentine, B.M.Shapiro, E.R.Stadtman, *Biochemistry*, 7, 2143 (1968))



タンパク質が高い機能をもつためには $\alpha$ -らせんや $\beta$ -構造を作って折りたたまれ球状になる必要がある。折りたたむ力は“ちょうつがい”のシステイン残基、側鎖がもつ静電引力、疎水性アミノ酸間の集合力、さらにはカルボニル基のOとアミノ基のHとの間に生じる水素結合などである。多くの酵素がFig.5に示すように多くのサブユニットが会合して構成され、サブユニット間の相互作用が安定化に役立ち、酵素はアロステリックな阻害を受ける。

### 3. 好熱菌の耐熱酵素

#### 3-1 好熱菌の性質

好熱菌はほかの生物が死滅する高温で生きてゆける微生物である。タンパク質や核酸が変性失活するような50~80°Cの温度を好んで増殖する。よくもこんな高い温度で生きてゆけるなあと素朴な驚きに打たれるが、耐熱性の本質は完全には解明されていない。

好熱菌で55°C以上で生育できる菌を thermophile = heat loving とよび、生育温度が55~75°Cを上限とする菌を中等度好熱菌と分類し、これらはさらに二分類され、37°C以下で生育できないものを偏性好熱菌とよび、37°C以下で生育できる菌を通性好熱

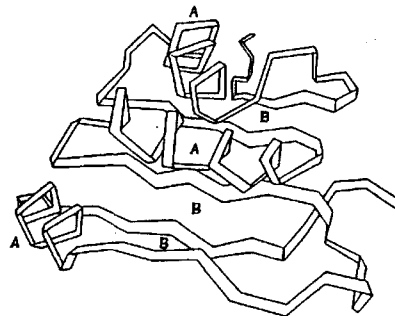


Fig.6 Schematic drawing representing the three dimensional structure of protein

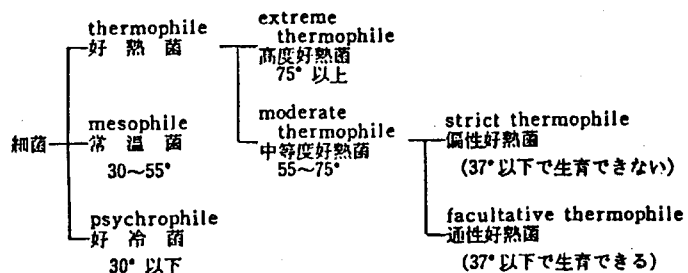
A:  $\alpha$ -helix conformation, B:  $\beta$ -conformation

菌とよぶ。生育温度が75°Cをこえる好熱菌は高度好熱菌とよぶ。常温で生育できる菌はこれに対して常温菌とよび、30°C以上では生育できないものを好冷菌とよぶ。

高度好熱菌の形態をFig.7に示す。菌は幅0.5  $\mu$ m, 長さ2~3  $\mu$ mのウインナーソーセージ型の長桿菌である。外観は大腸菌に似ているが、グラム陰性菌である。Fig.7-Cの細胞膜からわかるように、三層構造すなわち、外膜—細胞壁—内膜とわかれている。菌は好気性で、増殖は活発で75°C以上で生育するため、他の菌によるコンタミネーションが少ない。

好熱菌は一般に栄養要求性が高く、合成培地だけでは培養しにくくポリペプトン、酵母エキス、肉じるなどを加える。ある菌株では耐熱性のビタミンHのD-ビオチンやニコチン酸、ビタミンB<sub>1</sub>な

Table 1 Classification of thermophiles and their highest growth temperatures (T.Oshima, "好熱性細菌" Up Biology, 東大出版会 (1978) P.16)



などを要求し、グリコースまたはサッカロースを炭素源、塩化アンモニウムを窒素源として与える。

中等度好熱菌の *Bacillus stearothermophilus* (Bs 菌) は土壌などに分布し、胞子を作り、海洋、河川、土壌などの広い領域に分布している。Bs 菌の外観は Fig. 7 に示すものとほとんど同じであるが、細胞の表面構造はグラム陽性菌固有の細胞壁—内膜の二層構造をとり、外膜がない。Bs 菌は温度に対する適性が幅広く、55℃ で生育する菌すべてを含む。通性好熱性のもと、偏性好熱性の双方が混っている。この菌は常温に放置すると死滅するが、胞子は安定である。

好熱菌には一般に自然変

種が出やすい。純粋種と思われる株の中に形態など基本的性格を異にする変種株が混在していることが多い。

### 3-2 好熱菌の耐熱酵素の性質

好熱菌の耐熱酵素の一般的特徴はつぎの6点である。

- 1) 酵素のみならず、核酸、生体膜はすべて熱に対して安定である。
- 2) 耐熱性は常温菌の酵素の構造をほんの少し変化させて得られている。
- 3) 好熱菌の酵素は化学的変性剤（尿素、ドデシル硫酸ナトリウム、SDS、界面活性剤、有機溶媒など）に耐性が高い。
- 4) アミノ酸残基の一次配列は常温菌の配列に似ており、わずかに数残基のアミノ酸配列の差によっている。このような関係を相同の関係とよんでいる。

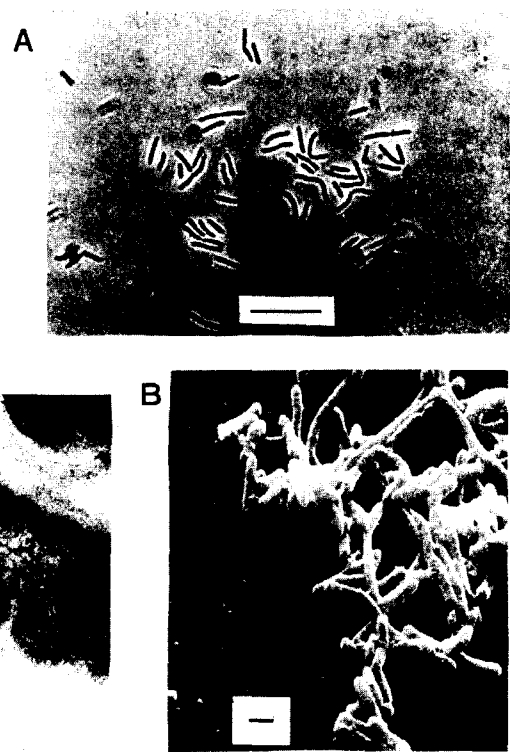


Fig.7 Normal cells of *Thermus thermophilus*:(A) Microscopical image of the cells. The bar represents 10 µm. (B) as revealed by the scanning electron microscope. The bar represents 0.5 µm. (C) Ultra thin section of *T.thermophilus* HB8 as revealed by the electron microscope (x75,000). Reproduced with permission of T.Oshima and K.Imahori.

- 5) 耐熱性は水素結合3~4本、疎水結合6~10残基の増加によって達成されている。換言すれば、耐熱性は分子内部のごく微妙な構造変化によって引き起こされているといわれる。
- 6) 特定の金属イオンが配位して耐熱性を向上させている。たとえば、エンドペプチダーゼ（ペプチド鎖を加水分解して、切断する酵素）の一つであるサーモライシンには  $Ca^{2+}$  が配位している。

### 3-3 耐熱性と構造との関係

耐熱性は酵素の構造と関係している。2節でも述べたように、耐熱性は水素結合、疎水結合、静電結合、S-Sによる共有結合、サブユニット間の相互作用などの結合を使って獲得していると思われる。

耐熱性獲得の主な原因は何かを考えてみよう。水素結合が増加しているのなら、水素結合の切断

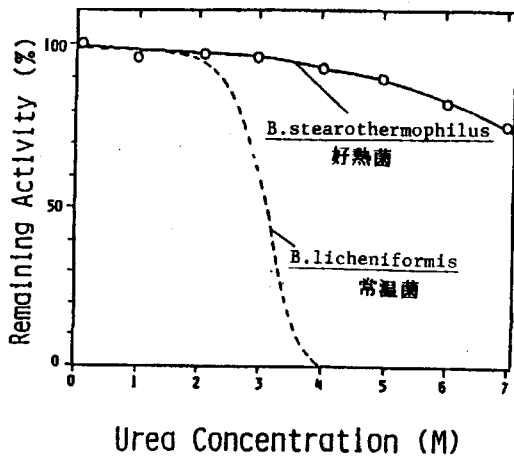


Fig. 8 Inactivation of threonine deaminase caused by urea

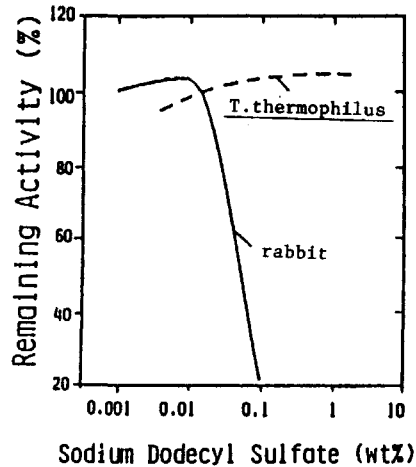


Fig. 9 Inactivation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase (GAPDH) caused by SDS

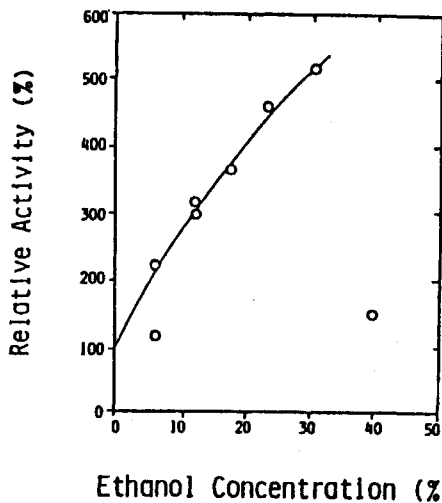


Fig. 10 Activation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase from *T. thermophilus* caused by ethanol

に作用する尿素、グアニジンを添加してみよう。Fig. 8に尿素を添加していったときの常温菌と好熱菌のスレオニンデアミナーゼの活性変化を示す。好熱菌の酵素は7Mの尿素濃度でも80%の活性を保持し、常温菌の酵素が4M濃度で完全に失活するのを見ても、好熱菌の水素結合は強固なことがわかる。界面活性剤、SDSはタンパク質と強い親和性を持ち、酵素を変性させる。Fig. 9に示すように好熱菌のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒ

ドロゲナーゼはうさぎの酵素と比較して0.1%のSDS添加に対しても活性が落ちていない。

有機溶媒を加えると疎水結合が弱まり、酵素は失活する。しかし Fig. 10に示すように高度好熱菌のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼはアルコールの添加とともに逆に活性化され、無添加のときの5倍の活性を示している。この性質を利用して好熱菌の酵素を有機溶媒中で化学修飾したり、反応させたりすることができる。

またグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼは高塩濃度でも高い活性を示し、NH<sub>4</sub>Clを加えると25倍におよぶ活性化を示す。これらの事実は好熱菌の酵素がタンパク質の骨格が強固で苛酷な条件下でも酵素本来のコンフォメーションを強く保持していることを示唆する。

### 3-4 耐熱性酵素の構造について

それでは酵素の三次元的構造がどのくらいわかっているのかについて述べよう。一番直接的知見はX線構造解析から得られるので、中等度好熱菌のサーモライシンとBs菌のグリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼである。サーモライシンの場合、酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸残基間に生ずる静電結合がいくらか多いといわれ、これが耐熱化機構の一部かもしれないと指摘された。グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼではサブユ

ニット間の静電結合がいくらか多いことが指摘されただけに止まった。

このようにX線構造解析による立体配座の決定を行なっても、耐熱化機構の決定的な知見が得られていない。現在スーパーオキシドデスルゲゼやフェレドキシンのX線解析が進行中であるが、決定的な説明を得ることは難しいものと思われる。

以上要するに、好熱菌の酵素の耐熱化機構は何か特定の結合に依存しているのではなく、水素結合、疎水結合、静電結合、サブユニット相互作用などの協同作用による微妙な構造変化によっていると思われる。

#### 4. 耐熱性酵素の利用

##### 4-1 バイオリアクタへの応用

耐熱性酵素の長期安定性を利用してバイオリアクタを構築する試みは1978年より、今堀と中島らによって開始されている。ポリペプチド合成のた

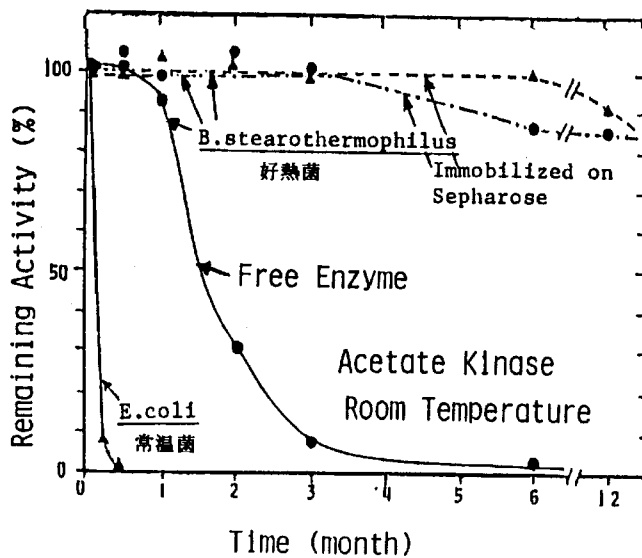


Fig.12 Stability of the immobilized enzyme. The free enzyme was preserved in a 25 mM phosphate buffer, at pH7.5 at 4°C. (今堀和友, バイオリアクタサブシステムの研究開発報告書 P. 3-9, (1979))

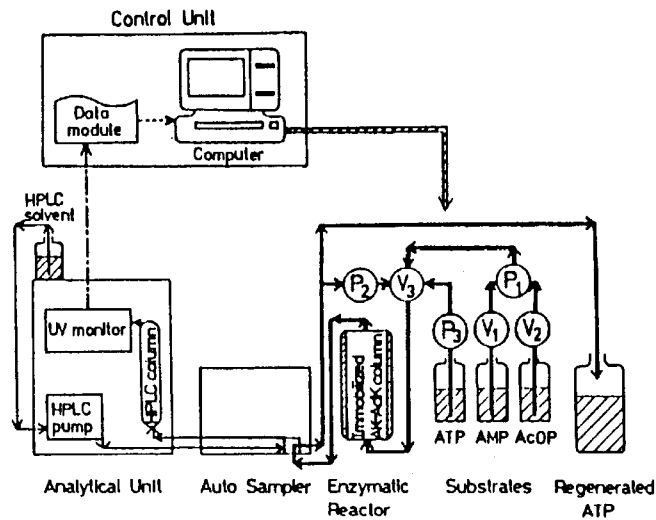


Fig.11 Schematic representation of ATP regeneration system. P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub> and V<sub>1</sub>-V<sub>3</sub> represent the metering pump and the electric valves, respectively. (H.Kondo, I. Tomioka, H.Nakajima, K.Imahori, J.Appl. Bio., 29(1984))

めにATPを再生産するサブシステムの構成をFig. 11に示す。Bs菌由来の酢酸キナーゼを活性CH-Sepharose 4B上に固定化し、カラムとして充填している。システムは、酵素反応、基質、オートサンプラ、分析、コントロールユニットの5部から成り立ち、コントロールユニットのマイコンがすべて自動的に反応をコントロールしている。このバイオリアクタはFig. 12に示すようにきわめて安定で、一年間の連続使用に対しても初期活性の90%を保持していた。

##### 4-2 バイオセンサへの応用

今堀と中島らのバイオリアクタの研究を見て、好熱菌の酵素の安定性に魅せられた我々の研究グループは1979年より耐熱性酵素の研究を開始した。最初に手がけた研究は酢酸キナーゼの基礎的研究であったが、好熱菌の酵素の長期に経る安定性をなんとか応用したいと思い、バイオセンサへの応用を発想した。最初に試みたセンサは必須アミノ酸であり、第三の家畜の飼料として組換えDNA技術で大量生産されているスレオニンを検出できる長期安定なバイオセンサであった。

好熱菌よりスレオニンデアミナーゼを抽出したところ、この酵素の安定性は予想通りよく、溶液中で酵素は2ヶ月経過しても60%以上の活性を保持していた。ポリアクリルアミドゲル中に固定化すると、一年経過しても90%の活性を保持していた。我々の初期の目的である一年間安定なバイオセンサの構想は凶星であった。この結果を1983年の“化学センサ国際会議（福岡）”で発表した<sup>9)</sup>。さらにFET上に酵素を固定化したISFET型スレオニンセンサの研究を行なった。次に取り組んだ研究はグルタミン酸を計測できるバイオセンサの開発であった<sup>10)</sup>。Bs菌よりグルタミンシンターゼを抽出し、アンモニア電極上に固定化してグルタミン酸センサを構築した。グルタミンシンターゼもきわめて安定であり、ポリアクリルアミド膜に固定化したものは一年以上活性を保持していた。

#### 文 献

- 1) 鈴木周一編, “バイオセンサー” 講談社サイエンティフィック 第一章, P. 1, (1984)
- 2) 相沢益男, 赤池敏宏, 雀部博之監修, “バイオエレクトロニクス” 第2章, P. 46, CMC (1984), 軽部征夫 “バイオチップセンサ”
- 3) 池田章一郎, 伊藤 要, “人工すい臓用グルコースセンサ”, 鈴木周一編, “バイオセンサ” 第13章, P. 194, (1984)
- 4) 神沼二真編, “生物化学素子とバイオコンピュータ”, Science Forum, (1985)
- 5) 今堀和友, “タンパク質に魅せられて”, 学会出版センター, (1981)
- 6) 大島泰郎, “好熱性細菌”, Up Biology, 東大出版会 (1978) “異常環境と微生物酵素”, 講談社サイエンティフィック (1977)
- 7) H. Kondo, I. Tomioka, H. Nakajima, K. Imahori, J. Appl. Biochem., **6**, 29-38 (1984), “Construction of a System for the Regeneration of Adenosine 5'-Triphosphate, Which Supplies Energy to Bioreactor”.
- 8) T. Iida, S. Machida, N. Iijima, T. Mitamura, Proc. Intern. Meet. Chemical Sensor, Fukuoka, (1983) P. 631, “L-Threonine Deaminase from Thermophilic Bacterium *Bacillus stearothermophilus* Coupled Ammonia Sensor for L-Threonine Determination”.
- 9) 川辺 健, 飯田武揚, 飯島 昇, 三田村 孝, 原 正史, 勝部昭明, “好熱性細菌のスレオニンデアミナーゼを用いたISFET型スレオニンセンサ”, DENKI KAGAKU, **53**, No. 7 (1985)
- 10) 飯田武揚, 飯島 昇, 久富雅男, 三田村 孝, “好熱菌のグルタミンシンターゼを用いるグルタミン酸センサ”, DENKI KAGAKU, **54**, No. 3, 290, (1986)