

## 写真フィルムリサイクルに適した耐熱性酵素の開発

*Development of a Thermostable Alkaline Protease  
for Film Recycle*

増井 昭彦\* 藤原 信明\*

Akihiko Masui Nobuaki Fujiwara

(1999年9月9日 受理)

From the view points of environmental problems, we have constructed an automatic process using an alkaline protease to recover both silver and polyethylene terephthalate (PET) film base independently from used X-ray film. In this process the enzymatic hydrolysis reaction was carried out at 40°C from the standpoints of repeated utilization, the rate of reaction and inactivation of the enzyme. If this enzyme becomes more thermostable with high activity, repeated utilization of the enzyme at high temperature would be expected. To increase the stability of this protease, the  $\beta$ -turn positions, Ala-38, Ala-165 and Ala-187 were replaced by Pro and the residual activities of the resultant mutant enzymes treated at 55°C for 30 min were found to be higher than that of the wild-type enzyme (60% as against 30%).

キーワード：写真フィルム，PET，リサイクル，アルカリプロテアーゼ，耐熱化，タンパク質工学

## 1. はじめに

## (1) 酵素を用いた写真フィルムのリサイクル

医療技術の進歩あるいは情報化社会の進展に伴い、医療用直接撮影X線フィルム(レントゲンフィルム)や印刷製版フィルムの使用量は、当初の予想に反してむしろ増大している。医療用直接撮影X線フィルムは、図1のように厚さ175 $\mu$ mのポリエステル(PET)ベースの上に非常に薄い下塗り層が塗布され、次いで感光材である銀を含む乳剤層、そして最上部に保護層が両面に塗布された構造を持つ。印刷製版用フィルムは、PETの厚さが100 $\mu$ mと薄く、かつ片面だけに塗布されている点が異なるだけで、基本的には医療用直接撮影X線フィルムと同じ構造である。フィルムの乳剤層および保護層の支持体は、いずれもゼラチンと呼ばれるタンパク質であり、感光材の銀は、この乳剤層中に医

療用直接撮影X線フィルムの場合約1.2~1.5%、印刷製版フィルムの場合約1%含まれる。

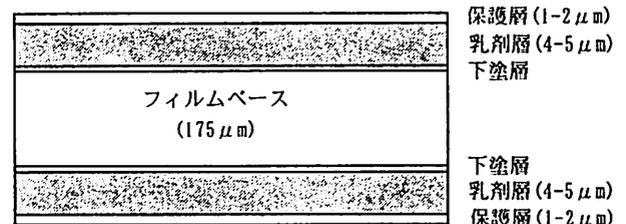


図1 医療用X線フィルムの構造(模式図)

Structure of X-ray film

写真フィルムのリサイクルは、現在、医療用X線フィルムからは、種々問題のある燃焼法により銀が回収・再利用されているだけで、フィルムベースであるPETは、燃焼されるため再利用されていない。印刷製版フィルムの場合は銀、PETともに回収・再利用されていない。こうした背景から我々は、ゼラチン膜を非常に

\* 材料技術部 酵素応用グループ

早く分解できる酵素（アルカリプロテアーゼ\*<sup>1)</sup>）を開発し、無公害技術である酵素を利用したバイオリアクターにより、医療用X線フィルムから銀とPETを連続的に分別回収するシステムを構築した<sup>1)-4)</sup>。

これらの成果を踏まえて、印刷製版用フィルムについても、完全な再利用を可能にする新規なシステムの開発研究を、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）・中小企業事業団から委託されて（中小企業創造基盤技術研究事業）、平成8年度から3ヶ年の計画で企業と大学とで共同して行い、新たなリサイクルシステムを構築した。

## （2）酵素の耐熱化

一般に、酵素を工業的に利用する場合、いくつかの問題点が存在する。第1に、酵素のランニングコストが実用化の大きな障害となることである。この解決方法として現在は、培養条件の検討や菌の改良などにより、酵素生産性の向上を図っている。第2に、酵素反応は、化学反応にない優れた点をもつ反面、反応の遅さがその利用に際して障害になることである。その解決法として、高温での反応が考えられる。高温での利用は、酵素の反応速度を増大させる（反応温度を10℃上昇させると、反応速度は約2倍になる）ので、処理時間を短くすることができ、用いる酵素量を少なくできる。

しかしながら、酵素は一般に熱に弱く、本処理システムでも、図2で示すように、ゼラチン膜の分解時間は、反応温度が高くなるほど短くなったが、実際は、

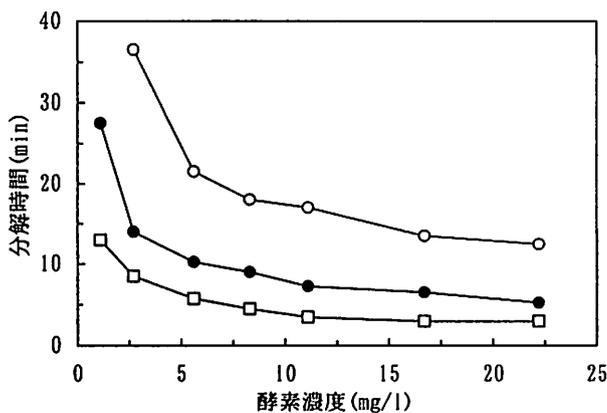


図2 ゼラチン膜分解への酵素濃度と温度の影響  
○ : 30℃ ● : 40℃ □ : 50℃

Effects of enzyme activity and temperature on decomposition of gelatin layers on X-ray film by an alkaline protease from *Bacillus* sp. B21-2

酵素の熱失活を考慮して装置を設計する必要があり、反応温度は40℃ぐらいが適当であった<sup>2)-4)</sup>。そこで、活性を低下させることなく、耐熱性に優れた酵素を用いることができれば、熱による失活も抑えられ、高温での繰り返し利用にも耐えられ、経済性の面からも望ましく、その有用性は更に増す。

酵素タンパク質の構造単位はアミノ酸からなり、酵素の耐熱性は、そのうちの1アミノ酸の置換によっても変化することが既に知られている<sup>5)</sup>。また、近年のバイオテクノロジーの進展により、酵素遺伝子を単離して、塩基配列を決定することにより、アミノ酸配列も決定できるようになった。そこで、酵素のアミノ酸配列を調べ、適切なアミノ酸を選んで置換すれば、この酵素の耐熱性を向上できると考えた。

これらのことから、本酵素の塩基配列とアミノ酸配列を決定し、アミノ酸置換を行うことにより、本酵素の耐熱化を行った。

## 2. 実験方法

### （1）使用菌株

土壌試料より分離した *Bacillus* sp. B21-2 を用いた。

### （2）PCR\*<sup>2)</sup> (Polymerase Chain Reaction)

以前の報告で、我々は *Bacillus* sp. B21-2 が産生するアルカリプロテアーゼ (AprN) について、N末端の20アミノ酸の配列を決定した<sup>6)</sup>。このアミノ酸配列と種々のアルカリプロテアーゼの相同配列から2種類のプライマーを作製し、PCRによる増幅反応を行った。反応は、92℃で2分、52℃で2分、72℃で3分を30サイクル繰り返し行った。

### （3）塩基配列の決定

塩基配列の決定は、島津 DNA sequencer DSQ-1 (島津製作所製) を用いて行った。

### （4）アミノ酸置換

アミノ酸置換は、Higuchi らの方法に従って、PCR法を用いて行った<sup>7)</sup>。

### （5）タンパク量の定量

タンパク量は、標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いて、BCA法によって測定した<sup>8)</sup>。

### （6）酵素活性の測定

酵素活性は、Horikoshiの方法に従って測定した<sup>9)</sup>。

\*<sup>2)</sup>分析したい塩基領域をはさんでプライマーを結合させ、合成反応で塩基を合成し、連鎖的に塩基の増幅を行う遺伝子増幅法。

\*<sup>1)</sup>アルカリ性で作用する蛋白質分解酵素

|       |           |           |            |                |           |            |            |                 |           |
|-------|-----------|-----------|------------|----------------|-----------|------------|------------|-----------------|-----------|
|       | 1         | 10        | 20         | 30*            | 40        | 50         | 60*        |                 |           |
| AprN: | -QTVPWG   | INRVQAPIA | QSRGFTGT   | GVRVAVLDTGI    | -SNH      | ADLRIRGGAS | FVPGEP-NIS | DGNHGHTHVA      |           |
| AprM: | -QTVPWG   | ISFINTQQA | HNRGIFG    | NGARVAVLDTGI   | -ASHP     | DLRIAGGAS  | FISSEP-SYH | DNNGHGHTHVA     |           |
| PB92: | AQSVPWG   | ISRVAQA   | AAHNRGLT   | GSGVKVAVLDTGI  | -STHP     | DLNIRGGAS  | FVPGEP-STQ | DGNHGHTHVA      |           |
| YaB:  | -QTVPWG   | INRVQAPIA | QSRGFTGT   | GVRVAVLDTGI    | -SNH      | ADLRIRGGAS | FVPGEP-NIS | DGNHGHTQVA      |           |
| BPN:  | AQSVPYG   | ISQIKAPAL | HSQGYTGS   | NVAVIDSGIDSSHP | DLKV      | AGGASMVP   | SETNPFQD   | NNSHGHTHVA      |           |
| E:    | AQSVPYG   | ISQIKAPAL | HSQGYTGS   | NVAVIDSGIDSSHP | DLNVR     | GGASFVP    | SETNPYQD   | GSSHGHTHVA      |           |
| Ca:   | AQTVPYG   | IPLIKADKV | QAQGFK     | GANYKVAVLDTGI  | QASHP     | DLNVVGGAS  | FVAGEA-YNT | DGNHGHTHVA      |           |
|       | 70        | 80        | 90         | 100            | 110       | 120        | 130        |                 |           |
| AprN: | GTIAALNNS | IGVLGVAP  | NVDLYG     | VKVLGASG       | SGSISGIA  | QGLQWAAN   | NGMHIANMS  | LSSAGSATMEQA    |           |
| AprM: | GTIAALNNS | IGVLGVAP  | SADLYAV    | KVLDNRNG       | SGSLASVA  | QIEWAINN   | NMHIINMS   | LSTSGSSTLELA    |           |
| PB92: | GTIAALNNS | IGVLGVAP  | NAELYAV    | KVLDNRNG       | SGSVSSIA  | QGLEWAGN   | NGMHVAVN   | SLGSPSPSATLEQA  |           |
| YaB:  | GTIAALNNS | IGVLGVAP  | NVDLYG     | VKVLGASG       | SGSISGIA  | QGLQWAAN   | NGMHIANMS  | LSSAGSATMEQA    |           |
| BPN:  | GTVAALNNS | IGVLGVAP  | SASLYAV    | KVLDGADG       | SGQYSWI   | INGIEWAI   | ANNMDVIN   | MSLGGPSGSAALCAA |           |
| E:    | GTIAALNNS | IGVLGVSP  | SASLYAV    | KVLDSTG        | SGQYSWI   | INGIEWAI   | SNNMDVIN   | MSLGGPTGSTALKTV |           |
| Ca:   | GTVAALDNT | TGVLGVAP  | SVSLYAV    | KVLDNSSG       | SGTYSGI   | VSGIEWAT   | TNGMDVIN   | MSLGGPSGSTAMKQA |           |
|       | 140       | 150       | 160        | 170            | 180       | 190        | 200        |                 |           |
| AprN: | VNQATASG  | VLVVAASG  | NSGAGN---- | VGFPARYA       | NAMAVGATD | QNNNRASF   | SQYAGLDI   | VAPGVGVQS       |           |
| AprM: | VNRANNAG  | ILLVGAAG  | NTGRQG---- | VNYPARYS       | GVMAVAVD  | QNGQRASF   | STYGP      | IEISAPGVNVNS    |           |
| PB92: | VNSATSRG  | VLVVAASG  | NSGAGS---- | ISYPARYA       | NAMAVGATD | QNNNRASF   | SQYAGLDI   | VAPGVNVQS       |           |
| YaB:  | VNQATASG  | VLVVAASG  | NSGAGN---- | VGFPARYA       | NAMAVGATD | QNNNRATF   | SQYAGLDI   | VAPGVGVQS       |           |
| BPN:  | VDKAVASG  | VVVAAAAG  | NEGTSGS    | SVGYPGKY       | PSVIAVGA  | VDSNQRAS   | FSSVGP     | ELDVMAPGVSIQS   |           |
| E:    | VDKAVSSG  | IVVAAAAG  | NEGSSG     | STVGYPAKY      | PSVIAVGA  | VNSNQRAS   | FSSAGS     | ELDVMAPGVSIQS   |           |
| Ca:   | VDNAYARG  | VVVAAAAG  | NSGSSG     | NTNTIGYPAKY    | DSVIAVGA  | VDSNQRAS   | FSSVGA     | ELEVMAPGAGVYS   |           |
|       | 210       | *         | 220        | 230            | 240       | 250        | 260        | 268             |           |
| AprN: | TVPNGYSS  | FNGTSMAT  | PHVAGVA    | ALVKQKNP       | SWSNVQIR  | NHLKNTAT   | NLGN       | TQFGSLVN        | AEAAATR   |
| AprM: | TYTGNRY   | VLSGTSMA  | TPHVAGVA   | ALVKSRYP       | SYTNNQIR  | QRINQTAT   | YL         | GSPSLYGN        | LVHAGRATQ |
| PB92: | TYPGSTYA  | SLNGTSMAT | PHVAGAA    | ALVKQKNP       | SWSNVQIR  | NHLKNTAT   | SLG        | STNLYG          | SLVN      |
| YaB:  | TVPNGYAS  | FNGTSMAT  | PHVAGVA    | ALVKQKNP       | SWSNVQIR  | NHLKNTAT   | NLGN       | TQFGSLVN        | AEAAATR   |
| BPN:  | TLPGNKY   | GAYNGTSM  | ASPHVAGA   | AAALILSK       | HPNWTNTQ  | VRSSLENT   | TTKL       | GDSFY           | YGKGLINV  |
| E:    | TLPGGTY   | GAYNGTSM  | ATPHVAGA   | AAALILSK       | HPTWTNAQ  | VRDRLEST   | ATYL       | GN              | SFY       |
| Ca:   | TYPTSTY   | ATLNGTSM  | ASPHVAGA   | AAALILSK       | HPNLSASQ  | VRNRLS     | STATYL     | GS              | SFY       |

図3 AprN と種々のアルカリプロテアーゼのアミノ酸配列

\* : 触媒部位, □ : 変異部位

Primary structural homology of AprN with sequences of other alkaline proteases

### 3. 結果と考察

#### (1) *Bacillus* sp. B21-2 のアルカリプロテアーゼ遺伝子のクローニング (単離)

2種のプライマーを用いた *Bacillus* sp. B21-2 の染色体 DNA の PCR により, 約 650 塩基の増幅断片が得られた。この得られた断片をもとに, さらにサザンプロティ

ング<sup>\*3)</sup>を行うことにより, 約 6,000 塩基のアルカリプロテアーゼ遺伝子を含む領域を単離した。

#### (2) アルカリプロテアーゼの塩基配列の決定

アルカリプロテアーゼの塩基配列の決定を行ったところ, 27 アミノ酸からなるシグナル配列, 84 アミノ酸からなるプロ配列に引き続き, 268 アミノ酸 (分子量 26,700) からなるアルカリプロテアーゼの配列が得られた。

#### (3) アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列の比較

今回得られたアルカリプロテアーゼ (AprN) のアミノ酸配列を, 種々のアルカリプロテアーゼ [AprM<sup>(10)</sup>,

\*<sup>3)</sup>目的とする塩基を特異的に検出する方法で, ある塩基断片を指標とすることにより, それ自身と相補的な塩基配列をもつ領域を検出する方法。

subtilisin BPN<sup>11)</sup> (図中 BPN), subtilisin E<sup>12)</sup> (図中 E), subtilisin Carlsberg<sup>13)</sup> (図中 Ca), YaB elastase<sup>14)</sup>, PB92 protease<sup>15)</sup> のアミノ酸配列と比較した (図3)。その結果, AprN のアミノ酸配列は, これらのアルカリプロテアーゼと高い相同性 (56%~99%) が認められ, 活性発現に関与する3つのアミノ酸 (\*印で示す) も保存されていた。また, 図3に示した subtilisin BPN<sup>11)</sup> のアルカリプロテアーゼといくつかのアルカリプロテアーゼについては, 既に立体構造が決定されており, これらのアルカリプロテアーゼの全体構造は, お互い非常に似かよっていることが示されている<sup>16)-18)</sup>。これらのアミノ酸配列と立体構造の相同性から考えると, AprN の立体構造も; subtilisin BPN<sup>11)</sup> のアルカリプロテアーゼと同様の立体構造を持つと考えられる。

#### (4) $\beta$ -ターン構造へのプロリンの導入による耐熱性の向上

今回我々は, 酵素の立体構造中, 折れ曲がりの位置 ( $\beta$ -ターン) にあるアミノ酸を, プロリンに置換することにより耐熱化を試みた。

プロリンを選んだのは, 次の理由からである。

①プロリンは, 他の19種類のアミノ酸とは異なり, 主鎖から伸びた側鎖の結合が, 再び主鎖に戻る特徴的な構造をしており, 結果的に主鎖の角度を固定し柔軟性が減少し, 強固なターン構造を構成するのに適している。②プロリンは,  $\alpha$ -ヘリックスを壊して $\beta$ -ターン構造にするアミノ酸であり, タンパク質構造を球形に保つ上では重要な役割を担っている。③ $\beta$ -ターン構造へプロリンを導入すると, タンパク質は, 主鎖のコンホメーションと全体の構造を劇的に変化させないかぎり, 全体のエントロピーも減少し, より堅固な構造をとる。

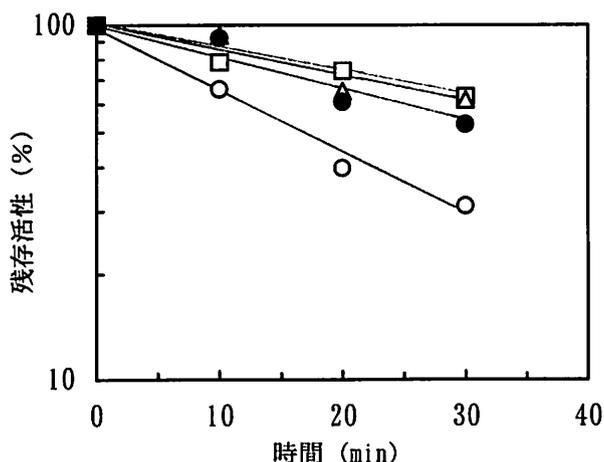


図4 アルカリプロテアーゼおよびその変異型酵素における安定性 (55°C) の比較

○:wild-type □:A38P △:A165P ●:A187P

Heat inactivation of wild-type and mutant enzymes

AprN の $\beta$ -ターンの位置を決める必要があるが, 構造既知の subtilisin BPN<sup>11)</sup> のアルカリプロテアーゼの立体構造を元に, この酵素の $\beta$ -ターンの位置にあると予想される 38, 165, 187 番目のアラニン (A) 残基 (図3で四角で囲った部位) を置換部位として選択した。

置換を行った酵素について, 熱安定性を調べるため, 酵素を pH9.5, 55°C に 30 分保持し, 残存活性を 30°C で測定した。その結果, 図4に示すように 38 番目のアラニンをプロリンに置換した変異酵素 A38P, 165 番目のアラニンをプロリンに置換した変異酵素 A165P, 及び 187 番目のアラニンをプロリンに置換した変異酵素 A187P のいずれについても, 酵素活性は, 野生型酵素の残存活性 (31%) よりも, 3 種の変異酵素共に高い値 (63%, 62% 及び 53%) を示しており, 耐熱性が向上していることがわかった。また, これらの変異酵素の比活性は, 野生型酵素の 110~115% であった<sup>19)</sup>。

これらの結果から, 本酵素の $\beta$ -ターンの位置にあると予想される部位にプロリンの導入することにより, 活性を低下させることなく, 耐熱性を向上させることができ, 酵素のより高温での利用が可能となることがわかった。この方法は, 他の酵素にも応用可能で, 活性を損ねずに熱耐性を向上させる技術として非常に重要であると思われる。

#### 4. まとめ

今回, 我々が開発した酵素を, 工業的利用に更に適したものとするため, タンパク質工学的手法を用いて,  $\beta$ -ターン構造にプロリンを導入することにより, アルカリプロテアーゼの耐熱化を行った。一方, 酵素反応は, 反応温度だけでなく作用最適 pH にも特異性がある。我々は, 本酵素についてタンパク質工学的手法を用いて, 最適 pH をアルカリ側にシフトさせることにも成功している<sup>19)</sup>。このように, 工業的に利用できる特異性のある酵素を開発する方法として, 従来の自然界からのスクリーニングだけでなく, タンパク質工学的手法による特異性の改変も重要であると言える。今後, 結晶解析などの物理化学的手法やコンピュータケミストリーの進展により, より計画的な工業的利用に適した酵素特異性の改変が可能となるであろう。

#### 参考文献

- 1) N. Fujiwara, and K. Yamamoto, J. Ferment. Technol., 65, 345 (1987)
- 2) 藤原信明, 山元和彦, 醱酵工学会誌, 65, 531 (1987)

- 3) 藤原信明, 都宮孝彦, *BIO INDUSTRY*, **5**, 201 (1988)
- 4) N. Fujiwara, T. Tumiya, T. Katada, T. Hosobuchi, and K. Yamamoto, *Process Biochem.*, **24**, 155 (1989)
- 5) T. Imanaka, M. Shibasaki, and M. Takagi, *Nature*, **324**, 695 (1986)
- 6) N. Fujiwara, A. Masui, and T. Imanaka, *J. Biotechnol.*, **30**, 245 (1993)
- 7) R. Higuchi, B. Krummel, and R. K. Saiki, *Nucl. Acids Res.*, **16**, 7351 (1988)
- 8) P. K. Smith, I. R. Krohn, T. G. Hermanson, K. A. Mallis, H. F. Gartner, D. M. Provenzano, K. E. Fujimoto, M. N. Goeke, J. B. Olson, and C. D. Klenk, *Anal. Biochem.*, **150**, 76 (1985)
- 9) K. Horikoshi, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1407 (1971)
- 10) A. Masui, N. Fujiwara, and T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3579 (1994)
- 11) A. Wells, E. Ferrari, D. J. Henner, D. A. Estell, and E. Y. Chen, *Nucl. Acids Res.*, **11**, 7911 (1983)
- 12) M. L. Stahl, and E. Ferrari, *J. Bacteriol.*, **158**, 411 (1984)
- 13) M. Jacobs, M. Eliasson, M. Uhlen, and J. -I. Flock, *Nucl. Acids Res.*, **13**, 8913 (1985)
- 14) R. Kaneko, N. Koyama, Y. -C. Tsai, R. -Y. Juang, K. Yoda, and M. Yamasaki, *J. Bacteriol.*, **171**, 5232 (1989)
- 15) J. C. Van Der Laan, G. Gerritse, L. J. S. M. Mulleners, R. A. C. Van Der Hock, and W. J. Quax, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 901 (1991)
- 16) D. J. Neidhart, and G. A. Petsko, *Protein Eng.*, **2**, 271 (1988)
- 17) J. M. Van Der Laan, A. V. Teplyakov, H. Kelders, K. H. Kalk, O. Misset, L. J. S. M. Mulleners, and B. W. Dijkstra, *Protein Eng.*, **5**, 405 (1992)
- 18) C. S. Wright, R. A. Alden, and J. Kraut, *Nature*, **221**, 235 (1969)
- 19) A. Masui, N. Fujiwara, K. Yamamoto, M. Takagi, and T. Imanaka, *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 30 (1998)