

Bacillus sp. AAH-31 株由来耐熱性アルカリ α -アミラーゼの 高機能化に関する研究

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野
玉村 尚也

(背景と目的)

アルカリアミラーゼは、澱粉汚れの除去を目的に洗剤用酵素として利用されてきた。しかし、近年、自動食器洗浄機の普及に伴い、耐熱性と耐アルカリ性を兼ね備えた酵素が求められている。我々はこれまでに好熱性・好アルカリ性アミラーゼ生産能を指標として土壌から *Bacillus* sp. AAH-31 株を取得し、本菌株の α -アミラーゼ (AmyL) がアルカリ pH で最適に作用し、優れた耐熱性、キレート剤耐性を有する酵素であることを明らかにしている。しかし、AmyL の活性が低く、現状では実用化が難しい。そこで、本研究では AmyL を改変し、活性を向上させた変異酵素を開発した。

(結果および考察)

AmyL と高い配列類似性を示す *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 由来 TVAI の立体構造を鋳型として、AmyL の構造を推測した。基質結合部位を構成する 26 アミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した変異酵素を作製した (Gly については類縁酵素群で保存されているアミノ酸残基に置換した)。変異酵素のうち、可溶性澱粉に対する活性がそれぞれ野生型の 233%、257%、181% および 162% に向上した Y398A、H403A、I481A および K521A が得られた。Tyr398、His403 および Ile481 はサブサイト-2 周辺に、Lys521 はサブサイト+2 周辺であった。次に Tyr398、His403、Ile481 および Lys521 位のアミノ酸残基の最適化を行った。その結果、Tyr398 位では Ser、His403 位では Ala、Ile481 位では Ala、Lys521 位では Met が最適であり、Y398S、H403A、I481A および K521M の可溶性澱粉に対する活性はそれぞれ野生型の 261%、257%、181% および 179% であった。サブサイト-2 周辺に位置している Tyr398、His403 および Ile481 は、側鎖の小さなアミノ酸残基への置換により活性が向上する傾向が見られた。このことから、サブサイト-2 周辺における立体障害が解消されることで可溶性澱粉に対する活性が向上したと考えられた。また、サブサイト+2 周辺に位置する Lys521 では電荷を持たないアミノ酸残基の導入により活性が向上する傾向がみられたことから、Lys のアミノ基と基質の相互作用は可溶性澱粉への活性に好ましくないと考えられた。最適化された変異を組合わせた多重変異酵素を作製した。サブサイト-2 および+2 に位置する変異を組合わせた 2 重変異酵素では活性が相乗して向上した。一方、サブサイト-2 周辺に位置する変異を組合わせた 2 重変異酵素では、活性に大きな変化はなかった。3 重変異酵素および 4 重変異酵素は、2 重変異酵素より活性が低く、pH と温度における安定性の低下がみられた。多重変異酵素の中で、Y398S/K521M は可溶性澱粉に対する活性が野生型の 340% であり、得られた中で最も活性が高い変異酵素であった。