

カルバミン酸エチル分解酵素（ウレタナーゼ）の探索

独立行政法人 酒類総合研究所

醸造微生物研究部門 副部門長 正木 和夫

【略歴】

1993 年 3 月 北海道大学理学部高分子学科卒業

1999 年 3 月 北海道大学大学院理学研究科博士課程生物科学専攻単位修得退学
(2000 年博士 (理学))

1999 年 6 月 農林水産省 蚕糸昆虫農業技術研究所 重点基礎研究研究員

2000 年 8 月 科学技術振興事業団 科学技術特別研究員 (国税庁 酒類総合研究所)

2003 年 9 月 独立行政法人 酒類総合研究所 任期付研究員

2006 年 9 月 独立行政法人 酒類総合研究所 研究員

2008 年 4 月 独立行政法人 酒類総合研究所 主任研究員

2016 年 7 月 岐阜県産業技術センター 食品部 部長研究員

2018 年 8 月 独立行政法人 酒類総合研究所 主任研究員 (地域支援ブランド支援担当)

2021 年 7 月 独立行政法人 酒類総合研究所 副部門長

(2010 年 8 月～2015 年 7 月、2018 年 8 月～現在) 広島大学大学院客員准教授併任



1. はじめに

カルバミン酸エチル (Ethyl carbamate : EC) は、ウレタン (Urethane) ととも呼ばれる化合物であり、食品 (特に、酒類) に広く含有されていることが知られている。1974 年に国際がん研究機関 (IARC) によって EC は、グループ 2B に分類された後、2007 年には「人に対しておそらく発がん性がある」グループ 2A に引き上げられている。1985 年にカナダ政府がアルコール飲料中から比較的高濃度のカルバミン酸エチルを検出し、基準値を設定した。翌年の 1986 年に、日本から輸出された清酒の一部がカナダ国内における EC の許容基準値 (100 ppb : 当時の規制値) を超えたことによってカナダへの輸入禁止となり、酒類業界においては、その対応に迫られた。

清酒中では酵母が産生する尿素とエタノールが反応して EC が生成されるため、尿素非生産性酵母の有効性が示され、実用酵母が開発された。また、製造中、熟成中の温度管理により、清酒中の EC 蓄積の低減が検討されている。これらの効果は、実用レベルで実証されているが、いずれも、生成を抑制するための手段であり、一度生成した EC を低減することはできない。現在でも、古酒においては高い EC 濃度を示す製品が報告されている。そこで、活性炭等での EC の除去も検討されているが、これまでに、清酒中に生成された EC を除去するための実用的な技術は開発されていない。また、清酒以外の酒類においては、シトルリン、シアン化水素、ジエチルピロカーボネートからの生成が知られている。現状では、その前駆体を減らすことによる EC の形成を抑制する方法が検討されているが、清酒同様、一度形成した EC を減らす方法は開発されていない。

そこで、食品に適用できる EC 分解方法として、酵素による分解が検討されてきた。しかし、これまでに、EC 分解酵素の研究例は少なく、最近まで、その実体も曖昧な部分が多い状態が続いていた。そこで、我々は、新たな酵素探索を実施し、精製、機能・配列解析及び組み換え発現を行なった。

2. ウレタナーゼの探索

カルバミン酸エチル (ethyl carbamate (urethane) ;EC) を分解する酵素は、ウレタナーゼ (EC 3. 5. 1. 75) として知られている。ウレタナーゼの最初の報告は1990年富山医科薬科大学の小橋らによる *Citrobacter* sp. 由来のものであり、ウレタナーゼに対する EC ナンバー (Enzyme Commission numbers) は1992年に付けられた。ウレタナーゼの発見から2014年までは、ウレタナーゼに関する論文は7報 (1990~2014) しかなく、4種のバクテリア由来の酵素と、1種のカビ由来の酵素のみであった。さらに、アミノ酸配列情報は、1報のみであった。

我々は、2011年頃から、微生物由来のウレタナーゼの探索を開始した。自然界からのスクリーニング、研究室が保有する微生物からのスクリーニング、文献調査等から候補となる微生物の選抜等を進め、ECを単独窒素源として資化する能力がある微生物からのウレタナーゼの単離を試みた。その結果、複数の微生物から、ウレタナーゼ活性を有する酵素を検出することができた。

酵母 *Meyerozyma caribbica*、および *Candida parapsilosis* 由来の酵素 (CPUTNase) について、精製後その性質について詳細に調べ報告した^{1,2)}。特に、*C. parapsilosis* については、すでにゲノム情報が公開されていたことから、N末端配列より、全配列をコードする遺伝子を決定し、組換えタンパク質として、その活性を確認できた。CPUTNaseは、61.7 kDa タンパク質の4分子からなるホモ四量体を形成していた。20%エタノール中では、73%の活性を保持し、0-40%のエタノール中で18時間保持した場合でも、安定に存在した。至適温度は43℃、pH5.5-10の間で活性を示し、pH10で最大活性を示した。また、予想されるアミノ酸配列から、CPUTNaseはアミダーゼファミリーの酵素だと推測された。本酵素の基質特異性を調べると、アミド化合物に高い活性を示し、この配列解析の予想を支持した。特に、ECと同様に、食品中に存在が示されているIARC発ガン性分類グループ2Aのアクリルアミドに対しては、EC以上に高い分解活性を示した。

このCPUTNaseのアミノ酸配列情報を参考に、黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のゲノム情報から相同タンパク質の検索を実施した。その結果、EC分解酵素としてアセトアミダーゼ (AmdS) と予測されていた酵素を見出した³⁾。*C. parapsilosis*とは異なり、*A. oryzae*は、ECを単独窒素源として資化することができなかったが、強力プロモーターにてAmdSを強制発現させた *A. oryzae*は、ECを資化することが可能であった。そこで、このAmdS高発現株より、目的酵素を抽出、精製し、その性質を明らかにした。その結果、ウレタナーゼ活性を示すとともに、アクリルアミドの分解活性も示した。

3. 今後の展望

近年、新たにウレタナーゼの配列情報が明らかとなったことから、ゲノム情報からウレタナーゼ遺伝子の存在予測が可能となった。現在、醸造関連微生物のゲノムにもウレタナーゼ関連遺伝子の存在が確認でき、焼酎・泡盛に利用されている黒麹菌や醸造酵母の酵素についても、解析を進めている。また、ウレタナーゼの組換え発現も可能となったことから、酵素活性に重要なアミノ酸残基の改変も可能となってきた。さらに、酸性ウレアーゼやエステラーゼもウレタナーゼ活性を示すとの報告があり、ウレタナーゼに関する情報が急速に蓄積している。これら新たな情報を利用しながら、さらに酵素探索を進め、ウレタナーゼの理解を深めていきたいと考えている。

1. Thongekkaew J. *et al.*, *Res. J. Pharmaceut. Biol. Chem. Sci.*, **9**, 276-284 (2018)
2. Masaki K. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **130**, 115-120 (2020)
3. Masaki K. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **130**, 577-581 (2020)