

第2章 *Comamonas acidovorans* TB-35株におけるポリウレタン分解酵素の局在

第1節 緒言

本研究に用いたポリウレタン (PUR) は、ポリオール (ポリジエチレングリコールアジペート) とイソシアネート (トリレン-2,4-ジイソシアネート) を構成成分とする。TB-35株によるPUR分解の結果、分解産物としてジエチレングリコールとアジピン酸が検出された。ポリジエチレングリコールアジペートはジエチレングリコールとアジピン酸がエステル結合を介して連結したポリエステルであることより、TB-35株はポリジエチレングリコールアジペートのエステル結合を切断していることが示唆された(22)。そこで、TB-35株の生産するエステラーゼについてその局在及びポリウレタン分解活性の検討を行うこととした。

第2節 実験材料及び実験方法

2-1 供試菌株及び試薬

菌株は、エステル系PUR分解菌としてNakajima-Kambeらにより単離された、*Comamonas acidovorans* TB-35株を用いた。20%のグリセロールを含む生理食塩水中に懸濁し、-80℃で凍結保存したものをを用いた。

ポリジエチレングリコールアジペートは日本ポリウレタン工業社製を用いた。各種界面活性剤は同仁化学研究所社製のDetergent starter kit IIを用いた。その他の試薬は和光純薬工業社製の特級またはそれに準ずるものをを用いた。

2-2 供試ポリウレタン

市販されているPURは可塑剤等の不純物を含んでいるため、不純物を含まないPURを合

成し本実験に用いた。合成方法は、Darbyらの方法(14)に従った。ポリジエチレングリコールアジペートとトリレン-2,4-ジイソシアネート (2,4-TDI) をOH基とイソシアネート基が1 : 1となるように無水状態で混合後、80℃で3時間加温し重合させた。ポリジエチレングリコールアジペートには、末端のOH基の数を増やすために、合成時にトリメチロールプロパンが少量添加されている。本実験で用いたポリジエチレングリコールアジペート末端の平均OH基数は2.7、平均分子量は約2,500であった。なお、合成されたPURは水または有機溶媒に不溶のため、分子量の測定は不可能であった。

2-3 培養条件及び酵素画分の調製

合成したPURを唯一炭素源としてTB-35株を培養した。表2-1に示した無機塩培地100 mlと5 mm角に切ったPUR1.0 gを加えた500 ml容三角フラスコに、Nutrient Broth平板培地上で30℃、3日間培養したTB-35株を2白金耳植菌し、30℃で7日間回転振盪培養を行った(120 oscillations/min)。培養終了後遠心し(8,000 rpm、10分)、培養上清と菌体を得た。培養上清は、限外濾過(YM10、Millipore社製)にて濃縮・脱塩を行った。菌体は、2%のコール酸ナトリウムを含む20mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に懸濁した後、4℃で24時間攪拌した。懸濁液を遠心(8,000 rpm、10分)して菌体を除去した後、限外濾過(YM10、Millipore社製)にて濃縮とコール酸ナトリウムの除去を行った。

2-4 菌体からの酵素抽出に用いる界面活性剤の検討

より効率よく菌体から酵素を遊離させるために、各種界面活性剤を用いて、抽出効果を検討した。図2-1に方法の概要を示した。2-3の方法で培養したTB-35株の菌体(湿重量にして約1.5 g)を15 mlの20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、これを0.5 mlずつ1.5 ml容のマイクロチューブに分注した。ここに、0.4%の各種界面活性剤溶液(Detergent starter kit II)を0.5 mlずつ添加した(最終界面活性剤濃度は0.2%)。チューブを室温で2時間攪拌後、遠心(12,000 rpm、10分)して得た上清のエステラーゼ活性を測定した。界面活性剤を添加せずに同様に操作した菌体懸濁液のエステラーゼ活性を対照とした。

表 2-1 無機鹽培地組成

| Ingredient | g / l |
|---|---------|
| KH_2PO_4 | 2.0 |
| K_2HPO_4 | 7.0 |
| NH_4NO_3 | 1.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 mg |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.0 mg |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 mg |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10.0 mg |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$ | 2.0 mg |
| | pH 7.0 |

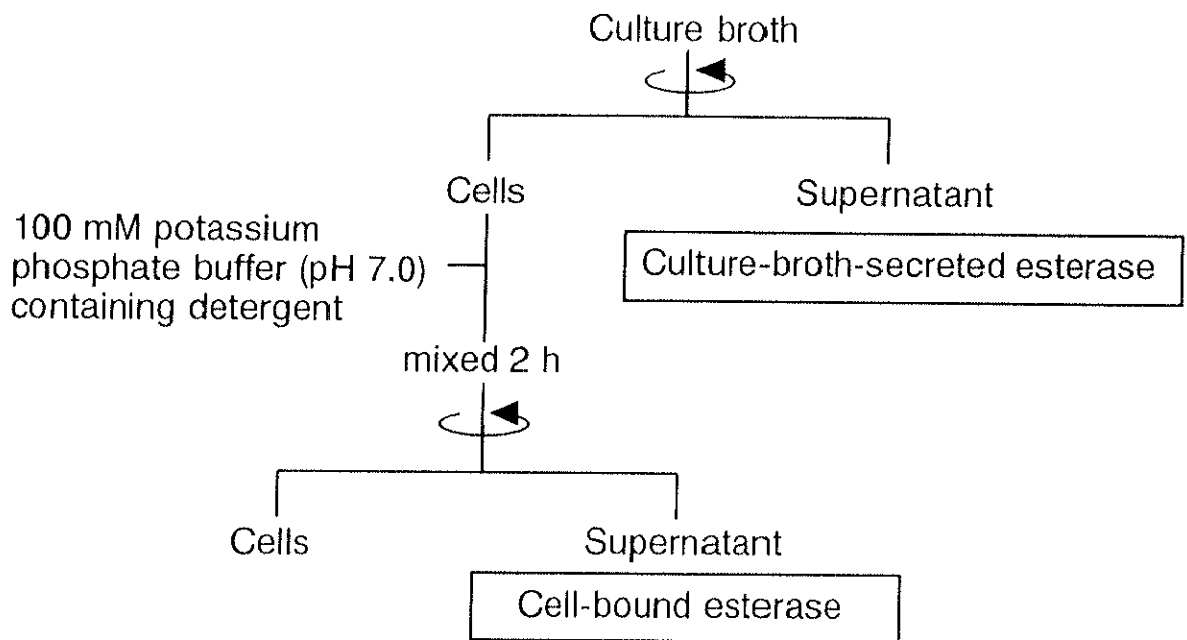


図2-1 培養上清遊離型 (Culture-broth-secreted esterase) 及び菌体付着型エステラーゼ (Cell-bound esterase) の分離

2-5 酵素活性の測定

2-5-1 ポリウレタン分解活性の測定

小試験管に、一定量の酵素を含む100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を0.5 ml入れ、PUR小片 (5×5×1 mm) を加えることで反応を開始した。反応は、30℃で24時間行った。反応終了後PURを取り出し、蒸留水で洗浄、乾燥後、重量を測定した。

2-5-2 エステラーゼ活性の測定

エステラーゼ活性の測定方法は、Kayらの方法(18)に従った。1.6 mlの0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に、0.268 mlの1 mM *p*-nitrophenyl acetateと0.132 mlの酵素溶液を加え、エステル結合の開裂によって遊離した*p*-nitrophenolの量を405 nmの吸光度を測定することによって求めた。1分間に1 μ molの*p*-nitrophenolを生じさせる酵素量を1 unitとした。吸光度の測定には、日本分光社製の分光光度計 (model V-550) を用いた。

第3節 実験結果

3-1 エステラーゼ活性及びポリウレタン分解活性の測定

2%のコール酸ナトリウムによって、菌体の表面に付着した酵素を遊離させることができた。菌体付着画分のエステラーゼ活性は、培養上清画分の約10倍であった。コール酸ナトリウムによって抽出した菌体付着画分と培養上清画分を用いたポリウレタン分解反応の結果を、表2-2に示した。菌体付着型エステラーゼは、PURを分解することができたが、培養上清遊離型のエステラーゼはPURを全く分解しなかった。以後、菌体付着型エステラーゼをPURエステラーゼ、培養上清遊離型エステラーゼをCBS (culture-broth-secreted) エステラーゼと称する。

3-2 菌体からの酵素抽出に用いる界面活性剤の検討

15種類の界面活性剤について検討した結果、表2-3に示したように、N,N-Bis(3-D-

表2-2 菌体付着型エステラーゼと培養上清遊離型エステラーゼのPUR分解活性

| Esterase | Enzyme amount (mU) | PUR degraded (mg) | | |
|--|-----------------------|-------------------|------------|------------|
| | | 12 h | 24 h | 48 h |
| Control | | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| Cell-surface bound (PUR esterase) | 18.8 1.9 | 0.4 0.1 | 0.6 0.2 | 1.3 0.4 |
| Culture-broth-secreted (CBS esterase) | 235.0 23.5 | 0.0 0.1 | 0.1 0.1 | 0.1 0.3 |
| | 2.4 | 0.1 | 0.2 | 0.3 |

表 2-3 酵素抽出に及ぼす界面活性剤の影響

| Detergent | Esterase activity (U / ml) |
|--|-------------------------------|
| Total activity ^a | 5.7 |
| deoxy-BIGCHAP | 6.6 |
| <i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltoside | 5.8 |
| CHAPS ^b | 3.5 |
| CHAPSO ^c | 3.5 |
| Digitonin | 3.3 |
| MEGA-10 ^d | 2.6 |
| Sucrose monolaurate | 2.6 |
| BIGCHAP | 2.1 |
| Sodium cholate | 1.6 |
| <i>n</i> -Octyl- β -D-glucoside | 1.2 |
| <i>n</i> -Heptyl- β -D-thioglucoside | 0.9 |
| <i>n</i> -Octyl- β -D-thioglucoside | 0.9 |
| MEGA-8 ^e | 0.9 |
| MEGA-9 ^f | 0.9 |
| Sucrose monocaprato | 0.9 |
| No detergent | 0.0 |

^a 界面活性剤を添加しない菌体懸濁液の活性

^b 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

^c 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonic acid

^d *n*-Decanoyl-N-methylglucamide

^e *n*-Octanoyl-N-methylglucamide

^f *n*-Nonanoyl-N-methylglucamide

gluconamidopropyl)deoxycholamide (deoxy-BIGCHAP)及び*n*-Dodecyl- β -D-maltosideに高い抽出効果が得られ、菌体表面に付着している酵素の全てが抽出された。両界面活性剤のうち、除去が容易なdeoxy-BIGCHAPを以後の操作に用いることとした。その使用濃度は、最も高い抽出効果を示した0.2%とした。

第4節 考察

TB-35株の培養上清及び菌体に含まれるエステラーゼを調製し、それぞれについてPUR分解活性を測定した。菌体に含まれるエステラーゼは、2%のコール酸ナトリウムで処理することによって遊離したため、菌体の表面に疎水的に付着していると考えられた。しかし、コール酸ナトリウムは除去が困難であるため、より低濃度で効率良く酵素を抽出できる界面活性剤を検索した。その結果、deoxy-BIGCHAPを0.2%の濃度で用いたとき、最も効率よく酵素を抽出することができた。deoxy-BIGCHAPは非イオン性の界面活性剤であるため、今後各種クロマトグラフィーを行う上で操作が容易となる。また、臨界ミセル濃度が約0.4%であるため、酵素抽出液を2倍程度に希釈するだけで、容易にミセルを破壊することができる。そのため、deoxy-BIGCHAPを用いることが最適であると考えた。

界面活性剤によって菌体から抽出した画分（PURエステラーゼ）及び培養上清画分（CBSエステラーゼ）の両方にエステラーゼ活性が認められた。しかし、PURエステラーゼのみがPURを分解可能であり、CBSエステラーゼをPURエステラーゼと同量もしくは10倍量添加しても、PURは分解されなかった。この結果より、TB-35株によるPURの分解はエステラーゼによって行われ、PUR分解酵素の主体はPURエステラーゼであることが示された。また、PURエステラーゼは菌体の表面に付着していることから、疎水性の高い酵素であることが示唆された。