「酵素利用技術」特集

バイオテクノロジーを利用した繊維加工
—プロトペクチン可溶化酵素による繊維精練を中心に—

阪 本 龍 司

1. はじめに

バイオテクノロジーは組換えDNA技術、細胞融合技術、動植物の細胞大量培養技術、バイオリクター技術、タンパク質工学技術を根幹とした学問であり、農業、化学、医薬品、食品工業など幅広い分野で応用されている。繊維工業においてもバイオテクノロジーは深く関係しており、天然繊維の品質改良や高分子繊維の創成などに利用されている。また、酵素による繊維加工も近年急速に発展している。現在では産業用酵素の約20%を繊維加工用酵素が占めるまでに成長し、その多くのものは遺伝子組換え菌により生産されている。本稿では酵素と遺伝子工学の基礎および繊維加工における酵素の利用を概説し、さらに綿繊維の精練への応用が注目されているプロトペクチン可溶化酵素(プロトペクチナーゼ; PPase)について紹介する。

2. 酵素の基本的性質

酵素はタンパク質からできている生体触媒であり、すべての生物の生体内で起る化学反応は酵素の触媒作用により行われる。酵素による反応速度は化学触媒と同様に反応温度やpHなどにより影響を受けるが、一般的な酵素では最適温度は40-60℃、最適pHは3-11の中性付近にある。そのため、酵素は化学触媒に比べマイルドな条件で反応を加速させることができる。酵素の触媒作用の大きな特徴は、酵素と基質との間には“鍵と鍵穴”のような関係があることである。つまり、一つの酵素は一つの基質、あるいはある限られた基質とだけ反応することができる。

これを基質特異性と呼ぶが、酵素を応用するには目的に応じて最も適した基質特異性と最適作用条件をもつ酵素を選択しなければならない。また、酵素はタンパク質であるため、熱、pHなどの様々な物理化学的要因により容易に変性し、触媒機能を失うので、使用に際しては安定性も十分に考慮する必要がある。

3. 遺伝子工学とタンパク質工学

酵素は動物、植物、微生物などすべての生物に存在するが、工業的に大量消費される酵素の大部分は生育が速く、培養の容易な微生物を用いて生産される。酵素の工業生産は、目的に適した酵素の生産菌を自然界より単離し、それに人為的な変異を加えて、酵素生産力を増強させることにより行われてきた。

しかし、近年では遺伝子操作技術の進歩により、工業用酵素の8割以上がDNA組換え菌によって生産されている。DNA組換え菌の獲得は、目的の酵素をコードする遺伝子を単離(クローニング)することから始まるが、その基本的な操作法を図1に示す。まず、目的酵素を生産する生物の染色体を制限酵素で分解し、これをベクターと呼ばれる遺伝子運搬体と連結することにより、DNA組換えベクターを作成する。次にこれを宿主菌に導入し、標的遺伝子の組み込まれたDNA組換え菌をコロニーハイブリダイゼーションなどの方法により選択する。DNA組換え菌は菌体内に多数のDNA組換えベクターを増幅させて、多量の遺伝子産物(酵素)を生産する。遺伝子のクローニング法にはいくつかの手段があるが、最近では耐熱性DNAポリメラーゼを用いたPolymerase Chain Reaction(PCR)

Biotechnological Processing of Textiles: Refinement of Cotton Fiber Using Protopectin-solubilizing Enzyme

著者紹介 TATSUJI SAKAMOTO

Department of Applied Biological Chemistry, Osaka Prefecture University

大阪府立大学農学部応用生物化学科 助手 農学博士

著者は、応用微生物学を専門とされている。趣味は、旅行、スポーツ鑑賞とのこと。

本稿では、酵素の基礎について解説し、さらにプロトペクチナーゼを用いた繊維精練を中心に、酵素のもつ潜在能力と、繊維業界における酵素の新たな用途開発の必要性について述べていただいた。

図1 遺伝子クローニングの手法

法が最も強力な方法である。また、宿主菌としては工業用酵素の生産では、分泌能と安全性に優れている枯草菌や麹菌が主に用いられる。大腸菌は遺伝子発現調節機構が最もよく研究されている微生物であるが、本菌により生産される遺伝子産物は菌体内に蓄積されるため、細胞内容積による蓄積量の制限と目的タンパク質を取り出すための精製コストの上昇が問題となり、宿主菌としては適していない。

一方、タンパク質工学は目的にかなった性質や機能をもつタンパク質を人工的に作ることを可能にした。これはクローン化した遺伝子内のある特定の塩基を変異させ、タンパク質中の活性発現や安定性に関与するアミノ酸残基を置換することにより酵素の性質を改変させるものである。この技術も様々な酵素の製造に用いられているが、現状ではアミノ酸置換後の性質の予測は困難な場合が多く、試行錯誤的な実験となっている。

4. 繊維加工と酵素

繊維加工における酵素の利用は天然繊維をターゲットにするが、三大天然繊維である綿、羊毛、絹の加工に使用されている酵素を表1にまとめた。綿繊維の製織時には主にデンプン糊が使用されるが、デンプン分解酵素である α -アミラーゼはこの糊抜きに古くから用いられてきた。近年では、高温で高い活性を示す耐熱性アミラーゼもDNA組換え技術により開発され¹⁾、実用化されている。繊維の改質は化学繊維では酸、アルカリ処理により行われるが、セルロース繊維ではセルラーゼを用いた減量加工により改質することができる。セルラーゼ処理した繊維には柔軟性、光沢、吸水性に効果がみられる。一方、タンパク質繊維である羊毛の改質にはタンパク質分解酵素のプロテアーゼが使用される。羊毛の特性である収縮性は、繊維本体であるコルテックスを包むスケールに起因するものであるが、これをプロテアーゼで分解すると羊毛は防縮性となる。しかし、スケールの除去により羊毛のもつ防水性などの性質は著しく低下し、問題もある。また、プロテアーゼは絹(生糸)の精練にも用いられる。絹は繊維状タンパク質のフィブロインを主成分とし、その外側をセリシンというゴム状たんぱく質が包んだ構造を持つ。アルカリ処理した生糸にプロテアーゼを作用させると、セリシンだけが除去され、フィブロインだけから成る絹糸が得られる。

表1 繊維加工に利用される酵素

繊維	用途	酵素
綿	糊抜き	α -アミラーゼ
	改質	セルラーゼ
	捺染	プロテアーゼ
		セルラーゼ
		ヘミセルラーゼ
羊毛	漂白剤の除去	α -アミラーゼ
		カタラーゼ
	改質	プロテアーゼ
	精練	プロテアーゼ

綿繊維加工では先に述べた糊抜き、減量工程以外に精練、漂白、染色工程があるが、これらにおいても酵素の利用が検討されている。坂井は原綿中の一次膜の形成にペクチンが重要な役割を果たしていることに注目し、ペクチン分解酵素であるPPaseを綿繊維の精練に利用する方法を開発し、バイオ精練と名付けている²⁾。本稿ではバイオ精練に最も適した*Bacillus subtilis* IFO 3134株由来のPPaseの性質について紹介する。

5. プロトペクチンとプロトペクチナーゼについて

ペクチンは高等植物の細胞壁中に広く存在するD-ガラクトツロン酸の α -1,4重合体を主成分とした多糖類であり、植物組織中では不溶化しプロトペクチンを形成している。不溶化の機構には様々な要因が関係するが、主にはカルシウムなどの2価の金属イオンを介したポリガラクトツロン酸間の結合とアラビナン、ガラクトナン、アラビノガラクトナンなどの中性糖鎖を介したセルロース繊維との結合によるものと考えられている³⁾。綿繊維の原料である原綿も植物組織であり、一次膜と二次膜から構成されている。二次膜の構成成分は大部分がセルロースであるが、一次膜にはセルロースの他、ペクチン質、タンパク質、綿ろう、脂肪などが多く含まれる⁴⁾。繊維加工ではセルロース以外のこれらの夾雑物が精練工程において除去される。

PPaseは不溶性プロトペクチンより水溶性のペクチンを遊離させる活性を持つ酵素の総称である^{5,6)}。筆者らの研究室ではこれまでに数々のPPaseを単離しており、それらの作用機作によりA、Bの2つのタイプに分類している。図2に示すように、AタイプのPPaseはプロトペクチン中のポリガラクトツロン酸部分を切断するものであり、ポリガラクトツロナーゼ⁷⁾、ペクチンリアーゼ⁸⁾、ペクテートリアーゼ⁸⁾などがこのグループに分類される。Bタイプはポリガラクトツロン酸以外の部分を分解して水溶性ペクチンを遊離させる酵素であり、アラビナーゼ⁹⁾とラムノガラクトツロナーゼ^{10,11)}を現在までに単離している。PPaseは不溶性基質に高い活性を示す特徴を持っていることから、綿繊維の精練工程での利用に期待が高まっている。

図2 プロトペクチンの構造とPPaseの作用部位

6. *B. subtilis* IFO 3134株の生産するPPaseの諸性質

本菌をSP培地(1.5%脱脂大豆粉, 2.8% K_2HPO_4 , 1.2% KH_2PO_4 , pH7.0)中で37℃, 22時間培養すると、培養上澄中には3種のPPase(PPase-C, -N, -R)が生産する^{8,9)}。これらの酵素の諸性質を表2に示すが、PPase-NとPPase-RはpH安定性が非常に高く、16時間の処理においてもPPase-NがpH3-10, PPase-RがpH4-11の広い範囲で80%以上の残存活性を有する。酵素反応の最適条件はいずれも60℃で中性付近にある。綿繊維はアルカリ性条件下では比較的安定であることから、これらの酵素の持つ性質は精練工程での利用に適したものであると言える。金属塩に対してはPPase-Nが大きく影響を受ける。本酵素の活性化には0.1-0.5mMのカルシウムイオンが必須であり、それ以外の多くの2価のイオンで酵素活性は大きく阻害される。また、種々の植物から調製したプロトペクチンに対する3種のPPaseの基質特異性には、酵素間で大きな差異が見られる。この特異性の違いは酵素のプロトペクチン中の糖鎖切断部位の違いによるものであり、また、植物により細胞壁中の多糖構造が異なっていることを示唆している¹²⁾。

表2 *Bacillus subtilis* IFO 3134株の生産するPPaseの諸性質

性質	PPase-C	PPase-N	PPase-R
分子量			
SDS-PAGE法	30,000	43,000	35,000
ゲルろ過法	27,000	32,000	27,000
等電点(pH)	9.0	9.4	8.2
安定性(80%以上の残存活性)			
pH(37℃, 16時間処理)	6-9	3-10	4-11
温度(30分間処理)	-50	-60	-50
最適反応条件			
pH	6.0	8.0	8.0
温度(℃)	60	60	60

7. PPaseのプロトペクチン可溶化機構

PPase-NとPPase-Rをメトキシ基含量の異なる種々のポリガラクトツロン酸に作用させると、両酵素の基質特異性は異なり、PPase-Nはポリガラクトツロン酸に、PPase-Rはポリメチルガラクトツロン酸に高活性を示す。また、両酵素は共に基質をエンド型に切断し、不飽和ガラクトツロン酸を反応生成物に生じることから、PPase-Nはエンド

ペクテトリアーゼ(EC 4.2.2.2)に, PPase-Rはエンドペクチンリアーゼ(EC 4.2.2.10)に属する酵素である。PPase-Rは図3に示す反応によりポリメチルガラクトン酸を分解する。

図3 PPase-Rの反応様式

一方, PPase-Cはプロトペクチン中のポリガラクトン酸領域を分解しない。PPase-Cはシュガービートプロトペクチンに高い活性を示すことから, その可溶化機構はシュガービートパルプより本酵素が切断する糖質を単離し, その構造を決定することにより解明した。その結果, PPase-Cは α -1,5-L-アラビナンをエンド型に分解するエンドアラビナーゼ(EC 3.2.1.99)であり, プロトペクチン中のアラビナンの部分を切断することによりペクチンを遊離させることが明かとなった¹³⁾。シュガービート中におけるアラビナンの構造は α -1,5-L-アラビナンにアラビノースが側鎖として付くL-アラビナンとして存在するが¹⁴⁾, PPase-CはL-アラビナンよりも直鎖状アラビナンに高い活性を示す。しかしながら3134株は作用機作の異なる2種のアラビノシダーゼを生産し, PPase-Cはこれらと相乗的に働いて, L-アラビナンを効率良く分解することを最近の研究結果より明らかにしている。アラビノシダーゼはそれ自体ではプロトペクチン可溶化活性は示さないが, PPase-Cと併用すると可溶化活性が上昇することから, これらの酵素は不溶性基質にも作用していると考えられる。

8. PPaseによる綿繊維の精練

綿の精練度合いはペクチン遊離量と湿潤性により評価できる。先に述べたように, 3134株は3種のPPaseを分泌生産するが, 綿糸からのペクチン遊離活性の高いものはPPase-CとPPase-Nである。PPaseを用いて酵素処理した綿糸は, セルロースフィブリルが露出するまで精練され, 水酸化ナトリウムによる精練と同等の効果が得られることが電子顕微鏡観察により確認されている。また, PPaseはセルロースには作用しないため, 酵素処理後の繊維の強度低下も抑えることができる¹⁵⁾。さらに, バイオ精練品は染めむらなく染色でき, 化学精練品に比べて色合いが濃く染まるとの評価もある¹⁶⁾。

9. むすび

本稿では綿繊維の精練に利用できる枯草菌の生産する酵素を中心に紹介した。綿の精練は一般的にアルカリや界面活性剤などの化学薬剤を使用し, 高温下で処理されているが, この化学精練法ではエネルギーコスト, 排水による環境汚染, 作業環境など問題が多い。これに対してバイオ精練は低温, 中性条件で処理が行なえるため, 化学法での問題を解消することができ, エコロジーな加工法と言える。しかしながら, バイオ精練法での最大の問題は酵素の生産コストである。筆者らはすでにPPase-CとPPase-Rの遺伝子クローニングに成功しており^{17,18)}, これらの酵素の大量生産は近く可能になると考えている。また, 今後の課題としては耐熱性PPaseの開発がある。現在, 綿の加工は糊抜きと精練は別工程であるが, 糊抜き用酵素である耐熱性アミラーゼとの併用が可能なPPaseが開発できれば, これらは一工程となりコストダウンが可能となる。近年, 多くの分野においてバイオテクノロジーの利用が期待されているが, 繊維加工業界においても今後増々この導入が進んでいくものと思われる。

参考文献

- 1) B. Diderichsen, G. B. Poulsen, and P. L. Jorgensen, *Res. Microbiol.*, **142**, 793 (1991).
- 2) 坂井拓夫, バイオサイエンスとバイオインダストリー, **54**, 784 (1996).
- 3) W. M. Fogarty and O. P. Ward, in D. J. D. Hockenhull (Ed.), *Progress in Industrial Microbiology*, Vol.13, Churchill Livingstone, Edinburgh, p.59 (1974).
- 4) V. W. Tripp, A. T. Moore, M. L. Rollins, *Text. Res. J.*, **21**, 886 (1951).
- 5) T. Sakai, *Methods Enzymol.*, **161**, 335 (1988).
- 6) T. Sakai, T. Sakamoto, J. Hallaert, and E. J. Vandamme, *Adv. Appl. Microbiol.*, **39**, 213 (1993).
- 7) T. Sakai, and M. Okushima, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2427 (1978).
- 8) T. Sakamoto, R.A. Hours, and T. Sakai, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 353 (1994).
- 9) T. Sakai, and T. Sakamoto, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 879 (1990).
- 10) M. Sakamoto, Y. Shirane, I. Naribayashi, K. Kimura, N. Morishita, T. Sakamoto, and T. Sakai, *Eur. J. Biochem.*, **226**, 285 (1994).
- 11) T. Sakamoto, and T. Sakai, *Carbohydr. Res.*, **259**, 77 (1994).

- 12) T. Sakamoto, R. A. Hours, and T. Sakai, *Process Biochem.*, **30**, 403(1995).
 13) T. Sakamoto, J. Yoshinaga, T. Shogaki, and T. Sakai, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1832(1993).
 14) K. Tagawa, and A. Kaji, *Methods Enzymol.*, **160**, 542 (1988).
 15) 坂井拓夫, 阪本龍司, 繊維機械学会誌, **45**, 301(1992).
 16) 今村秀明, 第6回大阪府立大学附属研究所生物資源開発センタープロジェクト研究報告要旨集, p20(1994).
 17) T. Sakamoto, M. Yamada, H. Kawasaki, and T. Sakai, *Eur. J. Biochem.*, **245**, 708(1997).
 18) T. Sakamoto, H. Kawasaki, and T. Sakai, *FEBS Lett.*, **398**, 269(1996).

第43回日本学術会議材料研究連合講演会講演募集

担当世話学会：土木学会，日本材料学会

期 日：平成11年9月30日(木)，10月1日(金)

会 場：京大会館(〒606-8301 京都市左京区吉田河原町15-9 電話：075-751-8311)

講演内容：〈オーガナイズド・セッション〉

〈オーガナイザー〉

- 補修，補強，アップグレード工法：宮川豊章(京大)，大即信明(東工大)，北後征雄(JR西日本コンサルタンツ)
- 建設分野における新材料，リサイクル：高木宜章(立命大)，北村八朗(大阪ガス)
- 材料の強度と破壊を支配する第2相強化材のDimensionの効果：横堀壽光(東北大)
(物質創製工学研究連絡委員会材料評価専門委員会企画)
- バイオマス資源のエネルギー化および有用ケミカルスへの変換：坂 志朗(京大)，鈴木 勉(北見工大)，美濃輪智朗(資源環境技研)
- 高分子および複合材料／環境，福祉，省エネ，リサイクルへの展開：木村照夫(京工繊大)，横山敦士(京工繊大)，伊藤勝也(東洋紡績)
榎本義淳(住友金属)
- 耐熱鋼の高強度化へのアプローチ手法：
- 機能設計に基づくセラミックスの合成と特性評価：宮田 昇(京大)，塩野剛司(京工繊大)，西川直宏(名工大)
- マグネシウムの新展開：小島 陽(長岡技科大)，東 健司(阪府大)，馬淵 守(名工研)

講演内容はすでに発表されたものを一部含むことは差し支えありませんが，最近の研究が中心であることを望みます。

講演時間：1題15分(講演10分，討論5分)の予定，ただし講演申込件数によっては変更されることがあります。なお，使用機器はOHPに限らせていただきます。

申込締切期日：平成11年6月18日(金)厳守 原稿提出期日：平成11年8月10日(火)厳守

申込方法：(1)E-mailの場合は，下記アドレスにメールをお送り頂ければ申込書式を返送します。

書式請求アドレス：request@jsms.or.jp

(2)郵送，FAXの場合は，下記様式(A4判)でお申し込み下さい。

第43回日本学術会議材料研究連合講演会申込書式

☐ 一般講演	材料分野名	☐ オーガナイズドセッション	番号
演 題			
講演者氏名，所属(連名の場合は発表者に○印)			
所属学協会名		会員資格	
連絡者の氏名，所属，所在地(〒)，電話，FAX，E-mail			
概要(400字以内)			

※参加登録料(一般2,000円，学生1,000円)を当日会場にて申し受けます。

同一講演者の発表は原則として1件に限らせて頂きます。

講演申込は，E-mail，郵送，FAXのいずれかにし，重複送付は避けて下さい。

申 込 先：〒606-8301 京都市左京区吉田泉殿町1-101 日本材料学会材料研究連合講演会係

電話：075-761-5321，FAX：075-761-5325