

バイオ洗剤とスクリーニング

伊藤 進

この特集の依頼を受けた時、仮題として「バイオ洗剤開発秘話」が提案された。筆者がいた会社は1987年に従来の1/4の大きさの超小型化バイオ洗剤「A」を発売したが、それ以来何年も好調な売り上げを続けている。今や世界の6割以上がこの小型洗剤が主流になっているらしい。発売当時、この超小型化洗剤は各新聞紙、夕刊タブロイド紙、漫画本、ノベルブックを含め内外のジャーナリズムを賑わせたが、今の大学生以降の年代は昔の大箱洗剤の記憶がない。

実はこの洗剤にはアルカリセルラーゼが配合されており、その後、高アルカリプロテアーゼも加えられた。筆者らは、これらの洗剤用酵素を開発して数多くの特許、論文、総説を書いてきた。一部の教科書にも掲載されているが、ジャーナリズムの取材はまったく受けていないので、「秘話」が若い研究者に小さな刺激ぐらいにはなると担当の先生が思ったのだろう。しかしながら、すでに「サクセス・ストーリー」ができて上がっているのです、本稿では「小話」程度を綴ってみたいと思う。

スクリーニングとは

筆者は、長い間花王株式会社の研究所に勤務した。その後、海洋研究開発機構に移り、北海道大学の研究所を兼務してから一貫して有用微生物や酵素のスクリーニングをやってきた。沖縄は日本で唯一の亜熱帯地方だから生物（遺伝子）資源の多様性が期待され、琉球大学に転任してからもそのつもりでいた。しかし、ここ7、8年はスクリーニング研究に躊躇している自分に気づいている。企業や大学でも、スクリーニングを研究テーマにすると成果がなかなかでないことがあるので二の足を踏むようである。

応用微生物研究分野において、「スクリーニング」とは何を意味しているのだろうか？ ウィキペディアによると、生物学では以下の説明がされている。

1. 土壌や水中などの自然環境中から目的とする微生物を探索すること
2. ゲノムから目的の遺伝子または遺伝子群を探索すること
3. 微生物の産生物の中から目的とする物質（タンパク

質や抗生物質など）を探索すること

4. 特定の物質の生産能または分解能を有する微生物を選択的に得ること

要するに、目的の微生物、遺伝子、酵素、生理活性物質などを「ふるい（篩）」にかけて選択して取得することを「スクリーニング」と考えていいと思う。本稿では、産業（工業）用酵素、特に洗剤用酵素の話に限定して筆を進めていく。意外と思われるだろうが、医薬用を除いた工業（産業）用酵素の世界市場の3-4割が洗剤用酵素である。安価な大量消費財である洗剤のほとんどにアルカリプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、リパーゼなどの酵素が配合されているからである¹⁻³⁾。

好アルカリ性細菌とは、高いpHで生育できる微生物の総称である。これらの微生物は、アルカリの温泉、湖や地下熱水中に生息している場合も多いが、意外なことに何の変哲もない身の回りの土壌や動植物から簡単に分離できる。おそらく、自ら周りの環境をアルカリにして増殖しているためである。Naイオンを必要とする好アルカリ性細菌（Naイオンが存在すると中性で生育できる）とアルカリpHでしか生育できない絶対的好アルカリ性細菌に大別される。これらの好アルカリ性細菌は、多種多様のアルカリ酵素を菌対外に分泌している¹⁻³⁾。

自然界からの酵素生産菌のスクリーニングは、「不必要な酵素を振るい落とす」のではなく、「欲しい酵素を選択的に拾い出す」ことに力点が置かれていなければならないし、「欲しい酵素」を初めから決めておく必要がある。筆者が言う「欲しい酵素」とは、たとえばプロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼといった一般的な酵素を意味していないこと、たまたま発見した酵素とその生産菌に新規性があったからといって、慌ててその用途を探して成功した試しはほとんどないことを念頭に置いてを讀んでいただきたい。

洗剤用酵素のスクリーニング

筆者はある雑誌に、有用酵素は「出藍の誉れに敵うものはない」「青は藍より出だし藍より青く」と書いたことがある。これは、素人集団だった筆者らがスクリーニングから自社生産に漕ぎ着けた洗剤用酵素開発の経験を

表現したものである。かえって読者を混乱させる格言だが、スクリーニングをする場合、主要な要件・条件を満たす酵素（出藍の誉れ）の生産菌を見つけないと開発は成功しないという意味なのである。差別的な言い方になるかも知れないが、粗削りでも生まれながらの才能（機能）を持った酵素でなければ市場にデビューすることは不可能に近い。

実際に、洗剤酵素は以下の要件を満たす必要がある⁴⁾。

- ①洗浄力が向上しなければならない
- ②最適pHがアルカリにあり、アルカリpHで安定
- ③洗浄成分（界面活性剤やキレート剤）耐性がある
- ④漂白剤耐性がある
- ⑤耐熱性がある
- ⑥保存安定性がある
- ⑦安価に菌体外に大量生産できる

日本の場合、⑧水道水の温度でも活性を十分有する、が加えられる。

では、これらすべての条件を満たす洗剤用酵素生産菌のスクリーニング手法はあるのだろうか？ 答えは、「否」である。人間の都合で微生物が進化して多様性を獲得してきた訳ではないからである。洗剤用酵素の「出藍の誉れ」なる性質とは、おそらく①と②である。しかし、初めから洗浄性がある酵素の生産菌をスクリーニングで確認する手段はない。だから、まず②の条件を満たすアルカリ酵素生産菌を分離し、培養し、少量生産された酵素を精製し、そして洗剤開発部門の洗浄試験に合格するという2番目のスクリーニングの壁を乗り越える必要がある。

最初はどここの洗剤会社でも共通の人工汚染布による洗浄試験を行うが、たとえば「頑固な」タンパク汚れの正体は汗、皮脂とケラチンが混合した「垢」だから、洗剤用プロテアーゼはケラチンを分断する酵素でなければならない。木綿布に顔や首などの垢を丹念に何回も擦り付けた汚染布を用いた洗浄試験で、スクリーニングされたプロテアーゼが選別されて行く。最後の関門は、実際に着て汚れた下着やワイシャツを使って洗浄し、無作為に抽出されたパネルに目で見ても明らかに綺麗になっているか判定して貰う。消費者は感性があって賢いのである。その判定結果を統計学的処理し、最終候補に残るのが「出藍の誉れ」高き酵素の候補となる。この時点で、③と④がクリアされている場合もある。⑤と⑥は、また別の次元で解決していかなければならない課題である。製造工程や商品として店頭で洗剤が並んだ際、造粒した酵素が失活しない工夫をして製品保証する技術が必須となる。

筆者らは、気の遠くなるこの作業を何千回と繰り返した。洗浄評価をする研究者は、商品化と社運がかかって

いるから安易な妥協をしてくれないのである。

洗剤用酵素のアルカリ適応

洗剤用酵素として使用量が圧倒的に多いのがアルカリプロテアーゼである。現在、分子質量約26–30 kDa、最適pHが11–12で耐熱性のあるズブチリシン様高アルカリプロテアーゼが生産され、世界のほとんどの衣料用（重質）洗剤に配合されている。ケラチンなどの硬タンパク質をよく分解するアルカリプロテアーゼを生産する好アルカリ性*Bacillus*が分離源である。筆者らも高アルカリプロテアーゼ（M-プロテアーゼ）の工業生産に成功し、衣料用洗剤に配合されている⁵⁾。従来、中性*Bacillus*由来のセリンアルカリプロテアーゼ（ズブチリシン）が使われていた。

高アルカリ酵素群と中性*Bacillus*由来の中程度アルカリ酵素群の系統樹をみると、40個前後のアミノ酸の枝（置換）で隔たっている⁵⁾。高アルカリM-プロテアーゼの立体構造を解析すると、明瞭にN-半球とC-半球に分かれており、これらのアミノ酸置換の大半はC-半球に集中している（図1）。最適pHが高アルカリ側にシフトする進化過程でC-半球に数10箇所のアミノ酸置換が必要だったことを示唆しており、タンパク質工学を用いて中性酵素をアルカリ酵素に改変できる可能性はほとんどない。

さらに、N-半球のArg19がC-半球のGlu265とArg269の間で3Å前後の距離で3重の塩橋（イオンペア）を形成している。これら3つのアミノ酸は、ズブチリシンBPN'などの中程度アルカリ酵素では中性アミノ酸Glnである。アミノ酸置換のC-半球への集中と3重イオンペア

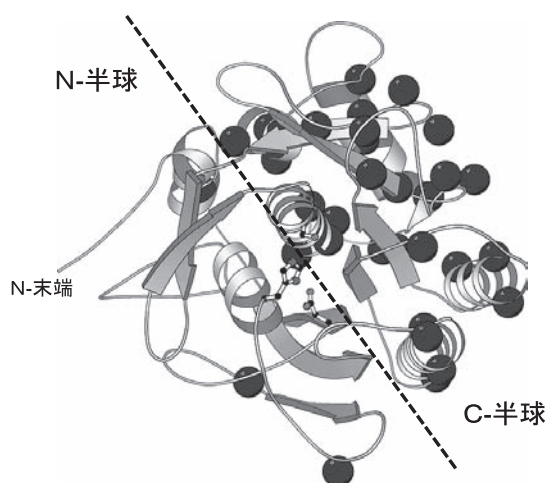


図1. 高アルカリプロテアーゼのアミノ酸置換。 *Bacillus* sp. KSM-K16株のM-プロテアーゼの立体構造である。破線でN-半球とC-半球の境目を示している。中程度アルカリズブチリシンBPN'の構造と比較すると、C-半球で40個前後のアミノ酸が置換されている（●）。

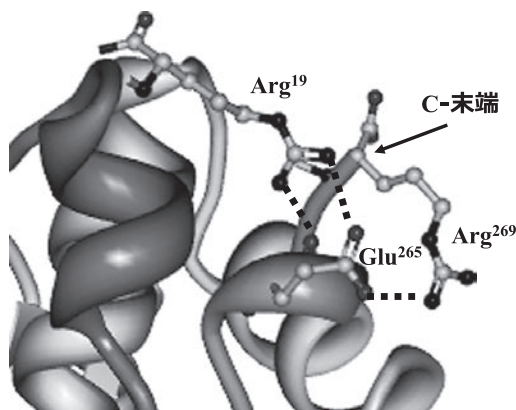


図2. 高アルカリプロテアーゼのN-末端とC-末端の3重塩橋. M-プロテアーゼの立体構造を見ると, C-末端のGlu271とArg275の間, さらにGlu271がN-末側のArg19が約3 Åの距離で塩橋を形成している. ズブチリシンBPN'などでは, この3つの塩橋形成アミノ酸がGln271, Gln275, Gln19などの中性アミノ酸に置換されていて塩橋を形成できない.

の形成が耐アルカリと耐熱性の理由と思われる(図2)^{4,5)}. これらの3重イオンペア形成アミノ酸をタンパク質工学で他のアミノ酸に置換すると, アルカリ側で耐熱性が著しく劣るようになる.

一方, 菌体外酵素の進化論的な耐アルカリ性獲得機構はきわめて特徴的である. アルカリプロテアーゼの場合, アルカリ適応過程で獲得されたと考えられる3つのArg残基がGluあるいはTyr残基と新たにイオンペア形成を獲得している. 一方, Lys-Aspのイオンペアが消失する(図3)⁶⁾. 同様な適応は, アルカリアミラーゼやアルカリセルラーゼでも起きており, アルカリ適応はArg(とHis)の増加, LysとAspの減少を伴っている⁵⁾. 中性酵素がアルカリ環境下に置かれた時, 酵素の表面上でなんらかの適応を迫られたのだろう. アルカリ適応しようとして酵素が取った手段は, LysとAspを捨て, ArgとHisを獲得して新たなイオンネットワークを形成してイオンペアのリモデリングを行い, アルカリ環境下でチャージバランスを保つことだったと考えられる. アルカリ側ではLysよりもArgとHisはイオン化しており, 酸性アミノ酸とイオンペアが作りやすく, アルカリで安定な構造になるように進化していったのだろう.

洗剤用アルカリセルラーゼ

アルカリセルラーゼ(KAC, endo-1,4-β-glucanase)は, 筆者らが日本の世界で初めて工業生産に成功し, 衣料用超小型化洗剤に配合された⁷⁾. この開発が, 「うぶな」筆者らをマスコミに巻き込み, 困惑させた理由である. KACは最適温度が低く(40℃), 日本の低温洗浄習慣に

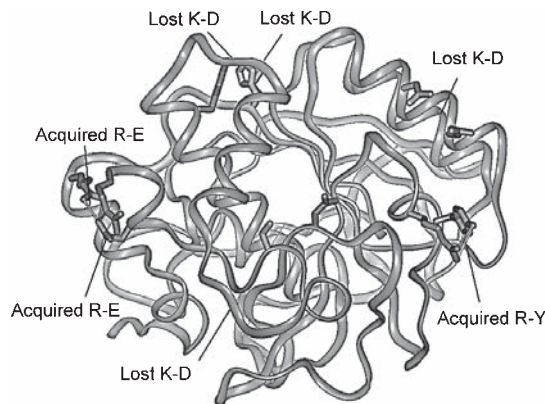


図3. 高アルカリプロテアーゼのアルカリ適応におけるイオンネットワーク. アルカリ適応で, 酵素表面で獲得した(acquired)イオンペアと消失(lost)したイオンペアを示している.

適合している. 本酵素は, 各種界面活性剤, キレート剤, プロテアーゼなどの洗剤成分にも耐性がある.

デンプンやタンパクの汚れは繊維の表面に存在するが, 頑固な汚れは木綿繊維の非晶部に閉じ込められているので, 着古した木綿肌着にKACを入れて繰り返し洗浄すると肌着中の残脂量が減少し白さが増して行く⁴⁾. KAC配合洗剤で木綿肌着を100回繰り返し洗濯しても繊維の重量の損失, 引っ張り強度, 重合度とフィブリル化度(毛羽立ちの尺度)の低下などがほとんど認められないのは, KACが結晶性セルロースを分解しないからである. セルラーゼの洗浄機構と, セルラーゼなどを配合したら衣類がボロボロになるという世間の噂を打ち消したのは洗剤開発部門の研究者たちである. 筆者らとて, 当初は懐疑的な気持ちでスクリーニングをしていた記憶がある.

洗剤用酵素のタンパク質工学

さて, 「藍より青く」するタンパク質工学による改良研究について述べてみたい(本来は「師を弟子が超える」の意). 読者の多くは, タンパク質工学を使えば野生型酵素の改変は簡単だし当然の成り行きだと考えるだろう. 結論から先に書くとそれは論文や教科書の深読みである. 洗剤用酵素ばかりではなく, 酵素が100種類あれば100種類の独自高次構造を有している. 遺伝子治療でもSNPがあるように, 洗剤用酵素の場合でも仕立屋がsnip(鋏でチョキチョキする)するように立体構造(体型)に合わせてテイラーメイド(tailor made), それもフルオーダーで改良酵素を創製しなければならない場合が多い³⁾.

そのような中で, アルカリプロテアーゼの改変はやり

尽くされた感がある。分子量が小さいので、耐熱化、基質特異性の改変、キレート剤耐性化、酸化剤耐性化などが主に特許でタンパク質工学の先駆的成果として多数報告されている。野生型酵素の一大欠点は、漂白剤（酸化剤）耐性がなかったことであるが、活性残基であるセリンの隣のメチオニンを非酸化性アミノ酸で置換することによって解決された。ただ、この改変組換え酵素は比活性をかなり落としてしまう。筆者らは、洗浄力に優れた酸化剤で高活性の酸化剤耐性高アルカリプロテアーゼのスクリーニングに成功した。また、酸化剤耐性アルカリアミラーゼも発見している。進化系統樹を作成したところ、これら新規酸化剤耐性酵素は、既知酵素群と遠く隔たったクラスターを形成していた^{3,5,6)}。ここでもスクリーニングの重要性が証明されたのである。

洗剤酵素の大量生産法

先に述べた洗剤用酵素の洗剤酵素の要件⑦が残っている。洗剤用酵素の市場価格は異常に安い。突然変異法であれ遺伝子組換え法であれ、培養液に数g/lから30 g/l前後の酵素を菌体外生産する技術が必要である³⁾。どちらの手法が大量生産に有利かは断定できないが、改良酵素を安価に大量生産するには組換え法に頼らざるをえない。かつて、生産性が数10 mg/l～2, 3 g/lなのにoverproductionとかhyperproductionとタイトルに書かれている論文を見て少なからず苛立った記憶がある。いずれにしても、この超高生産発酵の技術開発にも「バイオ洗剤開発秘話」がある。守秘義務もあり、紙面がもう少なくなってきたので、割愛することをお許し願いたいと思う。詳しくは、学術論文ではなく特許検索をして頂きたい。

スクリーニングの新たな試み

1 gの土壌中には数10億もの細菌が存在しているといわれている。Gansらの論文によると、細菌の全菌数は 2×10^9 /gで800万種と膨大な数であり、 10^5 /g以下の細菌が多様性の99.9%を占めているという⁸⁾。一方、教科書や総説などでは、自然界の微生物のほとんどが難培養微生物であり、培養・分離可能な微生物は、1%以下、1%程度、いやいや10%だと書かれているが、簡単にいえば顕微鏡下での菌数と（平板）培地で生育する集落数を比較したものである。Amannらは⁹⁾、それまでの知見を集め、培養可能な微生物は分離源によって0.001～15%のバラツキがあると述べている。そもそも顕微鏡で正確に菌数（種）を計測できるのか、培地や培養条件が適切であったのかは誰にもわからないのであるが、土壌は0.3%であるのに対し、活性汚泥が15%なのはすでに集積されているからであろう。

最近、目的酵素のDNAを環境から直接抽出（クローニング）して遺伝子解析するメタゲノム的手法が注目されている。Metagenomeとは、「多様な複合微生物ゲノムの集合体」という意味である¹⁰⁾。環境から抽出された微生物ゲノムから培養しないで目的遺伝子を取得する方法はメタゲノムスクリーニングと呼ばれ、一長一短な手法であるが難培養微生物が主なターゲットである¹¹⁾。非効率で重設備が必要なので、目的遺伝子の集積、宿主・ベクター系、スクリーニング・システムなどの改良研究が盛んに行われている。一番の欠点は、産業用酵素の要件を満たす酵素をスクリーニングできる手法までには至っていないことだろう。事実、酵素メーカーでもこの手法を使い出したが、期待された程の成果は上がっていない。

考えてみれば、1 gの土壌中には培養可能な微生物は 10^7 程度いる訳で、まったく環境が異なる場所から100サンプル採集すれば何もメタゲノムスクリーニングしなくてもよいという考え方もできる。しかし、筆者はこのような手法はいずれスクリーニングの主流のひとつになっていくだろうと予測している。スクリーナーは、手段を選んではならないし選ばないのである。

終わりに

バイオ洗剤は、世界の最先端技術の塊のようなものである。筆者が洗剤用酵素の開発に携わってから30年近くが過ぎようとしている。筆者は「辛かった、楽しかった」と過去形で言える立場にあるが、我が戦友達は今でも新しい洗剤酵素の開発研究に邁進していると聞く。バイオ洗剤は、適正価格を無視して安価な傾向が続いている。本当の「秘話」は、いずれ彼らが語り、そして真のサクセス・ストーリーの主人公になるのだと思う。一緒に洗剤用酵素を開発してくれた仲間の名前を敢えて書かないが、これも「秘話」の一つと思って頂ければ幸いである。

文 献

- 1) Horikoshi, K.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 735 (1999).
- 2) Ito, S. *et al.*: *Extremophiles*, **2**, 185 (1998).
- 3) Ito, S.: *Extremophiles Handbook*, p.230, Springer Verlag (2011).
- 4) Hoshino, E. and Ito, S.: *Enzymes in Detergency*, p.149, Marcel Dekker, New York, USA (1997).
- 5) Shirai, T. *et al.*: *Protein Adaptation in Extremophiles*, p.105, Nova Science Publishers, Hauppauge, USA (2008).
- 6) Saeki, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 501 (2007).
- 7) Ito, S.: *Extremophiles*, **1**, 61 (1997).
- 8) Gans, J. *et al.*: *Science*, **309**, 1387 (2005).
- 9) Amann, R. I. *et al.*: *Microbiol. Rev.*, **59**, 143 (1995).
- 10) Handelsman, J. *et al.*: *Chem. Biol.*, **5**, R245 (1998).
- 11) Uchiyama, T. and Miyazaki, K.: *Cur. Opi. Biotech.*, **20**, 616 (2009).