【解説】

【2007年 農芸化学研究企画賞】

好熱菌による難分解性動物タンパク質の分解 リサイクルバイオテクノロジーの構築に向けて

渡部邦彦

ケラチンとコラーゲンに代表される難分解性動物タンパク質は、再利用されることなく産業廃棄物として焼却処分されている。これに目を向け、何とか微生物機能を用いた分解により焼却に代わる再利用の道を開こうと、リサイクルバイオテクノロジーの構築を唱え、新たな試みを探ってきた。泥臭くウェットな仕事ではあるが、実用化に向けて薄明かりを見いだした。その成果について生化学や分子生物学の分野の人にも興味をもっていただけるよう、またこの研究を通じてこそ明らかにできた新しく緻密な知見について紹介・解説していく。

家畜にまつわる今年最大の事件は口蹄疫、そして少し時を遡ればトリインフルエンザと狂牛病 (BSE) も記憶に新しく、家畜および食品を含めた関係者は震撼の連続だったであろう。家畜種は、わずか 14 種の哺乳動物と鳥類で、家畜から供給されるヒト食糧の 90% を提供するほどに単一化されている⁽¹⁾。それ故、致死病原体のパンデミックは、ヒトへの感染の恐怖に加えて食糧不足も招きかねず、家畜資源のより効率的な利用が求められる。ここで取り扱う難分解性動物タンパク質とは、家畜を含

むすべての動物組織で最大成分であるコラーゲンと、トリ羽毛などに大量に含まれるケラチンの二大成分である。これらは、家畜由来の食肉関連の産業廃棄物として、国内だけでも年間 200 万 t 以上も食品加工産業などから排出される。残念ながら、難分解性動物タンパク質は強固な構造に基づく難分解性である上に、付加価値のある再生利用先がなく、大方が焼却廃棄処分されている⁽²⁾。焼却から生じる温室効果ガスの削減も求められ、産廃排出側は再利用による資源化とコスト削減につながる代替法の開発を望んでいる。

難分解性動物タンパク質は、細胞組織においては静的な物質であると考えられ、長く生化学や細胞生物学からも興味をもたれなかったが、近年は細胞発生・接着、ガン浸潤、保湿作用など動的で重要な役割が明らかになるにつれ、再生利用の期待が高まってきている^(3~5)。筆者らは、捨てられるだけの難分解性動物タンパク質を、何とか再利用できないかという思いから、まずはこれらを強力に分解する新規好熱性細菌を独自に単離し、トリ羽毛に含まれるケラチンとコラーゲンに絞った微生物機能によるマイルドな難分解性動物タンパク質分解に成功し、これらの再利用を可能にするための研究をリサイクルバイオテクノロジーと称する旗を立て、研究を展開している。

Decomposition of Extremely Hard-to-Degrade Animal Proteins by Thermophilic Bacteria

Kunihiko WATANABE, 京都府立大学大学院生命環境科学研究科

今、なぜ好熱菌か？ 難分解性動物タンパク質に常温で作用する微生物は、皮膚病など病原性に関わるものが多い。ところが、至適生育温度が恒温動物温度帯と大きく異なる好熱菌に病原性は見られず、安全性の高いツールであること、加えて 60℃ 前後の温度帯は操作上加熱・冷却にかかるエネルギーコストが低いことが、その温度帯を至適とする好熱菌の強力な利点である。

好熱菌によるトリ羽毛ケラチンの分解とその特徴

トリは牛豚と異なり、宗教戒律による制限が少ない食肉として世界中で食されている。1人当たりの年間消費量が 50 kg 超の国が幾つもある中、日本は 15 kg 弱が消費される平均的消費国である。日本だけで年間 1 万 t、世界的には 10 万 t 以上のトリ羽毛が排出される。軽い材質だけに重量の割にかさ高くなるが、先進国では大半が焼却処分されており、これらに微生物ないしは酵素分解によるマイルドな分解を施し、再生利用の可能性を追究した。トリ羽毛の大部分を占めるケラチンタンパク質の頑丈な構造は、二次構造の強固なパッキング、S-S 結合による架橋、疎水結合、水素結合などによる^(6,7)。筆者らのグループは、有馬温泉（神戸市）から単離した *Meiothermus ruber* H328 株が別の難分解性タンパク質エラスチンを強力に分解することを見いだしており、トリ羽毛の分解に応用した。この菌株は、グラム陰性、好気性、無孢子で、赤色のカロテン色素を生産し、至適生育温度と pH を、それぞれ 50～65℃、pH 7.5～10 付近にもつ長桿菌である（図 1）。*Thermus* 属細菌に近接するが、生育温度をやや低い温度帯にもつことが特徴である。これまで *Meiothermus* 属細菌には、トリ羽毛ケラチン分解や強力なプロテアーゼ活性を報告されているものはなかった。

H328 株によるトリ羽毛分解試験は、当初様々な条件

下、フェザーミールと呼ばれる羽毛を高温高圧処理した分解しやすい基質に代替しても失敗に終わっていた。偶然試した炭酸カルシウムの添加 (0.5% (w/v)) が功を奏し、60℃で6日間の振盪により、生のトリ羽毛（地鶏）を含む培地で、トリ羽毛が原形をとどめることなく泥状の形状にまで分解されることを示すことができた（図 2）⁽⁸⁾。培養濾液に溶解するアミノ酸・ペプチド量を加水分解アミノ酸組成として分析したところ、プロテインデータベースにあるトリ羽毛ケラチンタンパク質のアミノ酸組成比（図 3、灰色）によく近似した値が得られ、得られたアミノ酸が羽毛分解に基づくことが示された（図 3）。加えて、培地に添加した羽毛ケラチン重量の約 60% が可溶化し、そのうち遊離アミノ酸が 1/4 程度、ペプチドとして 3/4 程度であることがわかった。地鶏の他に、ブロイラー鶏の白色羽毛に対しても遜色なく分解することもわかった。さらに、走査型電子顕微鏡により羽毛の構造変化を観察したところ、培養に伴う著しい羽毛構造崩壊と、H328 株菌体の羽毛への吸着が観察され、特にこの吸着が羽毛分解に効果的であることが示唆された。この他に様々な経時的なパラメータ（培地の pH、生菌数、細胞外プロテアーゼ活性、トリ羽毛の分解量など）を調べ、強力なトリ羽毛分解を裏付ける結果を得た。トリ羽毛の微生物による分解に関する詳細なデータは珍しく、羽毛を分解する速度、そして羽毛の分解物が羽毛本来の組成比を維持したまま培地中に保たれる点では卓越している^(9,10)。

さらに、炭酸カルシウムの添加は、pH 維持と菌体生育に効果的であった。特に羽毛を分解し CN 源を供給するプロテアーゼの活性化には Ca^{2+} が必須であった。トリ羽毛分解を担うプロテアーゼ活性は、 Ca^{2+} 要求性に加えてこの上ない温度依存性・安定性が見られた。温度依存性については 100℃ まで活性が上昇し続け、100℃ 反応時で 60℃ 反応時の約 7 倍の活性にもなること、

図 1 ■ *Meiothermus ruber* H328 株の光学顕微鏡像 (A) とコロニー (B)

図2 ■ H328 株によるトリ羽毛の分解

生の 3% (w/v) トリ羽毛 (地鶏) を含む YS 培地 [0.5% (w/v) 酵母エキス, 0.5% (w/v) ショ糖] を用い、60℃ で振盪培養した。

図3 ■ *Meiothermus ruber* H328 株によるトリ羽毛分解後の培養濾液 (6 日後) に対するアミノ酸組成分析

60℃ では数週間にわたり安定であり、長時間にわたり羽毛ケラチンに作用すること、高濃度の界面活性剤などの変性剤にも驚異的な耐性を有することがわかった。さらなる追究から、トリ羽毛の分解は、1 種類のプロテアーゼが担うものではなく、プロテアソームのような複合体で働く証拠も得られ、H328 株のゲノム解析からの情報との照合作業を行なっているところである。今後、酵素複合体としての基礎的側面からも新しい発見を期待している。

培養濾液中に含まれる遊離アミノ酸以外の特異ペプチド成分を、トリ羽毛ケラチンから得られる中間生成物として調査・解析するため、MALDI-TOF-MS 解析を行なった。培養とともに、培養スタート時には見られなかった分子量 1,000 以下のシグナルが増加したが、5 残基以下のペプチド・アミノ酸にまで分解されるものが多い。

分解系の検討に引き続き、トリ羽毛分解物の生理活性

を検討した。H328 株の培養濾液を用いて、大腸菌、酵母、カビに対する抗菌作用、正常ヒト皮膚細胞への細胞増殖促進効果、ラット神経細胞の細胞死誘導に対する抑制効果などを調べたが、現在まで、いずれも培養液添加量に呼応した顕著な投与効果は見られていない。トリ羽毛分解物から濾液を取り除いた中間分解物残渣を用いて、分子認識能をもつ機能性膜構築を京都工芸繊維大学の吉川正和教授との共同研究で開始しており、現在、膜強度を上げ、核酸基質分子の認識能を調査している段階である⁽¹¹⁾。また上記以外の提案として、毛髪保護のためのシャンプーなどへの添加、植物肥料の可能性も含めたアミノ酸生産への可能性なども検討している。

■ H328 株の家庭用生ゴミ処理機（アシドロコンポスト法）への応用

H328 株によるトリ羽毛分解能力が実用的レベルか否かを評価するため、東北大学名誉教授西野徳三先生（現東北生活文化大学）とスターエンジニアリング社の協力を得て、家庭用生ゴミ処理機での添加効果を調査した⁽¹²⁾。標題のアシドロコンポスト法とは、好熱菌と乳酸菌を用いた弱酸性下での生ごみ処理法である⁽¹³⁾。弱酸性・高温下で反応が進むため、腐敗菌が増殖せず、低臭気、数年以上の高分解持続力、定期的な機材の交換が必要ないなどの長所を有している。この方式の家庭用生ごみ処理機 1 台は、5 l のおがくず状基剤に含まれるアシドロコンポストを使って 1 日あたり 1~3 kg の家庭生ゴミを強力に分解し、分解物は最終的に肥料として再利用されている。このシステムに、別途培養した H328 株菌体 15 g を 30 g の生のトリ羽毛とともに添加して羽毛の分解を調べてみた。図 4 に示すように、H328 株菌

図4 ■家庭用ゴミ処理機（スターエンジニアリング社製バイオクリーン BC-02）での H328 株の添加に伴うトリ羽毛分解
H328 株菌体 15 g を 30 g の生トリ羽毛とともに添加し、羽毛重量の減少率を調べた。

体を添加しない場合は、14 日を経ても 20% 程度の重量減少に留まり、アシドロコンポストのみでは分解は進まなかった。それほどトリ羽毛は分解しにくいものであるが、この菌を添加すると始めの 3 日で急激に減少し、14 日を経て 80% 程度の減少が観察された。アシドロコンポストを加えず H328 株だけを用いた場合は、ちょうど中間的な分解になったため、H328 株菌体とアシドロコンポストの協調作用で分解が促進されることがわかった。この実験は、H328 株によるトリ羽毛分解系が、実用レベルのゴミ処理システムに応用可能であることを示しており、今後はこの方式の有用性と持続性を調べ、実用化にさらに近づけたい。

コラーゲン分解とその酵素群について

コラーゲンは細胞外マトリックスとも呼ばれ、動物タンパク質の中で 25% 以上を占める最多成分である。商品広告で目にしない日がないぐらい、ここ 10 年で巷に氾濫する物質名になった。一次配列では、ペプチド結合の開裂効率が悪いプロリン、グリシン残基が全組成の約半分を占め、トリペプチド (Gly-Pro-X) の繰り返し配列を数多くもつ。プロリン残基は、しばしば翻訳後修飾でヒドロキシプロリンに変換される。3 次元構造として 3 本のポリペプチドが強固ならせん構造をとり、基本的に不水溶性かつ難分解性である。コラーゲンおよびその分解物であるコラーゲンペプチドは、図 5 に示すように、未知の効能も含めて医薬、食品、化粧品への需要が近年急増している。経口摂取での効果には懐疑的であるが、コラーゲンペプチドの血中濃度の分析から興味深い結果も得られており⁽¹⁴⁾、経口摂取以外の利用法も含めてコラーゲンおよびコラーゲンペプチドがもつ新たな生理活性・機能の開拓や、高付加価値素材としての利用に期待が膨らんでいる^(15,16)。

コラーゲンを産業廃棄物から有効に再生利用するためには、コラーゲンに特異的に作用し、効率よくコラーゲンペプチドが調製できる安定なプロテアーゼ、ペプチダーゼがまず必要である。しかし、動物のみならず微生物においても、コラーゲンを含む細胞外マトリックスタンパク質に特異的に作用するプロテアーゼはごく稀で、この有望な酵素を生産する微生物菌株の取得・実用化はきわめて難しい。このニーズに応えようと、筆者らはコラーゲンを積極的に分解する好熱性細菌を独自に単離

図5 ■コラーゲンおよびその分解物から期待される応用

し、それらが生産するコラーゲン分解系酵素群についての研究を行ってきた^(17~21)。やはりここでも病原性を避ける意味で、好熱菌に絞って研究を進め、*Geobacillus collagenovorans* MO-1 株と *Aneurinibacillus* 属細菌 AM-1 株を単離し、研究を進めた。MO-1 株からはコラーゲンを直接分解する第一段階目のコラーゲン分解性酵素^(17, 19)と、コラーゲンペプチドに含まれる特異繰り返し配列を認識して分解する第2段階として作用する2つのペプチダーゼ⁽²⁰⁾、そして AM-1 株からはプロリルジペプチドを分解するアミノペプチダーゼを見いだし^(21, 22)、図5に従ったコラーゲンの分解・調製を可能にした。

コラーゲンペプチドを認識・分解する Pz ペプチダーゼ A の構造

コラーゲンの特異繰り返し配列 Gly-Pro-X を含む合成ペプチド 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu↓Gly-Pro-D-Arg (Pz-ペプチド) を加水分解する酵素を、MO-1 株から2種 (A 酵素, B 酵素) 見いだして解析している⁽²⁰⁾。ペプチド中のコラーゲン特異配列の認識機構は、動物を含めたオリゴペプチダーゼでも未だ報告はない⁽²³⁾。興味深いのは、両酵素は同様の活性を有するのに、一次配列の相同性は22%と低く、動物酵素の thimet oligopeptidase (TOP) ともせいぜい10数%しかない。TOP を手がかりに2つの酵素の特異的阻害剤を調べ⁽²⁴⁾、

図6 ■ MO-1 株由来 Pz ペプチダーゼ A の全体構造と基質・分解物のためのトンネル

X 線構造解析から A 酵素に面白い構造・基質認識機構が見つかったので紹介する^(25, 26)。

図6は、A 酵素の全体構造と、基質と生成物の出入口を示している。TOP は分子表面に深い溝状のクレバスが基質の出入口として報告されている⁽²³⁾が、本酵素には、その代わりに分子内に基質・分解産物を通るトンネルが存在する。そのトンネル内径の大きさから、図6の上部が基質の入口、下部が分解されて小さくなった生成物の出口と考察している。活性中心では、2回のコラーゲン特異繰り返し配列をもつ阻害剤 [Gly-Pro-Phe-(PO₂CH₂)-Gly-Pro-Nle] を取り込んだ酵素との複合体結晶の構造解析から、グリシン残基と、アミノ酸でありながらアミノ基に水素を有しないプロリン残基を含むペプチド基質 (阻害剤も) の主鎖に対し、巧みに水素結合を形成してフィットする構造を有することを突きとめた。さらに、基質のペプチドの長さを制限するように、基質に対して移動して壁をつくる残基も突きとめることができた⁽²⁶⁾。現在は、B 酵素についても構造解析を進めており、A 酵素との比較を焦点としている。いずれも難分解性動物タンパク質から派生した、しかしこの研究を通じてこそ得ることのできた基礎的な知見である。

おわりに

難分解性動物タンパク質には、狂牛病 (BSE) の病原性プリオンや、アルツハイマー症の β アミロイドなど、病態に関わる異常タンパク質も含めるべきと考える。実際に、ケラチン分解性プロテアーゼを病原性プリオン除去へ応用する例はすでにいくつかのグループで発表されている⁽²⁷⁾。 β アミロイド形成過程を遅らせる阻害効果も、このような研究からヒントが生まれるかも知れない。この他にも、強固なタンパク質繊維である絹 (シルク) の製造工程から出る廃絹の再利用も行なわれており、この分解過程への応用も可能である⁽²⁸⁾。さらに、漁業に大打撃を与えているエチゼンクラゲに含まれるムチンやコラーゲンの活用にも可能性を見いだすことができる^(29, 30)。今後、これらの研究を実用化に向けてさらに推進していくには、企業サイドも含め様々な方面の研究者の方々の知恵を集結していくしかないと考えている。また一方で、これを農芸化学的研究とみなして見守っていただけるなら、筆者らにとってこの上ない喜びである。

謝辞：本研究の遂行にあたり、農芸化学研究企画賞を通じて研究推進の援助していただいた、関係者の方々に深く感謝申し上げます。共同研究者の産総研関西センター 茂里 康氏に厚く御礼申し上げます。さらにトリ羽毛を長期にわたって提供していただいている川中高平氏 (<http://www.jidori.net/>) に深謝申し上げます。

文献

- 1) FAO:Electronic Forum on Biotechnology in Food and Agriculture:Conference 13, <http://www.fao.org/biotech/c13doc.htm>.
- 2) E. Deydier, R. Guilet, S. Sarda & P. Sharrock : *J. Hazard Mater.*, **121**, 141 (2005).
- 3) M. E. Nimni : *Semin. Arthritis Rheum.*, **13**, 1 (1983).
- 4) Y. Suzuki, Y. Tsujimoto, H. Matsui & K. Watanabe : *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 73 (2006).
- 5) T. F. Linsenmayer : "Cell Biology of Extracellular Matrix", ed. by E. D. Hay, Plenum Press, 1991, p. 7.
- 6) E. Fuchs : *Annu. Rev. Cell Dev.*, **11**, 123 (1995).
- 7) D. Parry & A. North : *J. Struct. Biol.*, **122**, 279 (1998).
- 8) T. Matsui, Y. Yamada, H. Mitsuya, Y. Shigeri, Y. Yoshida, Y. Saito, H. Matsui & K. Watanabe : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 941 (2009).
- 9) A. B. Friedrich & G. Antranikian : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2875 (1996).
- 10) R. Gupta & P. Ramnani : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 21 (2006).
- 11) M. Yoshikawa, K. Kawamura, A. Ejima, T. Aoki, S. Sakurai, K. Hayashi & K. Watanabe : *Macromol. Biosci.*, **6**, 210 (2006).
- 12) Y. Shigeri, T. Matsui & K. Watanabe : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2519 (2009).
- 13) S. Haruta, T. Nakayama, K. Nakamura, H. Hemmi, M. Ishii, Y. Igarashi & T. Nishino : *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 1 (2005).
- 14) K. Iwai, T. Hasegawa, Y. Taguchi, F. Morimatsu, K. Sato, Y. Nakamura, A. Higashi, Y. Kido, Y. Nakabo & K. Ohtsuki : *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6531 (2005).
- 15) Y. Shigemura, K. Iwai, F. Morimatsu, T. Iwamoto, T. Mori, C. Oda, T. Taira, E. Y. Park, Y. Nakamura & K. Sato : *J. Agric. Food. Chem.*, **57**, 444 (2009).
- 16) P. Nyberg, L. Xie & R. Kalluri : *Cancer Res.*, **65**, 3967 (2005).
- 17) M. Okamoto, Y. Yonejima, Y. Tsujimoto, Y. Suzuki & K. Watanabe : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 103 (2001).
- 18) K. Watanabe : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 520 (2004).
- 19) Y. Itoi, M. Horinaka, Y. Tsujimoto, H. Matsui & K. Watanabe : *J. Bacteriol.*, **188**, 6572 (2006).
- 20) R. Miyake, Y. Shigeri, Y. Tatsu, N. Yumoto, M. Umekawa, Y. Tsujimoto, H. Matsui & K. Watanabe : *J. Bacteriol.*, **187**, 4140 (2005).
- 21) A. Murai, Y. Tsujimoto, H. Matsui & K. Watanabe : *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 810 (2004).
- 22) M. Akioka, H. Nakano, A. Horikiri, Y. Tsujimoto, H. Matsui, T. Shimizu, T. Nakatsu, H. Kato & K. Watanabe : *Acta Crystallogr.*, **F62**, 1266 (2006).
- 23) K. Ray, C. S. Hines, J. Coll-Rodriguez & D. W. Rodgers : *J. Biol. Chem.*, **279**, 20480 (2004).
- 24) Y. Sugihara, A. Kawasaki, Y. Tsujimoto, H. Matsui & K. Watanabe : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 594 (2007).
- 25) A. Kawasaki, H. Nakano, M. Umekawa, Y. Tsujimoto, H. Matsui, T. Shimizu, T. Nakatsu, H. Kato & K. Watanabe : *Acta Crystallogr.*, **F63**, 142 (2007).
- 26) A. Kawasaki, H. Nakano, A. Hosokawa, T. Nakatsu, H. Kato & K. Watanabe : *J. Biol. Chem.*, **285**, 34972 (2010).
- 27) B. A. Coll, R. A. Garcia & W. N. Marmer : *PLoS One*, **2**, e245 (2007).
- 28) Y. Suzuki, H. Matsui, Y. Tsujimoto & K. Watanabe : *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 211 (2009).
- 29) N. Ohta, M. Sato, K. Ushida, M. Kokubo, T. Baba, K. Taniguchi, M. Urai, K. Kihira & J. Mochida : *BMC Biotechnol.*, **9**, 98 (2009).
- 30) S. Nishimoto, Y. Goto, H. Morishige, R. Shiraishi, M. Doi, K. Akiyama, S. Yamauchi & T. Sugahara : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2806 (2008).