

## 第1章 序論

### 1-1 研究の背景と目的

近年における生命工学，生化学分野の進展はめざましいものがあり，その恩恵はますますもって計り知れないものになりつつある．一般的にも「バイオ」といえば生き物，あるいは生き物の持っている機能を用いた便利な技術であると，漠然とはしていても認識されるようになってきており，生き物の温かいイメージのためか，他の最先端の技術に比べると，いくらか親近感をもって受け入れられてきた感がある．実際の「バイオ」の担い手は遺伝子であったり，タンパク質であったり，その他多種多様な生体関連物質であるが，そのなかでも，親近感という点では今のところ酵素が最もリードしているように思われる．洗剤に代表されるように，日常の生活で違和感なく用いられ，利用していることが宣伝材料にもなるという化学物質はそう多くはない．現在のところ酵素は，安全で無害な利用価値の高いものとして受け入れられている．

酵素が安全であるといった認識は最近になって生じたわけではなく，昔から酵素が利用されてきたことに起因している．もちろん，酵素が働いているとわかってきたわけではないが，酵素反応の結果として生産された発酵食品の有用性や安全性は古くから知られていたはずである．そして17世紀以降，顕微鏡によって微生物の存在が確認され，発酵の際に反応を触媒しているのが微生物の生産する酵素であることが明らかになると，酵素自体の利用価値が注目を浴びるようになった．

酵素による触媒作用の特徴には，決まった物質と結合し，決まった部分で反応を起こし，決まった生成物を生じるといった特異性の高さがある．このために副生成物ができにくく，目的とする物質のみを得やすい．また，常温，常圧，中性付近のpHでも反応を触媒するために，反応過程の安全性を容易に向上でき，コストダウンをはかることができる．このような特性を生かして酵素を工業的に利用しようとする試みがなされてきた．現在では培養技術，精製技術の進歩により酵素を比較的安価に，大量に生産することも可能となり，従来からの食品工業に加えて，繊維工業，アミノ酸および核酸関連化合物の製造などのファインケミカル，医薬医療分野，環境汚染物質の分解，分析試薬などに広く応用されている．

工業利用が盛んになるにつれて、酵素での生産が望まれる物質の多様化が進み、天然の物質だけではなく化学合成した物質も、酵素の基質として用いる必要性が生じてきた。しかし、合成基質は水への溶解性が低い場合が多く、酵素が本来働く水系での反応には適していなかったことから、反応系への有機溶媒の導入が検討された。当初は有機溶媒の濃度を増してゆくと酵素の活性が著しく減少し、最終的には失活してしまうことから、有機溶媒の利用には限度があると考えられてきた。ところが、低含水率の有機溶媒中においても酵素の活性を維持できる場合が多々確認され、無水有機溶媒中でさえも酵素は活性を維持できることが近年になってわかってきた。また有機溶媒中では、加水分解酵素に逆反応の合成反応を行わせることもでき、通常の水系での酵素反応以外の反応に用いることが可能になった。このような能力を有するため、今までリスクの大きいプロセスを用いて合成していた化学物質を、酵素を用いた比較的安全な系において合成する研究も積極的に推し進められている。

酵素が優れた触媒作用を示すのは、そのタンパク質としての微妙な立体構造によるものである。水系ではポリペプチド鎖が水素結合、疎水性相互作用、静電氣的相互作用などの弱い力によって立体構造を維持しているが、反応系に有機溶媒を用いることにより、これらの力が影響を受け立体構造が変化してしまうと考えられる。このため有機溶媒中での利用に際しては酵素の立体構造の研究が重要であるが、反応機構、特異性に比べると研究例は少ない。固体での結晶構造解析とは異なり溶液中での構造を測定するのが困難なことに加えて、有機溶媒を用いることで酵素が懸濁状態になることが多く、分光測定（特に吸光度測定）が不可能になる場合が多いためである。

そこで本研究では懸濁の影響を受けにくい蛍光分光法を用いて有機溶媒中での酵素の立体構造変化を追跡しようと試みた。以前の研究から有機溶媒中での酵素の蛍光波長変化と、酵素の触媒活性の変化との間には明瞭な相関関係があることが確認されており、本論文では有機溶媒中での酵素の立体構造の経時変化についての考察を行う（第2章）。また、酵素の活性を保持する目的で反応系に添加剤を加えた際の立体構造保護効果について検討した（第3章）。さらに、有機溶媒中での酵素の安定性を向上させるために糖類と共凍結乾燥した酵素を用いて活性を測定した（第3章）。

以上の研究で、有機溶媒による酵素の立体構造が、溶媒組成、溶解してからの時間によりどのように変化するかを調べ、その立体構造変化をいかにして防止するかについて検討し、酵素がより効率よく有効に利用できる条件を探索した。

## 1-2 酵素

### 1-2-1 はじめに

酵素は生体によって生産された生体触媒である。その触媒としての能力は非常に高く、生体内で起こる種々の化学反応は、すべて酵素によって触媒されているとって過言ではない。原則的には、1つの化学反応には、1つの特定の酵素が関与していると考えられることから、酵素の種類も非常に多くなる。単細胞生物でさえ、生命の維持に数百万の酵素を必要とすると考えられている。また、反応の進み具合を生成物からのフィードバック、他の酵素、生理活性物質、遺伝子の発現などによる調整によってコントロールすることで、生体内のように膨大な種類の反応が一時に起こる場を維持してゆくことを可能にしている。人間の場合でも、ただ1つの酵素の異常のために生命に関わる病気になることもあり、最新の遺伝子治療に期待が集まっている。酵素は数や種類の多さもさることながら、それらが連携して働くシステムに妙があるといえる。それぞれの酵素は分子量数千の小さなものから数百万におよぶ巨大なものまであり、それらは基本的には20種類のL型のアミノ酸からなるポリペプチド鎖からなっている。単純に考えても(酵素中のアミノ酸の数)<sup>20</sup>の組み合わせが存在できるわけで、アミノ酸の数、並び方によって様々に異なった性質を持つ酵素を生み出すことができる。

酵素は生物化学における最先端の課題であると同時に、非常に古い歴史をもっている。酵素反応は何世紀もの間、醸造、発酵食品の製造、皮革産業に利用されてきたが、これらは酵素の利用というよりも、その結果のみの利用であった。酵素によって化学反応が進行するという認識は19世紀になってからのことで、その後は酵素の化学的性質が明らかにされ、本質はタンパク質であるという事が定着してきた。またさらに、酵素の3次元構造や反応機構、特異性も明らかになり、近年ではそれらの知見に基づいて工業的に利用されるケースも増加し、日々の暮らしのなかでも酵素の存在を目にする機会が多くなった。

## 1-2-2 酵素の分類

初期の研究では酵素の名称は統一性のない通称名がつけられていたが、現在では酵素の種類増加による名称の混乱を避けるために **Enzyme Commission** によって提示された命名法と分類法が使用されている。これは、触媒する反応によって、酵素に番号を振り分けたもので **Table 1-1** に示すように **Enzyme Commission** の頭文字をとった EC のあとに 4 つの数字をつけて表される。1 番目の数字は触媒する反応の種類を、2 番目は反応の部位や基質の種類を、3 番目は補酵素の種類などを、4 番目は個別番号を示している。本研究で用いたプロテアーゼは EC 3 に分類される加水分解酵素である。

Table 1-1 酵素の分類<sup>4)</sup>

EC 1. 酸化還元酵素 (oxidoreductases)
1. 1. 供与体の CH・OH グループに作用
1. 1. 1 NAD <sup>+</sup> または NADP <sup>+</sup> を受容体とする
1. 1. 1. 1 アルコール脱水素酵素
EC 2. 転移酵素 (transferases)
2. 6 窒素グループ転移
2. 6. 1 アミノ基転移
2. 6. 1. 1 グルタミン酸-アスパラギン酸アミノ基転移酵素
EC 3. 加水分解酵素 (hydrolases)
3. 4 ペプチド結合に作用
3. 4. 21 セリンプロテアーゼ
3. 4. 21. 4 トリプシン
EC 4. 脱離酵素 (lyases)
4. 2 炭素・酸素 結合切断
4. 2. 1 加水分解
4. 2. 1. 2 フマラーゼ
EC 5. 異性化酵素 (isomerases)
5. 1 ラセマーゼ, エピメラーゼ
5. 1. 1 アミノ酸とその誘導体に作用
5. 1. 1. 4 プロリンラセマーゼ
EC 6. 合成酵素 (ligases)
6. 3 C・N 結合生成
6. 3. 1 アミド合成
6. 3. 1. 1 アスパラギン合成酵素

プロテアーゼはタンパク質加水分解酵素の総称で、ペプチド結合の加水分解を行う。プロテアーゼはタンパク質を基質とするプロテイナーゼと、ペプチドを基質とするペプチダーゼに分けられる。また、基質中のペプチド結合のうちアミノ(N)末端、カルボキシル(C)末端から加水分解するものをエキソペプチダーゼ、

ペプチド鎖の内部を加水分解するものをエンドペプチダーゼと呼ぶ分け方もある。

酵素の触媒機能を発現する部位を活性部位<sup>1)</sup>という。酵素の活性部位とこれに対応する基質のサイトが Schechter と Berger<sup>2, 3)</sup>により Fig.1-1 のように命名されている。

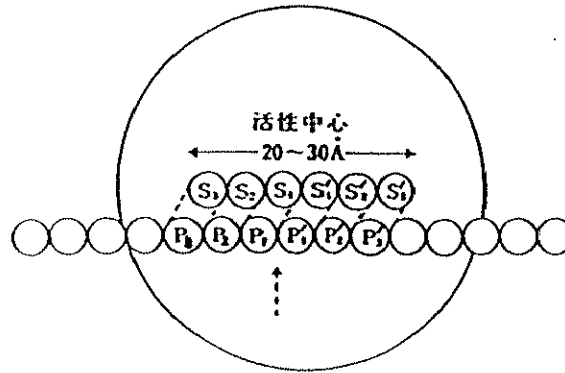


Fig.1-1 酵素タンパク質と基質の模型<sup>5)</sup>

球状タンパク質である酵素の中央部に 20~30Å の長さの割れ目があり、ここに酵素分子中の活性アミノ酸 5~7 残基くらいの領域から成る活性中心領域がある。基質分子は活性中心領域におおいかぶさるようにして、酵素-基質複合体を形成する。本図は活性中心の割れ目に基質が接近している状態を真上から見た模型である。点線矢印 (—→) は切断されるペプチド結合 (-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-) を示す。基質は、切断ペプチド結合のカルボキシル側を構成するアミノ酸からアミノ末端側に向かって P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> と命名し、一方切断ペプチド結合のアミノ側を構成するアミノ酸よりカルボキシル末端側に向かって P<sub>1</sub>', P<sub>2</sub>', P<sub>3</sub>' と命名している。基質に対応する酵素分子の活性中心のサイトはそれぞれ S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> あるいは S<sub>1</sub>', S<sub>2</sub>', S<sub>3</sub>' と命名している (Schechter & Berger )。

また、プロテアーゼの活性部位にある活性基の性質から Table 1-2 のようにセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、アスパルテイックプロテアーゼ 4 つのグループに分けられる。

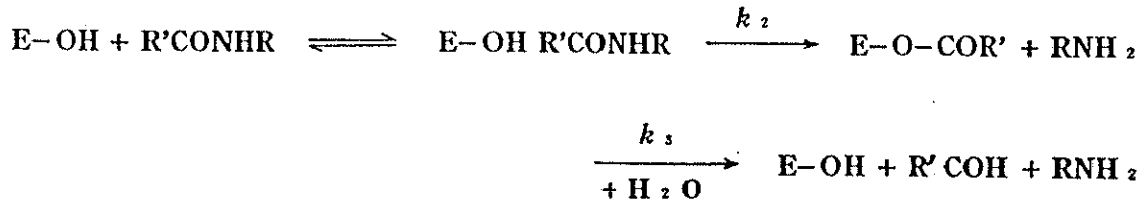
Table 1-2 プロテアーゼの分類<sup>3)</sup>

グループ名		特 色
1. セリンプロテイナーゼ	serine proteinase	活性中心にセリン残基をもち、DFP, 有機リン酸化合物で阻害される
2. システインプロテイナーゼ	cysteine proteinase	活性中心に SH 基をもつ。チオール試薬といわれる重金属あるいはその誘導体、アルキル化剤、酸化剤などで阻害される。一時チオールプロテイナーゼといわれた
3. 金属プロテイナーゼ	metal proteinase	酵素分子に結合した2価のカチオンの存在によって活性が支配される。透析、あるいはキレート試薬の添加で失活
4. アスパルティックプロテイナーゼ	aspartic proteinase	活性中心にアスパラギン酸残基とアスパラギン酸のカルボン酸イオンが関与。ジアゾ化合物、エポキシド、ペプスタチンなどで失活するものが多い。一時、酸性プロテアーゼとかカルボキシルプロテアーゼと呼ばれた

本研究で用いたのはこのうちセリンプロテアーゼである。セリンプロテアーゼは DFP (ジイソプロピルフルオロリン酸) により特異的に修飾される Ser を活性部位に含み、至適 pH が 8 付近にあることなど反応論的によく似ている。また、立体構造的にも Asp, His, Ser からなる 3 つ組アミノ酸残基をもち、これが触媒作用に重要な働きをしており、その構造はすべてのセリンプロテアーゼに共通している。セリンプロテアーゼの天然基質はポリペプチドであり、そのペプチド結合の加水分解を触媒するが、その他にも合成アミドや合成エステルの加水分解も触媒するため、種々の合成基質、特にエステル基質が触媒機構の研究によく用いられてきた。

加水分解反応機構は、共有結合的中间体が生じた後、セリン残基の水酸基が基質を攻撃して四面体中间体を生じる (Scheme 1)。これが分解するとアシル酵素となり (速度定数  $k_2$ )、次にアシル化酵素の加水分解 (速度定数  $k_3$ ) が起こる 2 段階の反応になっている。アシル化段階では、酵素と複合体を形成した基質のカルボニル炭素を、酵素のヒスチジン残基のイミダゾール基による一般塩基触媒に活性化されたセリン残基の水酸基 (E-OH) が求核攻撃する。すなわち、イミダゾール基の窒素原子が、水酸基のプロトンを引き抜くことにより水酸基の酸素原子上の電子密度を増大させ、基質のカルボニル炭素に対する求核攻撃を促

進ずる。この求核攻撃の結果として基質から脱離基が脱離し、アシル化酵素 (E-O-CO-R') が形成される。このアシル化酵素が加水分解を受け、アシレートイオンが脱離するとともに、酵素を再生して反応が完結する。



Scheme 1

### 1-2-3 $\alpha$ -キモトリプシン ( $\alpha$ -CT) <sup>42)</sup>

$\alpha$ -キモトリプシン ( $\alpha$ -CT) はこれまで述べてきたプロテアーゼの代表的なものであり、膵液中に含まれ、小腸に分泌される酵素である。 $\alpha$ -CT は膵臓で、酵素活性を有しない前駆体であるキモトリプシノーゲンとして作られる。キモトリプシノーゲンは1本のポリペプチド鎖から成り、腸管内でプロテアーゼ (トリプシン、キモトリプシン) により加水分解を受け、活性をもった  $\alpha$ -CT に変化する。キモトリプシノーゲンの1次構造は1964年に決定された<sup>7)</sup>。

$\alpha$ -CT は2つのジペプチドが切断された3本のポリペプチド鎖 (A: 1 ~ 13, B: 16 ~ 146, C: 149 ~ 245) で構成され、A鎖の Cys-1 と B鎖の Cys-122, B鎖の Cys-168 と C鎖の Cys-220 間が S-S 結合で結ばれている。また、キモトリプシノーゲンから  $\alpha$ -CT に変換されると Ile の  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> と Asp-194 の  $\beta$ -COO<sup>-</sup> の間にイオン対ができて活性に必要なコンフォメーション (立体配座) に変化する。全体としては 51 × 40 × 40 Å の楕円体で、アミノ酸残基数は 241 個、分子量は約 25000 である (Fig.1-2)。

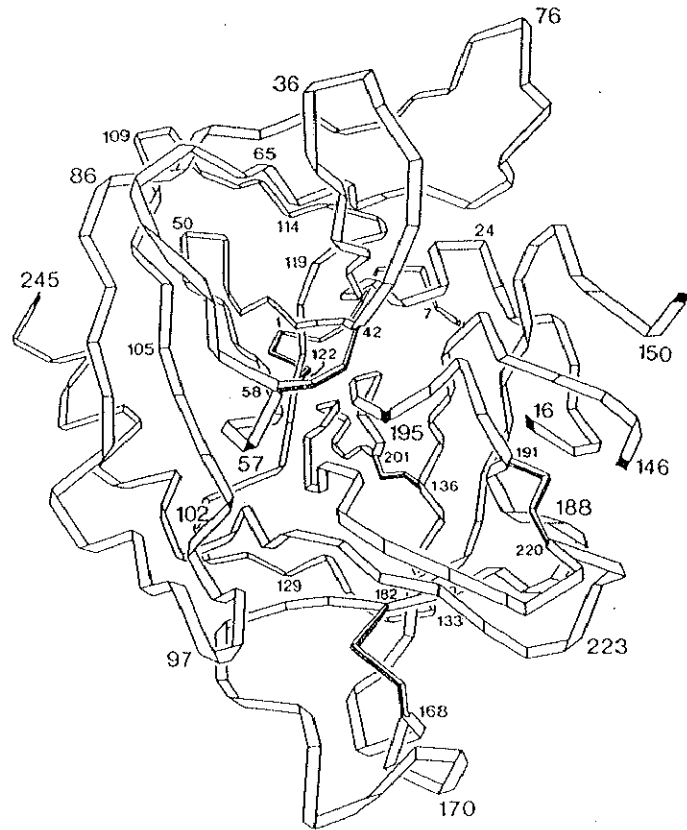


Fig.1-2  $\alpha$ -CT の立体構造<sup>6)</sup>

触媒活性部位としてセリンプロテアーゼに共通の3つ組アミノ酸 Ser-195, His-57, Asp-102 をもつ<sup>8, 46)</sup>. 3つ組のアミノ酸残基の間には電子伝達系と呼ばれる相互作用があると提唱されている (Fig.1-3). 酵素中の Asp 残基はペプチド結合にあずからない遊離のカルボキシル基を持っていて,  $\alpha$ -CT が酵素作用を示す pH 8 付近の状態では, このカルボキシル基は  $H^+$  を解離して負電荷をもつ. Asp-102 の負電荷は, 空間的に隣接する His-57 のイミダゾール基から水素原子を  $H^+$  として引き抜くのでイミダゾール基では電子が余る. この余った電子はさらに隣接する Ser-195 の水酸基の水素原子を  $H^+$  として引き寄せ, その結果水酸基の酸素原子は負電荷を帯びて活性化される. このとき近傍に基質となるペプチドがあると活性化された酸素原子はペプチド結合の炭素原子と結合して, アシル化酵素ができる. 残ったペプチドの  $-NH-$  は, 先に His-57 のイミダゾール基に引き寄せられていた  $H^+$  をもらってアミノ基となるのでペプチド結合は切断されてアミノ基の側は酵素から離れていく. 代わりに入ってきた水の  $H^+$  が His-57 のイミダゾール基に奪われ, 残った  $OH^-$  が Ser-195 に結合したアシ



ル基を奪うことで、アシル化酵素が加水分解されペプチドの残りが酵素から離れていく。アシル基を失った Ser-195 は再び活性化された状態になり、次のサイクルが始まる。このモデルには疑問ももたれているが、少なくとも Asp-102 と His-57 の電子伝達系は存在している。

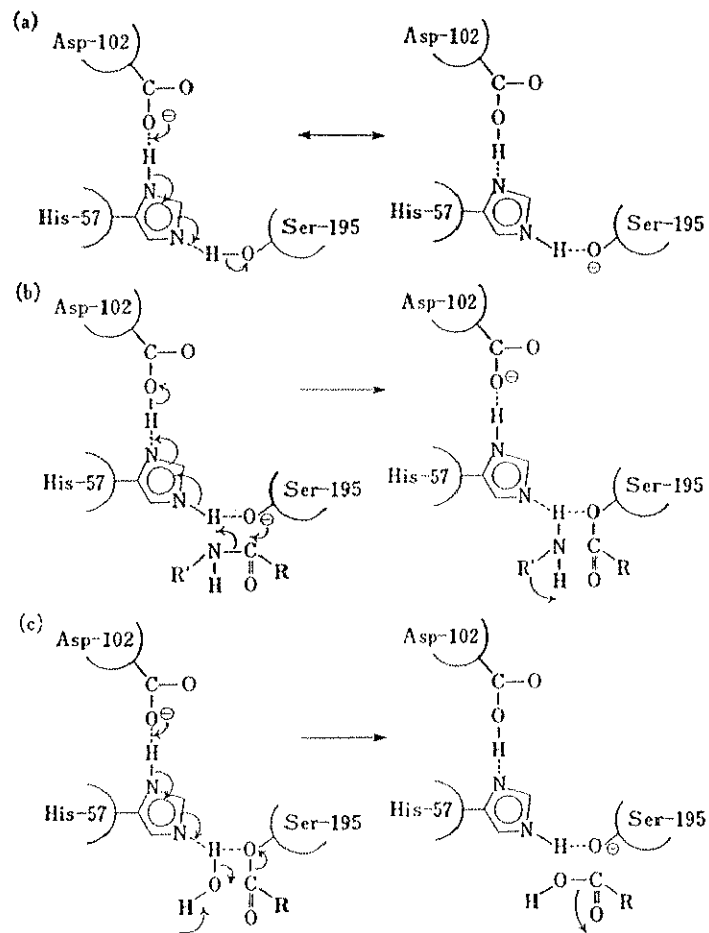


Fig.1-3<sup>9)</sup>  $\alpha$ -キモトリプシンの反応機構。(a)触媒部位アミノ酸残基の電荷伝達系 (pH 8)。(b)アシル化酵素の形成。(c)アシル化酵素の加水分解過程。(D.M. Blow, J.J. Birktoft, B.S. Hartley, *Nature*, 221, 337 (1969))

$\alpha$ -CT の活性部位は Ser-195 が攻撃しやすいような位置に基質のペプチド結合を固定するようになっている。基質結合部位は  $10 \sim 12 \text{ \AA} \times 5.5 \sim 6.5 \text{ \AA} \times 3.5 \sim 4.5 \text{ \AA}$  の大きさの幅の狭い深いポケットで、周辺は疎水性のアミノ酸残基で囲まれており、トリプトファンやインドール環など芳香族のアミノ酸の側鎖がうまく入り込み、そのカルボキシル基がちょうど Ser-195 に近接して位置するようになっている。したがって基質ペプチドの芳香族アミノ酸残基が結合した場

合は C 末端側のペプチドが触媒作用を受けることになる。また、D- 体のアミノ酸はポケットに入った場合に基質の C 末端が Ser-195 に接近しない位置をとるために、通常の状態では L- 体のアミノ酸のみを認識して触媒作用を示す。水系での加水分解反応では D- 体は阻害剤として働くことがある<sup>10)</sup> ことからポケットには入るが反応は起こらないことがわかる。

$\alpha$ -CT はペプチドでなくとも合成アミノ酸基質のエステルの加水分解なども触媒できる (エステラーゼ活性) ために広く用いられている酵素である。本研究では蛍光測定も行ったが、 $\alpha$ -CT 中には蛍光を発するアミノ酸残基である Trp 残基が 8 個、Tyr 残基が 4 個、Phe 残基が 6 個含まれている。

#### 1-2-4 スブチリシン<sup>43, 44)</sup>

スブチリシンはグラム陽性細菌 *Bacillus subtilis* 並びに他のバチルス属菌株が生産し DFP により失活する菌体外プロテイナーゼの総称である。アルカリ性界面活性剤にも比較的強いことから、工業的に生産、利用されている。

スブチリシン BPN' (STB) は *B.amyloliquefaciens* によって生産される酵素で、アミノ酸残基は 275 個、分子量は約 27600 のセリンプロテアーゼである<sup>11-13)</sup>。芳香族、疎水性、塩基性アミノ酸の C 末端側のペプチド結合を加水分解するが、特異性は切断箇所以外のアミノ酸残基組成にも影響を受ける。特に高分子基質に比較的多量の酵素を作用させた場合には厳密な特異性は認められない。ブタインシュリン B 鎖の Leu-15 - Tyr-16 結合を最も速やかに分解するが、その他の合成基質にも作用し、合成基質では N-アセチル-L-チロシンエチルエステルが最適とされている。活性部位はくぼみのようなもので、 $\alpha$ -CT に見られるようにはっきりとした構造をとっていない。スブチリシン BPN' は  $\alpha$ -CT と構造が全く異なるにもかかわらず加水分解反応機構においては  $\alpha$ -CT に類似し、反応性の高い Ser-221 を有している。Fig.1-4 に活性部位の方向から見た立体構造を示す。

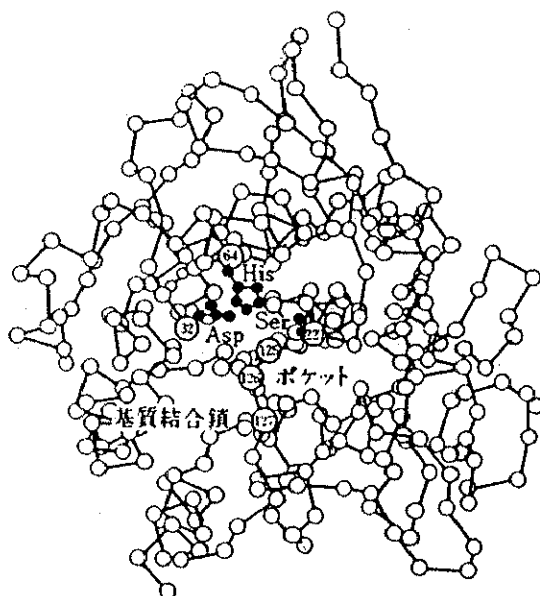


Fig.1-4 活性部位の方向から見た STB の立体構造<sup>14)</sup>

スブチリシン Carlsberg (STC) は *B.subtilis* によって生産される酵素でアミノ酸残基数は 274 個、分子量は約 27300 のセリンプロテアーゼである。STB とは 84 個のアミノ酸残基が異なり（そのうち 77 個は酵素表面にある）、56 番目の Pro が不在、ジスルフィド結合がないなどの違いがあるが、構造や触媒機構は類似している。STB と同じく基質特異性はそれ程厳密ではない。

STB は Trp 残基 3 個、Tyr 残基 10 個、Phe 残基 3 個を持つが、主に Trp の蛍光が観測される。STC は Trp 残基 1 個、Tyr 残基 13 個、Phe 残基 4 個を持ち、Tyr の影響がやや大きくなる。

#### 1-2-5 酵素の構造<sup>15, 16)</sup>

タンパク質である酵素は主にポリペプチド鎖により構成されている。1 つ 1 つの酵素には決まった特有の立体構造があり、酵素のもつ性質と密接に関連している。酵素の構造はマクロな視点で見ると一次、二次、というように段階的に議論されている。

##### ・一次構造

酵素はいずれも 20 種類のアミノ酸がペプチド結合によってつながった高分子

化合物であり Fig.1-5 のような構造をもつ。

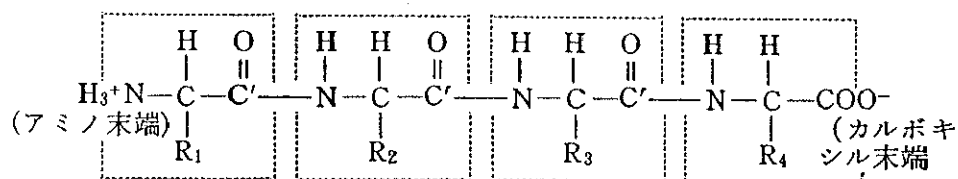


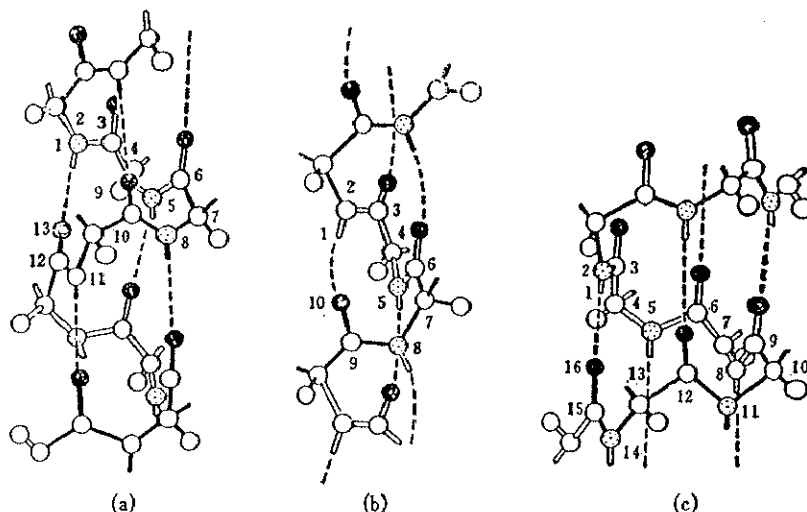
Fig.1-5 タンパク質の一次構造

点線で囲んだ部分をアミノ酸残基， $R_1, \dots, R_4$ を側鎖という。

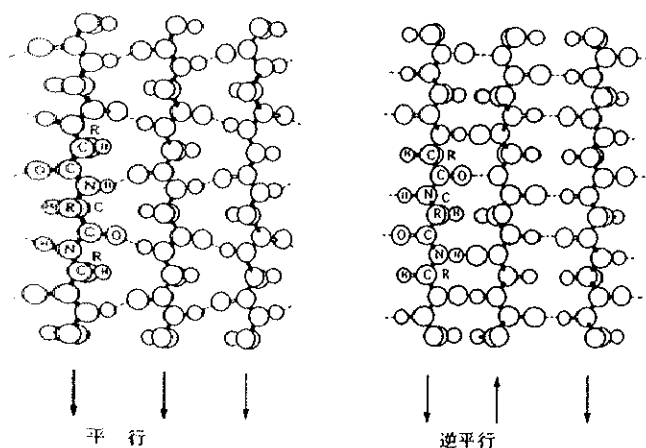
ポリペプチド鎖におけるアミノ酸の配列順序を一次構造と呼ぶ。アミノ酸残基はアミノ末端から順に番号をつけて表す。一次構造の分析法としてはアミノ末端決定法として Edman 法，カルボキシル末端決定法としてカルボキシペプチダーゼ法などが知られている。また，タンパク質をコードした遺伝子を取り出し，そこからアミノ酸配列を読みとる方法もあるが，最終的なタンパク質の一次構造が遺伝子コード通りになるとは限らないので，他の方法と併用することが必要である。

#### ・二次構造

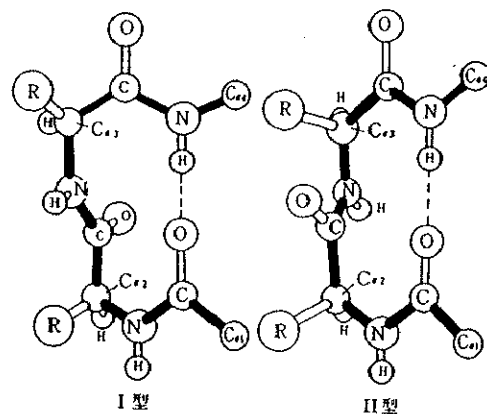
タンパク質はポリペプチドの長い鎖からできているため，主鎖を構成する各結合の周りの回転を考えると多くの配置をとることができるはずである。しかし，ペプチド結合の二重結合性，側鎖の立体障害などの制約があるために，実際には決まった構造をとるようになる。二次構造には $\alpha$ -ヘリックス， $\beta$ 構造，折り返し構造などの規則構造があり，これ以外の構造を不規則構造（ランダムコイル）と呼んでいるが，規則性がないだけで，タンパク質中では決まった構造をとっている。ヘリックス構造は立体障害のために右巻きになっている。また， $\beta$ 構造の1本のペプチド鎖は $\beta$ ストランドと呼び，何本か集まったものを $\beta$ -シートと呼ぶ。Fig.1-6 ~ Fig.1-8 にこれらの二次構造を示す。



**Fig.1-6** ヘリックス  $\alpha(3.6_{13})$ -ヘリックス(a),  $3.0_{10}$ -ヘリックス(b),  $\pi(4.4_{16})$ -ヘリックス(c). 白丸は炭素, 砂地丸は窒素, 黒丸は酸素. (T.L. Blundell & L.N. Johnson, "Protein Crystallography", Academic Press, London, p. 32 (1976))

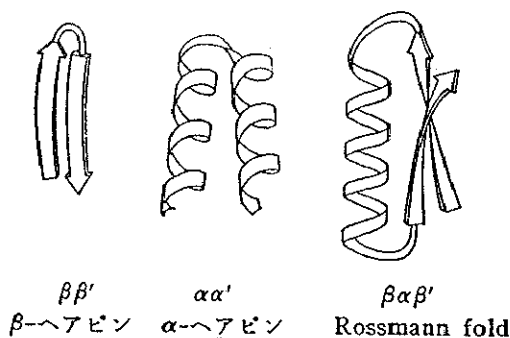


**Fig.1-7**  $\beta$ -シート



**Fig.1-8**  $\beta$ ターン

さらに, このような二次構造がいくつかまとまって存在するのが見られ, 超二次構造を形づくっている (Fig.1-9).



**Fig.1-9** 基本的な超二次構造 (J. Janin, *Bull. Inst. Pasteur*, 77, 337(1979))

二次構造，超二次構造の構成によってタンパク質を分類することも行われており，本研究で用いた $\alpha$ -CTは $\beta$ タンパク質<sup>19)</sup>（主として $\beta$ -シートをもつ），スブチリシンは $\alpha/\beta$ タンパク質（超二次構造 $\beta\alpha\beta'$ を基本とし，主に平行 $\beta$ 構造をもつ）に分類されるタンパク質である。

二次構造の分析法としてはFT-IR（アミド領域の変化），円偏光二色性（CD）スペクトル（遠紫外領域），NMRなどがある。

#### ・三次構造

二次構造，超二次構造がさらに立体的に折り畳まれたものを三次構造と呼ぶ。

Fig.1-10に規則構造を強調した $\alpha$ -CTの立体構造の模式図を示す。

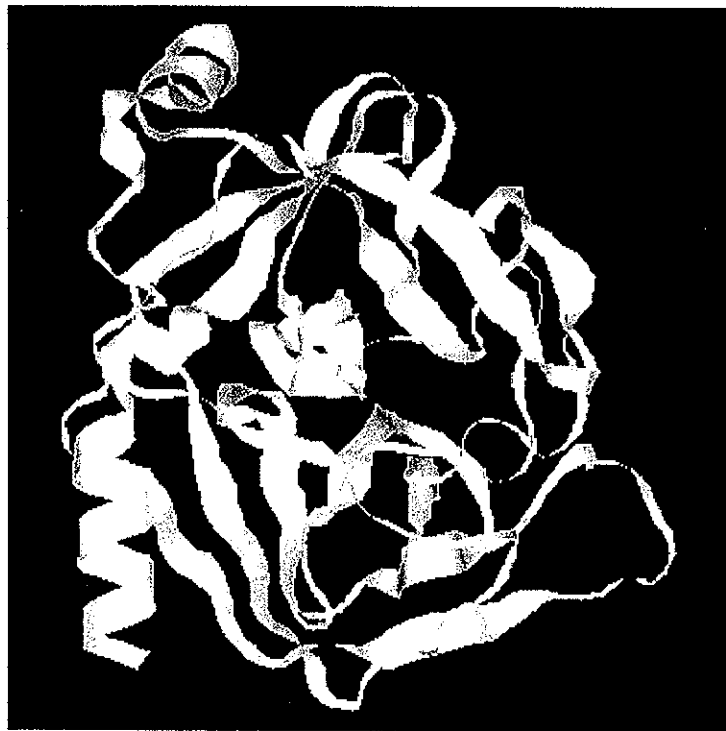


Fig.1-10 二次構造を強調して描いた $\alpha$ -CTの三次構造

酵素表面には親水性のアミノ酸残基が集まり，分子内部には主として疎水性のアミノ酸残基が集まる（疎水性相互作用）。また，水素結合，イオン結合によっても構造が定まり，これら非共有結合の弱い力が集まって酵素の立体構造を維持している。三次構造中には共有結合であるジスルフィド結合も存在するが，全くもたない酵素もある。これは，変性状態を不安定化することによって構造の安定化をはかるもので，疎水性相互作用，水素結合による安定化のエネルギーが十分

に得られない場合は、酵素中にジスルフィド結合を作り、安定性を増しているものと考えられている。

三次構造の分析法としては X 線構造解析，CD スペクトル（近紫外領域），蛍光スペクトルなどがある。本研究では、酵素の立体構造変化を調査するために蛍光スペクトルを用いた。

酵素の特異性，触媒活性はその構造に大きく依存しているので，研究の上で構造に関する知見を得ることは非常に重要になっている。

### 1-3 有機溶媒中での酵素反応

#### 1-3-1 有機溶媒を用いた酵素反応の経緯

酵素は生体触媒ということもあり触媒作用を水系でのみ発揮する，と以前の酵素に関する研究では考えられていた。発酵食品の製造も，醸造も，古くから酵素を用いた物質の生産は水系で行われてきた。特にプロテアーゼを含む加水分解酵素は加水分解を触媒することからも水は必須なものとして考えられてきた。しかし，1911 年に初めて酵素を純粋な水系以外で用いた研究がなされ<sup>114)</sup>，酵素が天然の基質以外の合成基質も認識し<sup>10)</sup>，また加水分解酵素によって合成反応（逆反応）を触媒することも可能なことがわかった<sup>20, 21)</sup>。こうして工業的な利用価値が高まってくると，合成基質の水への溶解性の低さが問題となってきた。この問題を解決するために，水系にアルコールなど親水性有機溶媒を加えることが検討され<sup>22, 23)</sup>，合成基質の溶解性を向上させた。しかし，酵素活性自体は，数十パーセントの有機溶媒を加えたところで失活してしまった。その後も有機溶媒を用いる研究は続けられ，有機溶媒によって酵素の性質が変わることがわかってきたが<sup>24)</sup>，高濃度の有機溶媒は用いられなかった。

ところが 1980 年代になって高濃度の有機溶媒を反応系に使用しても，酵素活性を保持するのに最低限の水さえ存在すれば，酵素は活性を保持するということが相次いで発見された<sup>26, 27)</sup>。これ以降，酵素の特異性を活かした有機合成への期待から盛んに研究が進められ，多くの総説が出るまでになっている<sup>28~41)</sup>。

### 1-3-2 反応系に有機溶媒を用いた際の特徴

酵素反応に有機溶媒を用いる利点には次のようなものがある。

- 1) 水に難溶な基質の溶解性が向上するため、基質の選択の幅が広がる。
- 2) 加水分解の逆反応の合成反応に対する触媒作用が利用可能になる。  
また、その際の副反応である加水分解の抑制にもつながる。
- 3) 加水分解作用が抑えられるため、酵素の自己消化を防止できる。
- 4) 基質特異性、立体特異性、位置選択性の溶媒による制御が可能になる。
- 5) 低沸点の有機溶媒を用いるために生成物の分離が容易になる。
- 6) 微生物の繁殖が抑制されるため、微生物自体による汚染、分泌する酵素による望ましくない反応が生じにくい。

有機溶媒を用いた研究は大きく分けて疎水性有機溶媒を用いるものと、親水性有機溶媒を用いるものがある。

疎水性有機溶媒を用いる際は、有機相と水相に分かれる二相系、有機溶媒と混和可能な極微量の水のみが存在する均一系がある。二相系の場合は酵素は水相に、基質、生成物が有機相に存在することになり、物質の拡散が大きく影響することから、水相を微小なものに保つために界面活性剤が用いられることもある。均一系の場合は酵素が直に有機溶媒に接するために、酵素の調製法などが問題になる場合も多い。また、水が微量なために熱失活が起こりにくくなっている。これは熱失活の生じるプロセスに水が必要なためである。

親水性有機溶媒を用いる際はすべて均一系になる。親水性有機溶媒は疎水性有機溶媒と違い、酵素から必要な水分をはぎ取る性質が強い。そのために酵素を有機溶媒から保護する必要性が高くなってくる。本研究では親水性有機溶媒を用いる方法を採用しているために、系中における酵素の安定性の向上が重要な課題になっている。

どちらの場合でも、有機溶媒の性質が酵素活性に大きく影響することは同じであるため、有機溶媒の選定、水濃度の最適化が重要になる。有機溶媒のどのような性質が酵素活性を変化させるかについては、未だにわからない部分が非常に多い。疎水性有機溶媒では log P (疎水性度を示す値。1-オクタノール/水間での



分配係数) が関わってくるようだが<sup>45)</sup>, すべての場合に適用できるわけではない. 親水性有機溶媒の場合でも誘電率,  $\log P$ , 極性などの性質によって酵素活性との相関を示すまでにはいたっていない. 有機溶媒と酵素活性の関連性については, 溶媒の性質のみでなく, 溶媒によって変化する酵素の立体構造も深く関わってくると考えられるので, 両面から検証していくことが必要となってくる.

## 1-4 蛍光分光法

### 1-4-1 蛍光の利用

タンパク質は様々な特異的な構造をもつことで, その優れた機能を発揮している. 酵素の反応機構, 特異性もまた活性部位の構造などの立体構造が大きく関わっていることはいうまでもない. そのため酵素の研究においては, その立体構造の解明が非常に重要な位置を占めている. X線構造解析を用いることで, 酵素の結晶状態での立体構造に関しては比較的よく研究されている<sup>17, 18)</sup>. 立体構造に関する研究と, 基質特異性に関する研究によって, 先に述べたプロテアーゼの反応機構などが解明されてきた.

しかし実際には, 酵素反応はほとんどの場合溶液中で行われるために, 結晶状態の立体構造だけではなく, 溶液中での立体構造も知る必要がある. 溶液中での酵素の立体構造を知る手段としては IR<sup>47~51)</sup>, NMR<sup>52)</sup>, CD<sup>53~56)</sup>, 蛍光分光などがあるが, 溶媒の種類に関わらず溶液中の酵素の状態を観察できるのは蛍光分光のみである. さらに吸光度測定ではないために, 懸濁状態の酵素にも対応できる利点がある. これは, そのほとんどが懸濁状態となる高濃度の有機溶媒中での酵素の立体構造を調べる上では大変有利である. また, 蛍光分光では励起, 蛍光スペクトル, 蛍光偏光, 量子収率, 蛍光寿命といったように得ることのできる情報が多いのも特徴で, 種々の研究に用いられている<sup>57)</sup>.

### 1-4-2 蛍光の特性

蛍光は, 電磁波(光)と分子との非弾性的相互作用の結果生じるが, その際, 入射光のエネルギーのすべてが発光のエネルギーに変換されるわけではない. 常

温では大部分の蛍光分子や蛍光団は基底電子状態の最低振動準位に存在する。光子のエネルギーを吸収すると、分子はより高い電子状態の多くのエネルギー準位のどれかに励起される (Fig.1-11)。

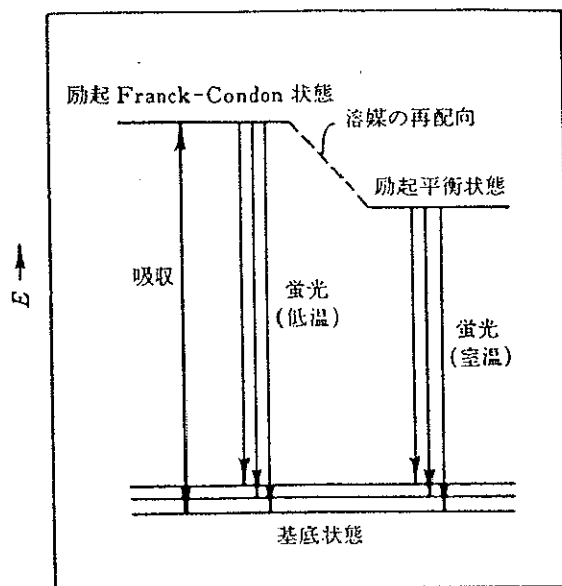


Fig.1-11 励起と蛍光の発光に関する諸遷移<sup>5,8)</sup>

励起分子は速やかな無放射失活により第1励起状態の最低振動準位に落ちつく。この過程により励起エネルギーの一部が失われ、分子は遷移の終状態である励起 Franck-Condon 状態に達する。この励起状態は有限の寿命を持ち、生化学的に興味のある蛍光種に対しては平均 1 ~ 100 ns である。この寿命内で、励起された分子は周りの有極性溶媒分子や、生体高分子中では隣接した極性基と相互作用する。有極性溶質-有極性溶媒の場合には、励起によって溶質分子の双極子モーメントが変化し、励起直後の非平衡な Franck-Condon 状態からの平衡状態への緩和過程は、励起溶質分子の周囲の溶媒あるいは極性基の双極子の再配向過程がその主要なものと思われる。この種の相互作用は双極子-双極子相互作用と呼ばれる。励起分子はこのようにしてより低いエネルギーをもつ安定な励起平衡状態に達したのち、基底状態のいろいろな振動準位に遷移を起こすが、この遷移では蛍光の発光過程と無放射過程の2つの過程が競合する。励起状態の様々な失活のために蛍光の放射エネルギーは一般に励起エネルギーよりも低くなり、蛍光スペクトルは励起スペクトルよりも長波長側にシフトする。この長波長シフトは蛍光分子周辺の微環境、とりわけその極性に敏感である。また、分子が励起状

態から基底状態へと下がる時に放出する大きなエネルギー量子を溶媒が容易に奪えるかどうかによって蛍光の強度が決まる。水などの振動準位間の間隔が大きな溶媒は電子エネルギーの大きな量子を受け入れる（強度が弱まる）が、振動準位間が狭いものではそうならないことがある。この蛍光特性を指標にして、タンパク質のコンフォメーション変化（微環境の変化）を検出するための感度の良いプローブとして蛍光ラベルを使用することができる。

### 1-4-3 タンパク質の蛍光スペクトル

タンパク質の蛍光は、他の光学的測定法とともに水溶液中のタンパク質の構造の研究に比較的好く用いられている<sup>68-70)</sup>。蛍光からの構造解析は対応づけが難しい面もあるが、これは、光の放出に至る過程は吸収に比べると複雑であって、周囲の影響を受けやすいことによる。しかし、このことは蛍光によるタンパク質の高次構造の解析が他の方法に比べて、発色団のミクロな環境の変化に敏感であって、他の方法よりも局所的な構造変化の検出に適しているということにもなる。また、吸光度法が共有結合の状態を反映するのに対して、蛍光法は非共有結合の状態も良く反映する。溶媒中でのタンパク質の構造変化は共有結合が切れるものではなく非共有結合の状態が変化するのが主であるから、蛍光法はその検出に非常に適した方法であるといえる。

タンパク質の蛍光法による研究では、外部からのラベルとして色素を用いた活性部位の決定など<sup>76, 77)</sup>もあるが、タンパク質自体の構造を見るのにはなるべく外部からの影響を少なくすべきである。そこで、タンパク質中には内部蛍光ラベルとして蛍光を発するアミノ酸残基が含まれていることから、これを利用することが多い。色素などを含まない通常のタンパク質は 280 nm 付近に吸収帯を持ち、340 nm 付近に蛍光を発する。これがタンパク質の自然蛍光と呼ばれるもので、この吸収帯に寄与しているアミノ酸残基にはトリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、フェニルアラニン(Phe)がある。Phe は吸光係数、量子収率ともに低く、Trp, Tyr を含まないタンパク質以外では無視することができる (Table 1-3)。また、Trp 残基を含まない場合を除くと Tyr 残基の蛍光は小さく、Trp 残基の蛍光のみが強く現れ、この蛍光がタンパク質の種類、構造の変化によって大きく異なるというのが一般的である<sup>146)</sup>。α-CT には Trp 残基が 8 個、

Tyr 残基が 4 個, Phe 残基が 6 個存在するが主に Trp の蛍光が観測される。

Table 1-3 芳香族アミノ酸の量子収量<sup>5,9)</sup>

アミノ酸	吸収 極大 波長 (nm)	分子 吸収 係数	蛍光 極大 波長 (nm)	量子収量		
トリプトファン	278	5,500	348	0.20	0.13	0.119
チロシン	275	1,340	304	0.21	0.14	0.088
フェニルアラニン	257	190	282	0.04	0.024	—
測定条件				水	水, pH 6 23°C	水

タンパク質中の Trp, Tyr 残基の置かれている状態は一様なものではなく、一次構造上も、また、高次構造上から考えても、それぞれ異なるマイクロ環境に囲まれており、それらそれぞれの蛍光への関与の総体としてタンパク質の蛍光が観測される。両基の蛍光に及ぼす影響の違いから Cowgill<sup>6,10)</sup> はタンパク質中の両残基を次のように分類している。

A. トリプトファン残基

- 1) 消光されていないもの
  - a. 疎水域にあるもの ( $R_{Trp}=2.5\sim3.5$ )
  - b. 水に接しているもの ( $R_{Trp}=2.0\sim3.0$ )
- 2) 水和したペプチドのカルボニル基により消光されているもの ( $R_{Trp}=0.50\sim0.75$ )
- 3) ジスルフィド基により消光されているもの
- 4) イオン化したチロシン残基により消光されているもの
- 5) 塩基性アミノ酸残基との電荷移動相互作用によって消光されているもの

( $R_{Trp}$ , および  $R_{Tyr}$  はトリプトファンおよびチロシンの量子収量との比を示す)

B. チロシン残基

- 1) 水に接し、消光されていないもの ( $R_{Tyr}\approx 1$ )
- 2) 水和したペプチドのカルボニル基によって消光されたもの ( $R_{Tyr}=0.25\sim0.35$ )
- 3) ジスルフィド基によって消光されたもの
- 4) イオン化したチロシン残基によって消光されたもの
- 5) 疎水域中にあり、ペプチドカルボニル基と水素結合しているもの ( $R_{Tyr}=0$ )
- 6) イオン化したカルボキシル基との衝突によって消光されたもの
- 7) 5) および 6) に属するチロシン残基で消光されたもの
- 8) トリプトファン残基によって消光されたもの

タンパク質中で溶媒に接しうる Trp, Tyr 残基は、溶媒との相互作用によって吸収および蛍光にいろいろな変化が見られる。溶媒の極性が変化すると、まず吸収波長に変化が見られ、極性が低くなると長波長へのずれが起こることがある。蛍光測定の場合このような吸収スペクトルの変化が生じると、当然励起スペクトルにも同じ変化が観測され、一定波長で励起して蛍光を測定している場合には蛍光強度にも変化が現れる場合がある。蛍光スペクトルに及ぼす極性の影響を見る

と Table 1-4 に示すように Trp の蛍光極大は極性が低くなるにつれて短波長へ移動する<sup>61, 62)</sup>。しかしこれは定性的なもので、波長の移動と溶媒の誘電率との間に定量的な関係はない。量子収率は極性の低下とともに増加する<sup>62)</sup>。おおまかにいえば誘電率の低いものは蛍光を強め、高いものは低下させる傾向がある。

Table 1-4 種々溶媒中の蛍光極大波長

溶 媒		蛍光極大波長 (nm) (励起波長280 nm)		
種 類	誘電率	インドール	インドール-3-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN	N-アセチルトリプトファンメチルエステル
水	78.5	350	350	350
メタノール	32.6	330	340	340
n-プロパノール	20.1	330	340	340
n-ブタノール	17.1	330	340	340
ブチルエーテル	(4)	310	320	330
p-ジオキサン	2.2	315	325	330
n-ヘキサン	1.9	300	310	310

タンパク質中のこれらの残基は水と接するものと内側の疎水域に埋もれているものが存在することから、タンパク質の蛍光の最大波長が Trp 単独の場合のそれより短波長側にあり、タンパク質の種類や構造変化によって変わることになる。内側の残基の蛍光よりも、溶媒と接する残基の蛍光のほうが長波長になることの説明としては Lippert ら<sup>63)</sup> の溶媒分子の双極子緩和にもとづく考え方をするもの<sup>64, 65)</sup> と、溶媒分子と励起状態の残基との励起錯体の形成にもとづく考え方をするもの<sup>66, 67)</sup> とがある。

#### 1-4-4 蛍光の消光<sup>60)</sup>

水溶液中における蛍光物質の強度が、ある種の物質の添加によって著しい消光（蛍光強度の減少）を引き起こすことはよく知られている。このような消光を引き起こす物質、すなわち消光剤としてはアクリルアミドやトリクロロエタノールなどの電荷を持たない有機物質がよく知られている。また、負電荷、または正電荷をもった消光剤としては、I<sup>-</sup>イオンや Cs<sup>+</sup>イオンが知られている。これらの消光剤を用い、消光の程度（消光能率）を測定することによって、例えばタンパ

ク質中の Trp 残基のタンパク質内への埋め込まれ具合を知ることができる。このことを利用した研究<sup>71-74)</sup>がなされており、消光についての総説<sup>75)</sup>も出ている。

消光過程には次の二通りがある。

- (1) 基底状態の蛍光性分子と消光分子との間にゆるい結合をした錯体を生じ、これが蛍光性をもたないために生じる消光（静的消光）。
- (2) 励起蛍光分子が消光分子と衝突してエネルギーを失活する消光（動的消光）。

静的消光は蛍光分子と消光分子との励起前における弱い結合によるので、消光の温度係数は負であり、消光分子の添加により蛍光性分子の吸収スペクトルに一部変化が現れる。これに対し、動的消光では温度係数は正で、吸収スペクトルに変化がなく、静的消光とは様子が異なる。

消光の解析は、消光前の蛍光強度と、消光後の蛍光強度を比較して行う。どのくらい消光を受けたかを測定することで、Trp がどの程度タンパク質に埋められているかがわかる。疎水性のアミノ酸残基である Trp は通常はタンパク質の内側にあることが多く消光作用を受けにくいため、Trp の消光の度合いが大きくなることはタンパク質の立体構造に大きな変化が生じた可能性を示唆するものである。さらに解析する場合には Stern-Volmer の式を用いることもできる<sup>76)</sup>。今、消光剤が存在する場合、しない場合について、励起された蛍光分子[T\*]のたどるプロセスを3通り考える。

Process	Rate
$T^* \longrightarrow T + h\nu$	$k_1 [T^*]$ (1)
$T^* \longrightarrow T$	$k_2 [T^*]$ (2)
$T^* + Q \longrightarrow T$	$k_3 [T^*][Q]$ (3)

ここで、(1)は蛍光を発する場合、(2)は無放射失活をする場合、(3)は動的消光が起こる場合である。定常状態近似を用いると消光剤が存在しない場合の量子収率  $F_0$  は、次式のようになる。

$$F_0 = \frac{k_1}{k_1 + k_2} = k_1 \tau_0 \quad (4)$$

$\tau_0$ は消光剤がない場合の蛍光の寿命である。消光剤が存在する場合の量子収率  $F$  は、次のようになる。

$$F = \frac{k_1}{k_1 + k_2 + k_3 [Q]} \quad (5)$$

(4), (5)を結合すると一般的な Stern-Volmer 則<sup>7,9)</sup> が得られる。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_0 [Q] \quad (6)$$

ここで、消光効率  $K_0 = k_3 \tau_0$  である。 $K_0$ の値は  $F_0/F$  vs.  $[Q]$ のプロットの傾きから得ることができる。

タンパク質にはおかれた環境の異なるいくつかの蛍光分子が存在することもあり、その場合には(6)の式を個々の蛍光分子についてあてはめ、次のように変形した Stern-Volmer の式を得る。

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{[Q] f_0 K_0} + \frac{1}{f_0} \quad (7)$$

$f_0$ は溶媒にさらされていて消光剤が接近できる側鎖の割合を示している。消光剤が接近できない側鎖  $f_0$  と足しあわせると1になる。(7)式より  $F_0/F$  vs.  $1/[Q]$ のプロットを行うと直線の傾きから  $(f_0 K_0)^{-1}$ が、切片から  $1/f_0$ がわかる。したがって  $K_0$ は切片を傾きで割ればよい。

実際の消光において  $F_0/F$  vs.  $[Q]$ のプロットは蛍光を発する残基が1つの場合には直線を与える。これは蛍光が1つの環境から発せられているためである。しかし、ある場合には下に凸の曲線を与える。これには2つの要因が考えられるが、1つには静的消光過程が含まれていることである。これは消光剤分子と暗複合体を形成し、蛍光発光を完全に不能にしてしまうタイプの消光である。もう1つは溶質間の衝突の速度定数が厳密には時間の関数であることが考えられる。蛍光を発する残基が2つ以上の場合には、残基の環境が異なったものであれば上に凸の曲線になる。これは、消光を受ける残基のタンパク質中への埋め込まれ具合によって、消光剤の接近が容易になったり、困難になったりして消光にばらつきが生じるためである。

このように、消光の度合い、Stern-Volmer の式による解析を行うことで、タンパク質（酵素）の立体構造の変化を Trp 残基の環境変化から推測することが可能になる。

## 1-5 有機溶媒中での酵素の安定化

### 1-5-1 酵素の変性

酵素分子はそれぞれ固有の規則正しい二次、三次構造をもっている。酵素分子は高分子であるので、とり得るコンフォメーションの数は非常に多くなり、ランダムなコンフォメーションをとっていた方がエントロピー的に安定なはずである。しかし、酵素のコンフォメーションはただひとつであり、しかも極めて規則的である。これは多くの非共有結合的相互作用が分子の安定化に寄与しているためである。しかし、この力は生理的な pH、温度、塩濃度の水溶液において安定に存在できるものであり、極端な pH、高温において、その規則正しい構造は壊れてしまう。また、高濃度の尿素、塩酸グアニジン、有機溶媒、塩類、界面活性剤などの変性剤によっても酵素は不安定になって立体構造は破壊される。このような、共有結合はそのまま非共有結合が破壊される状態を変性と呼ぶ。

変性の研究はタンパク質の発見とともに始まったと言えるほど古く、変性した酵素は失活するということがあって実用的にも重要な研究課題であった。尿素や塩酸グアニジンによる変性では酵素はランダムコイルの状態になるのに対して、有機溶媒による変性では水素結合が増加した構造になり、ヘリックス含量の増加した構造への転移がしばしば見られる。また、酵素の立体構造に重要な疎水性相互作用は破壊される。しかし、有機溶媒による変性は種類、組成によって大きく異なり、更なる作用機構の解明が必要とされている。

### 1-5-2 有機溶媒中での酵素活性の保護

有機溶媒中での酵素活性の保護のために様々な方法が採られている。有機溶媒に不溶な担体上に酵素を固定化する<sup>8<sup>1</sup>・8<sup>2</sup>)</sup>、ポリエチレングリコール(PEG)などで酵素を修飾する<sup>8<sup>3</sup>)</sup>、グルタルアルデヒドなどで酵素同士を架橋し不溶にし



て用いる<sup>84)</sup>，部位特異的突然変異 (**site-directed mutagenesis**) を用いて酵素のアミノ酸を改変する<sup>85)</sup>，添加剤を反応系に加えるといった手法が用いられているが，その中でも添加剤を加える手法は簡便な方法である．効果のある添加剤としてはペプチド<sup>86)</sup>，アンモニウムイオン<sup>87)</sup>，無機塩<sup>88, 89)</sup>，polyol, 糖類，アミドなどの水素結合能力のあるもの<sup>94, 95)</sup>が報告されている．

水素結合能力のある物質は，有機溶媒への溶解度が高く，比較的安価なためによく用いられている．これらのものは少量でも効果が現れ，反対に多量に用いると，アルコール類の研究では酵素を阻害する結果も得られている<sup>90, 91)</sup>．また，酵素が活性を発現するためには水が必須であるが，これは構造の柔軟性（フレキシビリティ）を維持するためと考えられており，これらの添加剤には水の替わりをする期待も寄せられている．有機溶媒を用いた反応系から水を完全に除去することは酵素の失活を招くが，もしも水以外の物質添加によって酵素の活性が維持できるのであれば，副反応である加水分解反応を抑制できることにつながる．この効果は **water mimic** と呼ばれており<sup>92)</sup>，効果が上がっている．添加物の構造が酵素に与える効果はアルコールの鎖長<sup>91)</sup>，水酸基の数<sup>93)</sup>と関連づける研究例もあるが，未だよくわかっていないのが現状である．本研究では添加剤の効果が有機溶媒中での酵素の構造の経時変化に対しても有効かどうかを検証した．

添加剤を用いる際に凍結乾燥と併用する，共凍結乾燥の研究が最近進められてきている．これは，酵素を保護する添加剤の分子をより効率よく酵素周辺に集めることができる利点がある．また，凍結乾燥を酵素単独で行うと会合により不可逆な構造変化が起こったり<sup>101, 102)</sup>，可逆的ではあるが酵素の構造が変化し失活する<sup>100)</sup>ために，凍結乾燥時に保護剤が必要なこともその原因である．凍結乾燥する際のタンパク質の構造変化についての研究が **NMR**，**IR** を用いて行われている<sup>107, 108)</sup>．保護剤としては無機塩<sup>88, 89, 99)</sup>や，糖類<sup>96, 97)</sup>の研究がよく行われており，糖類は凍結乾燥時に奪われる水の代わりに酵素と水素結合をすることで保護効果が生じると考えられている<sup>98)</sup>．また，酵素の阻害剤や基質アナログとの共凍結乾燥により酵素の特異性が変化するというモレキュラーインプリンティングの効果も確認されている<sup>103~106)</sup>．本研究ではグルコースのオリゴマーであるシクロデキストリン (**CyD**) 類の共凍結乾燥効果を調べた．

## 1-6 研究目的

酵素を有機溶媒中で用いる研究は以前から行われているが、酵素反応と立体構造の変化と関連づけて行われた例は少なく、酵素がどのような状態にあるかについての情報は乏しい。しかし、酵素の立体構造と活性とは密接につながったものであり、構造の研究抜きでは更なる酵素の有効利用はなされないと考えられる。本研究においては、有機溶媒中におけるセリンプロテアーゼの立体構造が、溶媒組成、時間経過によりどのように変化するのかを蛍光スペクトル、反応初速度から検出し、さらにその望ましくない立体構造変化をいかにして防止するかについて検討した。それらの結果より、有機溶媒中で酵素をより有効に利用しうる条件を探索することを目的とした。