

《 解 説 》

酵素の分子進化とメソ多孔空間への
固定化による超安定化

高橋治雄, 今村千絵

株式会社豊田中央研究所 材料分野 バイオ研究室

近年、2~30 nm程度の均一の細孔を有するシリカを基本骨格としたナノサイズに制御されたメソポラスシリカ（メソ多孔体）が合成可能となった。その細孔直径が酵素（タンパク質）等のバイオ分子の直径とよく一致し、かつ酵素の等電点より少し低いpH領域で固定化したときに、酵素分子は高い安定性を示した。固定化の過程でメソ多孔体のシラノール基と酵素表面のアミノ酸の側鎖の間で水素結合等が生じて分子の形を保持しているものと考えられる。

また安定性が低いため実用上有効な利用技術の確立には至っていないマンガンペルオキシダーゼ（MnP）をSIMPLEX法（1分子PCRを基にした無細胞タンパク質合成系による分子進化技術）を用いて、過酸化水素結合ポケットの入り口付近の三つのアミノ酸残基を分子進化させ、過酸化水素に対する安定性を10倍以上にすることができた。さらに分子進化させたMnPを大きさが合致したメソ多孔体に固定化することで、天然酵素に対して50倍近くの相乗的安定化効果が発揮されることを見出した。

1. はじめに

近年、2~30 nm程度の均一の細孔を有するシリカを基本骨格としたナノサイズに制御されたメソポラスシリカ（メソ多孔体）が合成可能となったが¹⁻⁵⁾、その細孔直径は酵素（タンパク質）等のバイオ分子の直径とよく一致する（図1）。また最近ではエチレン基やフェニル基などの有機基を細孔壁に有する無機・有機ハイブリッドタイプのメソ多孔体の合成も豊田中研が世界に先駆けて合成に成功しており^{6,7)}、新しいタイプの触媒として期待されている。また、その常温常圧での反応性から環境に優しい技術として酵素を用いた化学反応が着目されているが天然の酵素ではその特異性や安定性の問題から実際に使用できない場合が多い。このような背景から酵素分子に必要な特性を持たせるために人為的に進化を加速させる進化分子工学の手法が用いられるようになった。

本解説ではメソ多孔体によるバイオ分子の固定化技術について、メソ多孔体の表面の性質及び平均細孔径などの因子がバイオ分子の吸着固定化や安定性に及ぼす影響に関して述べるとともに固定化されたバイオ分子の熱や光等に対する安定化効果に関して考察する⁸⁻¹²⁾。また安定性が低いため実用上有効な利用技術の確立には至っていないマンガンペルオキシダーゼ（MnP）について、SIMPLEX法による分子進化により活性中心付近を安定化した技術を紹介する。分子進化により活性中心付近を安定化したMnPをメソ多孔体に固定化することで相乗的安定化効果が発揮されることを見出した。さらにメソ多孔体へのクロロフィル固定化による安定化の例を交えて本技術の可能性について筆者らの研究結果を中心に解説する。

2. メソ多孔体とたんぱく質分子の大きさ

図1にナノサイズ周辺の生体物質や材料の大きさを示した。水素分子の直径は約0.1 nmであるのに対してDNAの短直径は2 nmであり、酵素等のタンパク質分子の大きさは2~50 nm程度である。またウイルスは100 nm、大腸菌では2 μm程度の大きさである。材料ではフラーレンの直径が0.7 nm程度で典型的な

受理日：2005年12月12日

〒480-1192 愛知県愛知郡長久手町横道41-1

(株) 豊田中央研究所材料分野バイオ研究室

e-mail: e1092@mosk.tytlabs.co.jp

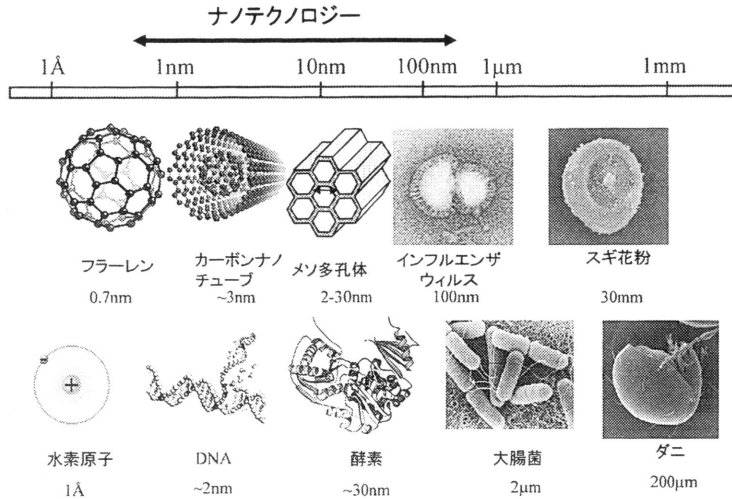
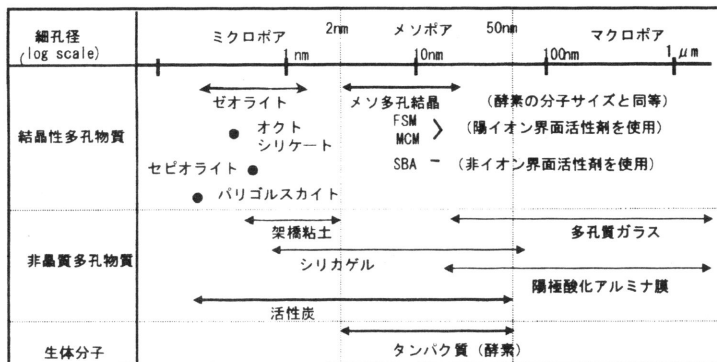
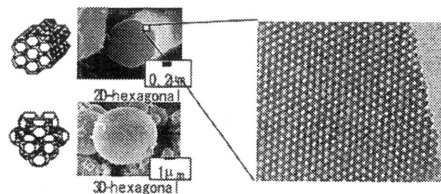


図1 ナノサイズ周辺の大きさを有する物質

(A)



(B)



(C)

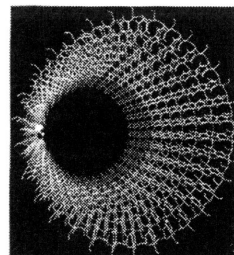


図2 多孔体の分類 (A) と有機・無機ハイブリッドメソ多孔体の結晶構造 (B, C)

カーボンナノチューブは2 nm程度であるといわれている。一方メソ多孔体の細孔の直径は2~30 nm程度のもので一般的であり、タンパク質分子の直径と良く一致する。

3. メソ多孔体の種類と合成

典型的な無機多孔体の分類と大きさを図2(A)に示す。メソ多孔体の合成は通常、シリルアルコキシドを用いて界面活性剤のミセルを鋳型として混合し、

鑄型の周りに集積したシリカを縮合させる。鑄型として陽イオン性界面活性剤を用いるのがFSMシリーズやMCMシリーズ等であり、非イオン性界面活性剤を用いるのがSBAシリーズ等である。細孔のサイズは界面活性剤のアルキル側鎖長を変化させると共に膨張材としてトリイソプロピルベンゼン (TIPB) 等を用いて制御することが可能である。合成したメソ多孔体の表面のシラノール基に有機基を導入することもできる。また豊田中研の稲垣らはフェニル基等の有機基を有するシリカ化合物を用いることにより細孔内部も結晶構造を有するメソ多孔体の合成に成功した。フェニル基を有するメソ多孔体の結晶構造を図2(B)(C)に示したがシラノール基とフェニル基が交互に並ぶきれいな結晶構造を取っており新規な触媒として期待されると共にバイオ分子の配向制御や選択的吸着に展開できる可能性が考えられる^{6,7)}。

4. メソ多孔体へのバイオ分子の固定化

酵素等のタンパク質を中心としたバイオ分子をメソ多孔体に固定化する一般的な手法を図3に示した。まず安定化したいタンパク質の分子サイズと等電点を明らかにし、タンパク質の分子直径より少し大きいサイズのメソ多孔体を合成する。次に等電点より少し低いpH領域域でできるだけイオン強度を低く (10 mM 以下が望ましい) してゆるやかに攪拌しながら固定化する。この際にメソ多孔体のシラノール基との相互作用により新たに水素結合やイオン性相互作用が生じてより高い安定性が得られると考えられる。

メソ多孔体へのタンパク質の固定化法を他の担体結合法等と比較した場合、固定化の際にカップリング反応等の化学反応を伴わず非常に温和な条件で固定化可能であるため、タンパク質そのもののダメージはほとんどないと考えられる。タンパク質の固定化担体への結合率も重量比で最大20%に達し、従来の固定化担体と遜色ない。

サイズが合致した細孔内へ固定化されたタンパク質は、その後の通常の使用条件ではほとんど担体から遊離されないが、イオン強度を高くした場合には遊離が観察される場合が多い。また、タンパク質分子同士が細孔によって区切られていることで、熱等が加わっても分子内の疎水性部分同士のアグリゲーションを予防できる働きがあるものと考えられる。しかしながら、問題点としては分子サイズに合致し

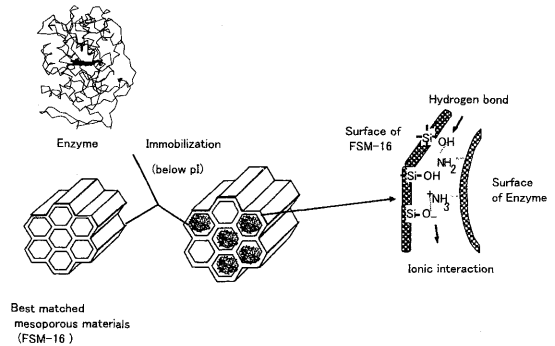


図3 メソ多孔体への酵素の固定化手順

た形で固定化されているために低分子の基質では大きな問題はないが、タンパク質等の高分子を基質とする酵素反応では立体障害を起こして反応が十分進まない可能性がある。さらに、材料がシリカをベースとしているため、アルカリ性的水熱反応では構造が容易に破壊されてしまう点があげられる。

5. 酵素のメソ多孔体への吸着メカニズムの解析

5.1 サイズの影響

各種細孔径を有するメソ多孔体 (FSM-16) に固定化したタンパク質の例として西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP, 分子直径4~6 nm) を pH 4 の緩衝液中で 70℃ 処理したときの残存活性を図4(B)に示す。HRPの場合、未処理の酵素は60分で活性が完全に失われるのに対して、メソ多孔体で固定化したものはいずれも熱に対する安定化効果が認められた。安定化効果は酵素直径と同等の6 nmの平均細孔径を有するFSM-16に固定化したときがもっとも高く、120分処理後も80%以上の活性を有していた。以下安定化効果は9 nm, 3 nmの順であり、従来酵素の固定化によく用いられているシリカゲルは3 nmのものと同程度の安定化効果を示すのみであった。他のサチライシン等のタンパク質分解酵素を用いた試験においても、分子サイズに合致したメソ多孔体に固定した場合が最も安定化効果は優れていた。HRPの吸着量とHRPの吸着前後における細孔への窒素吸着のパターンをもとにしてコンピュータで各種サイズのFSM-16へのHRPの吸着の様子をモデルで示したのが図4(A)である。細孔径3 nm (a)では、酵素分子は細孔内に入ることができず粒子の外側のみにわずかに吸着する。また6 nm (b)では、HRPのサイズに丁

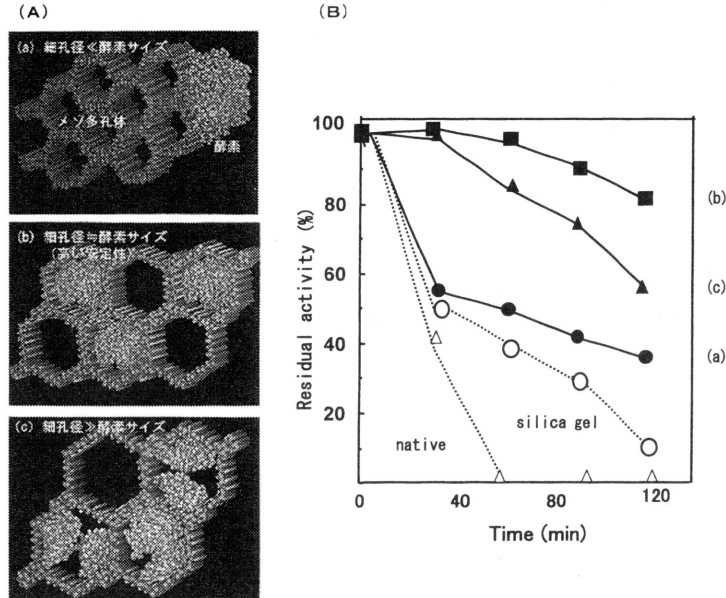


図4 各種サイズの細孔を有するメソ多孔体に固定化した酵素のイメージ図 (A) と熱安定性 (B)

度合致した形で細孔内部に取り込まれ固定化される。9 nm (c)においては、HRPのサイズより大きいために細孔内への吸着量は大きいですが、安定化効果は従来の固定化法と比して特に大きな改善はなかった。

5.2 細孔内のイオンの性質の影響

イオン性色素の各種メソ多孔体への吸着実験を行った結果、陽イオン性色素であるMB (Methylene blue) を用いた場合、陽イオン性の界面活性剤を鋳型としたFSM-16やMCM-41への吸着量は非イオン性の界面活性剤シリカゲルに比して1.5~2倍程度であった。一方、陰イオン性の色素であるASS (Anthraquinone-2-sulfonic acid sodium) の吸着量は、各種のメソ多孔体間でほとんど差は認められなかった。陽イオン性界面活性剤を鋳型として合成したメソ多孔体であるFSM-16やMCM-41は、陽イオン性の物質を選択的に吸着できる能力を有していることがわかった。そこで、HRPを用いてFSM-16とSBA-15に対する吸着量のpHプロファイルを作成した。FSM-16では、酵素分子の電荷が陽イオン性となる等電点以下のpH領域での吸着量がpHの低下に伴って大幅に増大するのに対し、SBA-15ではそのような特性は認められなかった。従って、吸着のメカニズムの一つとして、イオン性相互作用によって細孔内へ酵素分子が取り込まれ、さらにメソ多孔体の

シラノール基と酵素表面のアミノ酸残基の間で水素結合等が形成されて安定化されるものと考えられた。

6. 進化分子工学による構造が複雑な酵素の高機能化

6.1 SIMPLEX法によるライブラリー構築

図5にSIMPLEX (single-molecule-PCR-linked *in vitro* expression^{13,14)} 法の手順を示したが、これは1分子PCRと無細胞タンパク質合成系を組み合わせた新しい変異タンパク質ライブラリー構築法である。変異DNA集団を限界希釈し、マイクロプレート1ウェルあたりDNAが1分子となるように分注し、1分子からのPCRを行うことにより、プレート上に変異DNAライブラリーを構築する。1分子PCRでは、プライマーダイマーの蓄積を抑えるために、ターゲット配列の両末端を同じ配列にしたホモプライマーを用いた。1分子PCR産物の一部を鋳型DNAとして、レプリカプレート上で大腸菌由来無細胞タンパク質合成を行い、変異タンパク質ライブラリーを構築するものである。

スクリーニングで得た陽性ウェルに対応する位置の1分子PCRプレートのウェル中に陽性タンパク質をコードする遺伝子が含まれることとなり、このシステムでは、遺伝子型は1分子PCRプレート、表現型は無細胞タンパク質合成プレートであり、両者の

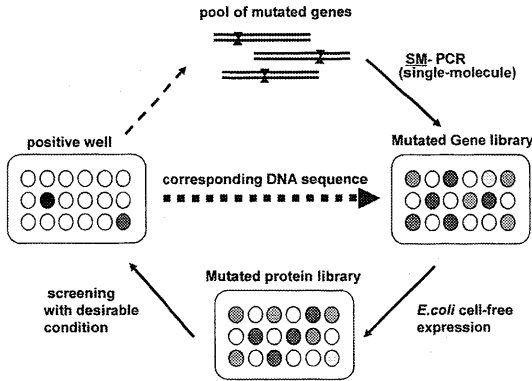


図5 無細胞でのタンパク質の進化手順

対応づけが可能である。このことにより、分子の結合活性を指標として選抜するのではなく、各ウェル中の酵素活性を指標としたスクリーニングが可能となった画期的な手法であるといえる。大腸菌等を用いたコロニーをベースとした *in vivo* スクリーニングと比較して、SIMPLEX 法では無細胞系を用いることによる様々な利点が挙げられる。その一つとして、ライブラリーサイズを自由に設定できる点が挙げられる。*in vivo* スクリーニングでは、遺伝子変異ライブラリーを大腸菌へ形質転換する際の効率がライブラリーサイズに影響する。無細胞系では、PCR 産物を直接鋳型として用いることから細胞への導入は必要なく、ライブラリーサイズを限定されることは原理的にはない。変異ライブラリー作製は、目的遺伝子の変異を導入したい部位に PCR 法により変異導入し、その他の領域をさらにオーバーラップ PCR により連結し全長遺伝子を作製する。その上流にプロモーター領域をオーバーラップ PCR により付加し、無細胞系の鋳型を構築する。この方法により、好きなサイズの変異 DNA ライブラリーを、1 日の作業で作製できるのである。

二つ目としては、スクリーニングの所要時間が極めて迅速かつ効率的である点が挙げられる。生細胞を使わないため、ライブラリー構築が迅速であることのみならず、タンパク質生産時も無細胞系を用いることにより、形質転換・培養等の操作が必要ない。また、合成されるタンパク質は反応溶液中に活性型で存在することから、その一部をそのまま酵素活性測定等に用いることができる。これらのことから、スクリーニングに要する時間は極めて短く、1 分子 PCR

(4 時間) から無細胞タンパク質合成 (1~3 時間)、タンパク質の評価 (1 時間) までで約 8 時間である。各ステップに要する量は数 μl と少量で済み、384 もしくは 1536 ウェルプレートへの分注器による操作が可能である。更に、遺伝子型となる 1 分子 PCR プレートは、凍結することで長期保存が可能である。その他にも、非天然アミノ酸を含むタンパク質や、細胞毒性を持つタンパク質等のライブラリー構築とスクリーニングが可能であり大きな可能性をもっている。

6.2 無細胞系での構造が複雑な酵素の活性発現

今回用いたマンガンペルオキシダーゼ (MnP) は分子内に五つの S-S 結合を有し、ヘムを活性中心に有することから従来の方法では活性のある形での発現は困難であった。転写翻訳共役反応を最適化するために、反応温度、反応時間、酸化還元条件、各種シャペロン・PDI の添加条件について検討を行い、最終的には $1 \mu\text{l}$ の転写翻訳産物があれば活性が検出できるように、合成量とフォールディング効率を向上させた。まず、転写翻訳共役反応時の温度を通常より低くすることにより、可溶性の MnP 合成量を促進できることがわかった。37℃ で合成した場合には、合成産物はほとんどが不溶性 (約 73%) であるのに対し、反応温度を低くするにつれて可溶性画分の割合が増加し、25℃ の場合では約 78% が可溶性であった。また、転写翻訳反応時に、folding を助ける因子であるシャペロン DnaK, DnaJ, GroEL, GroES, GrpE を添加しても、活性型酵素の増加は認められなかった。一方、正しい S-S 結合形成を助ける因子であるカビ由来 PDI¹⁴⁾ を添加した場合には、シャペロン等未添加の場合に比べると、可溶性タンパク質量は変化していなかった (Data not shown) が、活性は顕著に増大した (図 6)。従って正しく S-S 結合がかけ直されることにより、活性型 MnP が増加したと考えられた¹⁴⁾。また、牛由来 PDI を用いた場合には、シャペロン等未添加の場合よりもやや活性が高かったが、カビ由来 PDI を用いた時のような顕著な効果は認められなかった。カビ PDI は、熱・変性剤 (0.2 M グアニジン塩酸) に対する安定性が高く、また広範囲の pH で安定である等の理由から、酸化還元電位が異なっている可能性が推測され、大腸菌抽出液による転写翻訳反応系ではカビ PDI の方が適していると考えられた。

また MnP 以外のタンパク質でも無細胞系で十分な活性が認められないことが多い。そこで、大腸菌に

DnaK, DnaI, GroEL, GroES 等のシャペロン遺伝子を導入し、あらかじめ高発現させたものから無細胞合成用の抽出液を調製し、活性型タンパク質（酵素等）の合成量を増やすことにも成功している。

6.3 活性中心付近の進化分子工学による MnP の高機能化

ヘムタンパクであるマンガンペルオキシダーゼ

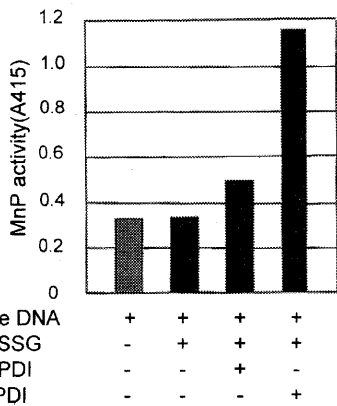


図6 無細胞でのMnP活性に対するシャペロンの添加効果

(MnP) は、過酸化水素により Mn^{2+} から Mn^{3+} へと酸化され、有機酸と錯体を形成する。 Mn^{3+} キレート錯体は、基質特異性のない高活性の酸化物であり、木質を漂白できるユニークな特性を有している。しかし、MnPの過酸化水素に対する安定性は非常に低く、産業応用への問題点が残されている。MnPはヘムやS-S結合を有する立体構造が複雑な酵素であるため、大腸菌等による活性型酵素の生産が難しく、改変を目的とした進化分子工学的大量スクリーニングには向かないとされてきた。前述したように、無細胞系で活性型MnPが生産できたことから、過酸化水素耐性を向上させたMnPを得ることを目的に、立体構造シミュレーションを行い改変部位の候補を絞り込み、SIMPLEX法での変異ライブラリーの作製とスクリーニングを行った¹⁴⁾。MnPの過酸化水素結合部位(図7(A))は、2個のアミノ酸(Arg42・His46)から成ることが知られている。MnPの活性発現には過酸化水素が必要であるが、大過剰量の過酸化水素によりヘムブリーチングを起し不可逆的に失活することが報告されている¹⁶⁾。一方、低濃度の過酸化水素存在下でも、アミノ酸の酸化・変性は立体構造に変化を生じさせ、MnPの失活につながる可能性があると考え

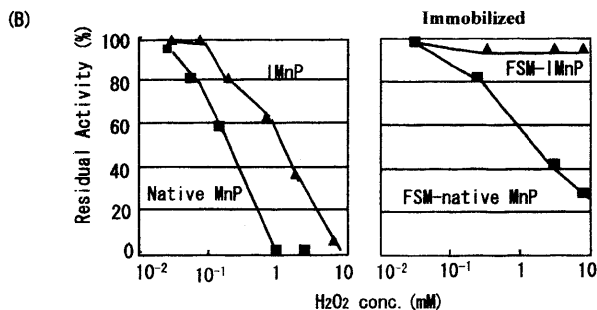
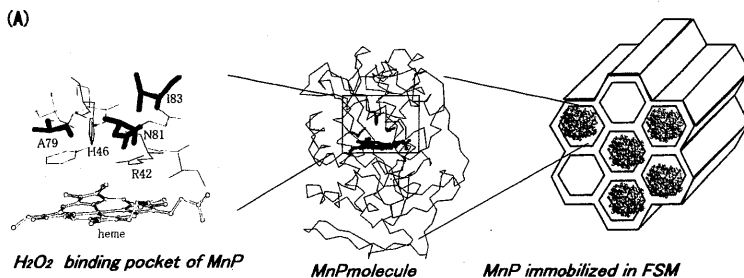


図7 MnP全体と活性中心付近の構造およびFSMへの固定化のイメージ図(A)とメソ多孔体で固定化した改変MnP(IMnP)の過酸化水素耐性(B)

表1 過酸化水素耐性酵素のスクリーニング結果

Clone	Amino acid No. ^a			H ₂ O ₂ stability ^b		
	79	81	83	0.1 mM	0.5 mM	1.0 mM
wild type	A	N	I	1.0	1.0	1.0
clone 1	E	S	L	9.0	6.6	3.9
clone 4	S	L	L	7.2	6.5	4.4
clone 6	S	S	L	5.3	4.6	3.2
clone 8	E	L	L	7.0	3.5	1.8

a: The amino acid substitutions in each clone are shown. b: Clone/wild type ratio of the half life of % remaining activity after treatment at 30 °C in the presence of various concentrations of H₂O₂.

えられる。そこで、過酸化水素結合ポケット入り口上部にある3ヶ所のアミノ酸 (Ala79・Asp81・Ile83) に着目し、それぞれ、20通りのアミノ酸にランダムに置換されるようにNNS変異を導入した変異ライブラリーを作製した (ライブラリーサイズ: 20×20×20通り)。

約10⁴ウェルについて、高過酸化水素存在下で活性を示すMnP変異体をスクリーニングした結果、過酸化水素に対する安定性が大幅に向上した4種類のタイプのクローンが得られた (表1)。いずれのクローンもIle83がLeuへ、Ala79はGluまたはSerへ、Asp81はSerまたはLeuへ変換されていることがわかった。変換されていた個々のアミノ酸が過酸化水素安定性へどのような寄与をしているのかは明らかではないが、それぞれ20種類のアミノ酸へランダムに置換した8000通りのライブラリーから、数種類のアミノ酸へ収束していたことは、大量スクリーニングが正しく機能していることへの証明になると考えられた。また、各過酸化水素濃度安定性の半減期と、野生体に対する各クローンの半減期の比を比較すると、30 °C、0.1 mM 過酸化水素に対する安定性は、clone 1で最も高く、野生体の約9倍であった。30 °C、0.5 mM 及び1 mM 過酸化水素に対する安定性についても、いずれのクローンも野生体と比較して、数倍安定化されていることがわかった。

7. 相乗効果

メソ多孔体による安定化を実現するためには酵素の分子サイズに合致したメソ多孔体を選択することが重要である。MnPの分子直径は約6.5 nmである

ことから細孔径が3, 5, 7, 9 nmのものを合成し、それぞれの安定化効果を評価した。熱安定について評価した結果、酵素サイズに最も合致した7 nmのメソ多孔体へ固定した場合が最も安定化効果が高く、以下5, 9, 3 nmの順であった。

次に天然のMnPと安定性の向上に成功したMnP (IMnP)¹⁷⁾でメソ多孔体への固定化による安定化効果の違いに関して検討した。図7(B)は天然酵素 (MnP) と改変酵素の過酸化水素耐性を対数スケールで示したものであり最も安定化効果の高かった細孔径7 nmのメソ多孔体に固定化することにより改変した酵素では野生型の固定化していない酵素に比して50倍以上の安定性を保持していることが分かった。一方、天然酵素をそのまま固定化したものでは10倍以下の安定化効果であった。このように酵素の改変とメソ多孔体での安定化技術の融合により実用化可能な安定性を有する酵素の創製が可能となった。両技術の融合が有効であった理由として一部推測の域を抜けないが、次の点が考えられる。

1) 酵素表面はメソ多孔体により、水素結合等で保護されると共に、酵素分子が1分子毎にカプセル化されることで物理的な力による立体構造が崩れたり、酵素分子同士がアグリゲーションを起こすのを阻害することで安定性が確保されている。

2) 活性中心のポケットはメソ多孔体による直接保護がないため、MnP等のペルオキシダーゼではヘムブリーチングまでは至らない低濃度であっても立体構造の変化が起き、過酸化水素の直接的な影響を受けやすい。従って、ポケット部位は構成アミノ酸を改変してあらかじめ耐性の優れたものを設計することが有効である。

この考え方は酵素のような活性中心を有するタンパク質に広く適応でき幅広い応用展開が考えられる。

8. クロロフィルの安定化

豊田中研の伊藤・福島らはメソ多孔体へのクロロフィルの吸着と安定化効果を検討した¹⁸⁾。細孔のサイズが2 nm以下の場合には吸着はほとんど認められなかったが2.4 nm以上では重量比で20%以上の吸着が認められた。クロロフィルが25%吸着したときのFSM中での占有面積を計算すると、クロロフィルは細孔表面をほぼ覆う様に吸着している事になる。一方、層状の粘土鉱物であるスメクタイト又はシリカゲル

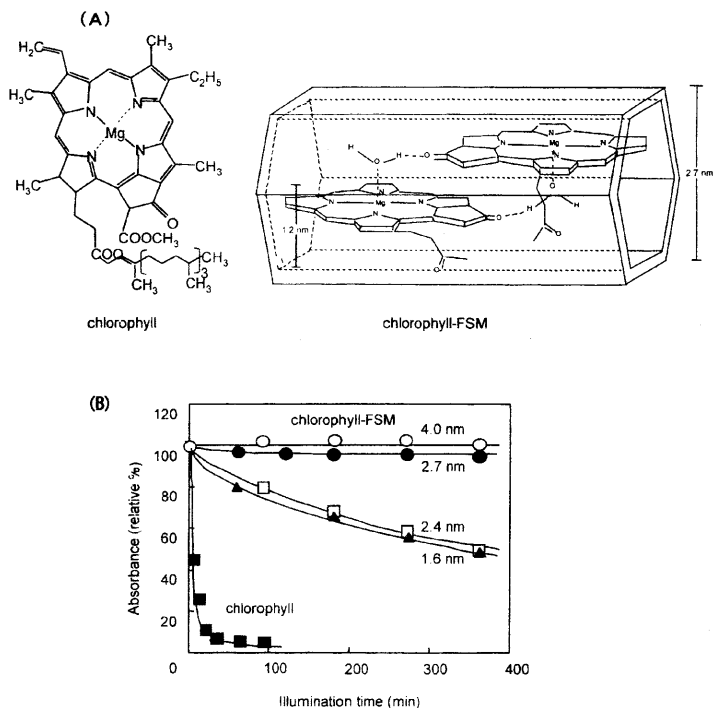


図8 クロロフィルの構造とFSMに固定化されたクロロフィルのイメージ図 (A) と光安定性 (B)

ではほとんど吸着しなかった。

次にメソ多孔体に吸着固定化したクロロフィルの光安定性を検討した結果を図8(B)に示す。横軸は光の照射時間 (min) を、縦軸は溶液の吸収極大波長の吸光度変化を光照射前の吸光度を100%としたときの相対%で示した。2.4 nm以下の細孔径のものでは安定化効果が低いのにに対して2.7 nm以上では急激に安定性が向上していることがわかった。これは吸着されたクロロフィルがモノマーからダイマーになったためであると考えられる (図8(A))。

さらにメソ多孔体に対しクロロフィルの吸着量の異なる複合体についての光安定性を調べた。

ベンゼン中のクロロフィルは665 nmに吸収極大を持ち、光照射に対し著しい退色がみられる。クロロフィルのメソ多孔体への吸着量の増加に伴って吸収極大波長が長波長側に移行し、それに伴って光安定性が增大するという興味深い結果を得た。さらに吸着量が25%に達した場合は、吸収極大波長は675 nmを示し、退色がほとんど起こらない事がわかった。緑葉中のクロロフィルの吸収極大波長が678 nmであることからクロロフィル分子がメソ多孔体に吸着する

ことにより、生体内のクロロフィルの状態に近づき、光照射に対し安定になると考えられる。

9. おわりに

本稿では、ナノサイズの均一の細孔を有する種々のメソ多孔体に酵素やクロロフィルの様なバイオ分子を吸着安定化する手法及びそのメカニズムについて解説した。即ち、メソ多孔体を酵素等のバイオ分子の安定化担体として用いる場合には、そのサイズに合致したメソ多孔体を選択し、メソ多孔体の表面特性を利用して固定化することにより優れた安定性の付与が可能であることが判明した。また無細胞系にカピのPDIを添加することで、立体構造が複雑なマンガンペルオキシダーゼ (MnP) の活性型を発現させることに初めて成功した。さらに、あらかじめシャペロンを発現させた大腸菌から得た抽出液を用いて無細胞系を構築することで、より活性型の酵素の割合を増やすことが出来ることも示した。改良した無細胞系でのスクリーニング技術を用いることで、酵素の活性中心付近の安定化が可能となり、これをメソ多孔体へ固定化することで相乗的な安定化効果を確認することが出来た。

今後、本技術の発展が期待される。

謝 辞

本研究の一部は科研費（基盤研究B，課題番号：16360418）により行われたものである。また本稿をまとめるにあたり，（株）豊田中央研究所の福嶋喜章博士，稲垣伸二博士には数多くの有益なご指導，ご協力を頂いており，この場をお借りして深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) S. Inagaki, Y. Fukushima, and K. Kuroda, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **36**, 680 (1993).
- 2) S. Inagaki, A. Koiwai, N. Suzuki, Y. Fukushima, and K. Kuroda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 1449 (1996).
- 3) D.-Y. Zhao, J.-T. Feng, Q.-S. Huo, N. Melosh, and G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6024 (1998).
- 4) J. M. Tomas, *Nature*, **368**, 289 (1994).
- 5) K. P. Scott, *Science*, **221**, 259 (1993).
- 6) S. Inagaki, S. Guan, Y. Fukushima, T. Ohsuna, and O. Terasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9611 (1999).
- 7) S. Inagaki, S. Guan, Y. Fukushima, T. Ohsuna, and O. Terasaki, *Nature*, **416**, 304 (2002).
- 8) T. Sasaki, T. Kajino, B. Li, H. Sugiyama, and H. Takahashi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2208 (2001).
- 9) H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, and S. Inagaki, *Chem. Mater.*, **12**, 3301 (2000).
- 10) H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, and S. Inagaki, *Microporous Mesoporous Mater.*, **44-45**, 755 (2001).
- 11) K. Kato, R. Irimescu, T. Saito, Y. Yokogawa, and H. Takahashi, *Biochem. Biosci. Biotechnol.*, **67**, 203 (2003).
- 12) B. Li and H. Takahashi, *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1953 (2000).
- 13) S. Rungpragayphan, Y. Kawarazaki, T. Imaeda, K. Kohda, H. Nakano, and T. Yamane, *J. Mol. Biol.*, **318**, 395 (2002).
- 14) C. Miyazaki-Imamura, K. Oohira, R. Kitagawa, H. Nakano, T. Yamane, and H. Takahashi, *Protein Eng.*, **16**, 423 (2003).
- 15) T. Kajino, C. Miyazaki, O. Asami, M. Hirai, Y. Yamada, and S. Udaka, *Methods Enzymol.*, **290**, 50 (1998).
- 16) H. Wariishi and M. H. Gold, *J. Biol. Chem.*, **265**, 2070 (1990).
- 17) C. Miyazaki and H. Takahashi, *FEBS Letters*, **530**, 249 (2001).
- 18) T. Itoh and Y. Fukushima, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13437 (2002).

Synergistic Effect for Enzyme Stabilization Involving Molecular Evolution and Immobilization in Mesoporous Materials

Haruo Takahashi and Chie Miyazaki-Imamura
Biotechnology Lab., Toyota Central R&D Labs. Inc.,

Enzymes (proteins) were successfully stabilized in mesoporous materials. When the pore diameter of mesoporous materials were controlled to nearly the same as the diameter of the enzyme, the immobilized enzyme has high stability. Because the surface amino acid residues would form hydrogen bond with silanol residues of mesoporous materials. We found that enzymes would be successfully immobilized and stabilized at the low pH region below pI of the enzyme.

A mutant MnP library containing three randomized amino acid residues located in the entry site of H₂O₂-binding pocket of MnP was evolved on a multi-well plate using SIMPLEX (single-molecule PCR-linked *in vitro* expression). The screening of more than 10⁴ samples independently expressed for improved H₂O₂ stability led to four positive mutants, the H₂O₂ stability of which was nine times higher than that of the wild-type. Immobilized MnP mutant in mesoporous material showed the high H₂O₂ stability, more than 50 folds than wild type MnP. But the stability of immobilized wild type MnP was not improved so much as that for immobilized mutant MnP.

Keywords: mesoporous materials, molecular evolution, enzyme stabilization, synergistic effect