

第3章 菌体付着型エステラーゼの精製及び諸性質

第1節 緒言

第2章において、*Comamonas acidovorans* TB-35株の生産する2種類のエステラーゼ（培養上清に遊離するもの及び菌体表面に付着するもの）のうち、菌体付着型エステラーゼ（PURエステラーゼ）のみがポリウレタン（PUR）を分解可能であることを明らかとした。そこで、PUR分解酵素であるPURエステラーゼを精製し、その諸性質を明らかにすることとした。

第2節 実験材料及び実験方法

2-1 供試菌株及び試薬

供試菌株及び試薬は、第2章に準じた。Poly(3-hydroxybutyrate)及びPoly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)はAldrich社製を、Poly(L-lactic acid)及び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用いた。

2-2 供試ポリウレタン

ポリウレタンの材料及び合成方法は、第2章に準じた。

2-3 培地及び培養条件

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を含む500 ml容三角フラスコ3本に、Nutrient Broth平板培地上で30℃、3日間培養したTB-35株を2白金耳ずつ植菌し、30℃で6日間回転振盪培養を行った（120 oscillations/min）。この培養液を、3 Lの無機塩培地及び30 gのPUR小片を入れた5 L容ジャ

ーフェーマンター (model MD-50, 丸菱バイオエンジニア製) に植菌した。ジャーフェーマンターにおける培養は、通気量; 1.5 L/min、攪拌速度; 500 rpm、温度; 30°Cの条件下で行った。なお、培養液に数滴の消泡剤 (プロナルST1) を添加した。培養は7日間行った。

2-4 酵素活性の測定

2-4-1 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 (2×2×1 mm) を加えることで反応を開始した。反応は30°C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。また、反応液中のジエチレングリコールの量を、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いて定量した。ガスクロマトグラフは島津製作所社製のモデルGC-8A、検出器はFID、カラムはGLサイエンス社製のUnisole 30T (10% Uniport HP 80/100 mesh, 2.6 mm×1.0 m)を用いた。GC分析は、カラム温度190°C、インジェクター及び検出器温度250°Cにて行なった。また、内部標準物質として、1,4-ブタンジオールを使用した。

酵素分解後のPUR表面の形態変化の様子を、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。観察及び写真の撮影は、スズキ株式会社に依頼した。

2-4-2 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、第2章に準じた。

2-5 タンパク質量の測定

各試料のタンパク質量の測定は、ローリー法にて行った(31)。

2-6 酵素の精製

精製は全て室温にて行った。各種カラムクロマトグラフィーは全て高速液体クロマトグラフィーにより行った。

2-6-1 菌体からの酵素抽出

培養後の菌体を、8,000 rpm、15分間の遠心（4℃）にて集菌した。培養は3回に分けて行ない、合計9 Lの培養液から菌体を得た。菌体（湿重量約55 g）に、0.2%の*N,N*-Bis(3-D-gluconamidopropyl)deoxycholamide (deoxy-BIGCHAP)を含む20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）を500 ml加え、マグネチックスターラーを用いて40分間強く攪拌した。次に、これを8,000 rpmで20分間冷却遠心し、沈澱を除去して得た上清を粗酵素液とした。

2-6-2 硫酸アンモニウム沈澱法による粗分画

2-6-1で調製した粗酵素液に、45%飽和となるように細粉化した硫酸アンモニウムを加え、マグネチックスターラーを用いて穏やかに30分間攪拌した。次にこれを8,000 rpmで20分間遠心分離し、沈澱を得た。この沈澱に、45%飽和の硫酸アンモニウムを含む20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）を100 ml加え、懸濁後同様に遠心した。上清を除去して得られた沈澱に、20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）を400 ml加え、沈澱を溶解させた。さらに同様に遠心し、沈澱を除去して得た上清を45%硫酸アンモニウム沈澱画分とした。

2-6-3 疎水性担体への吸着と溶出

2-6-2で調製した45%硫酸アンモニウム沈澱画分に、疎水クロマトグラフィーの担体であるPhenyl-TOYOPEARL 650M（東ソー社製）を100 ml加えた。Phenyl-TOYOPEARL 650Mは、蒸留水で数回洗浄してから用いた。攪拌機を用いて、600 rpm、45分間攪拌後、グラスフィルターを用いて吸引濾過を行い、担体を回収した。回収した担体を、100 mlの緩衝液で4回洗浄した。次に、この担体に0.25%のdeoxy-BIGCHAPを含む20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）を300 ml加え、同様に30分間攪拌した。グラスフィルターを用いて担体を除去し、得られた溶液をdeoxy-BIGCHAP溶出画分とした。

deoxy-BIGCHAP溶出画分は、硫酸アンモニウム沈澱法（50%飽和）にて濃縮した。濃縮した溶液は、Sephadex G-25 Fine（Amersham Pharmacia Biotech社製）カラム（1.0×10

cm) を用いて脱塩した。カラムはあらかじめ0.2% deoxy-BIGCHAPを含む20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にて平衡化した。ここに流速3.0 ml/minで濃縮した酵素液を注入し、脱塩を行った。

2-6-4 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

脱塩したサンプルを、あらかじめ0.2% deoxy-BIGCHAPを含む20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にて平衡化したQ-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech社製) カラム (1.6×10 cm) に供した。流速は3.0 ml/minとし、カラムに吸着せずに素通りした画分を回収した。回収した画分は、硫酸アンモニウム沈殿法 (50%飽和) にて、deoxy-BIGCHAPの除去及び濃縮を行った。得られた酵素標品は、使用するまで-80°Cにて保存した。

2-7 分子量の測定

精製した菌体付着型エステラーゼの分子量を、ゲル濾過クロマトグラフィーにて測定した。Superose 12 (Amersham Pharmacia Biotech社製) カラム (1.0×50 cm) を、0.2M NaCl 及び0.2% deoxy-BIGCHAPを含む20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にて平衡化した後、流速0.6 ml/mlで精製酵素を注入した。なお、標準タンパク質としてBoeringer Mannheim社製のCombithek; Aldolase (158,000), Bovine serum albumin (68,000), Hen egg albumin (45,000), Chymotrypsinogen A (25,000)及びCytochrome c (12,500) を用いた。

また、本酵素のサブユニットの分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により測定した。ポリアクリルアミドゲルは濃度12.5%のものを用い、標準タンパク質としてAmersham社製のPhosphorylase B (97,400), Bovine serum albumin (66,000), Ovalbumin (46,000), Carbonic anhydrase (30,000), Lysozyme (14,300)を用いた。電気泳動は、Laemmliの方法に従った(32)。染色は、和光純薬工業社製の銀染色キットを用い、添付のマニュアルに従う方法で行なった。

2-8 基質特異性の検討

100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に、ジクロロメタンに溶解した各基質を0.5% となるように添加し、超音波破碎機にて乳化させた。乳化後の溶液を80°Cで2時間保温し、ジクロロメタンを除去した。小試験管に乳化させた基質1.0 mlと精製酵素0.1 Uを添加し、30°Cで60分間加温した。反応前の濁度を100%とし、濁度の減少を600 nmの吸光度を測定することによって求めた。基質には、ポリジエチレングリコールアジペート、トリブチリン、トリオレイン、Poly(3-hydroxybutyrate)、Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHV content 14%, M.W. \leq 454,000)及びPoly(L-lactic acid) (M.W. 5,000及び20,000)を用いた。

2-9 N末端アミノ酸配列の決定

精製酵素をSDS-PAGEに供した後、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜 (Clear blot membrane-P, アトー社製) にエレクトロブロットングした。ブロットング装置は、マリソル社製のセミドライブロットング装置を用い、1.0 A/cm²の定電流で90分間通電した。ブロットング終了後、PVDF膜を蒸留水で洗浄し、Coomassie brilliant blue (CBB) 溶液 (0.2% CBB R-250、40% メタノール、10% 酢酸) 中で5分間振盪した。次に、60% メタノール中で振盪、脱色し、蒸留水で洗浄した。風乾後、目的のバンドを切り出し、アミノ酸配列解析装置 (Applied Biosystem社製・model 473A) にてN末端アミノ酸配列を決定した。

第3節 実験結果

3-1 菌体付着型エステラーゼの精製

菌体付着型エステラーゼ (PURエステラーゼ) の精製結果を、表3-1に示した。菌体表面に付着した酵素は、0.2% deoxy-BIGCHAPによって抽出された。Phenyl-TOYOPEARL 650Mへ吸着した酵素は、塩濃度を下げた緩衝液では溶出せず、0.25% deoxy-BIGCHAPにより溶出した。この操作で大部分の夾雑タンパク質が除去され、比活性が増大した。

表 3-1 PURエステラーゼの精製ステップ表

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U / mg)	Purification (Fold)	Yield (%)
Crude enzyme	500	1500	3300	2.2	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	400	600	2640	4.4	2.0	80
Phenyl-TOYOPEARL	300	135	1560	11.6	5.3	47
Q-Sepharose FF	156	46	840	18.3	8.3	25

活性は、*p*-nitrophenyl acetateを基質として測定した。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。

Q-Sepharose FFカラムを素通りした画分をSDS-PAGEに供した結果、単一のバンドとして検出された(図3-1)。本酵素は、比活性18.3 U/mg、収率25%で精製された。

3-2 精製酵素によるポリウレタンの分解

精製酵素を用いて、PUR分解反応を行なった。本酵素の添加2時間後には、PUR表面が白濁する様子が観察された。PUR重量の減少に伴い、PURのポリエステル部位を構成するジエチレングリコールとアジピン酸がガスクロマトグラフィー(GC)により検出された。0.05Uの酵素を用いたとき、ジエチレングリコールの量は経時的に増加した(図3-2)。反応24時間後にPUR重量は1.2 mg減少し、0.5 mgのジエチレングリコールを生じた。生成したジエチレングリコールの量は、PURの減少量から理論的に計算された値とほぼ一致した。

分解24時間後のPUR表面の様子を、走査型電子顕微鏡を用いて観察した(図3-3)。分解が進むにつれ、PUR表面に凹凸が生じ微小な穴が観察された。

3-3 分子量の測定

ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、本酵素の分子量は約62,000 Daであった。これは、SDS-PAGEの結果と一致したことから、本酵素は分子量約62,000 Daの単量体であることが示された。ゲルろ過クロマトグラフィーの際、酵素のカラムへの吸着を防ぐため移動相に0.2% deoxy-BIGCHAPを加えた。0.2% deoxy-BIGCHAPの添加は、標準タンパク質の移動度には影響を与えなかった。

3-4 酵素的性質の検討

3-4-1 酵素活性に及ぼすpHの影響

精製酵素のPUR分解活性に及ぼすpHの影響を検討した。方法は2-4-1に従い、pH4.0から6.0では0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0から8.0では0.1 M リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0から9.0では0.1 M トリス-塩酸緩衝液を用いた。図3-4に示したように、本酵素はpH 6.5付近で、最も高いPUR分解活性を示した。

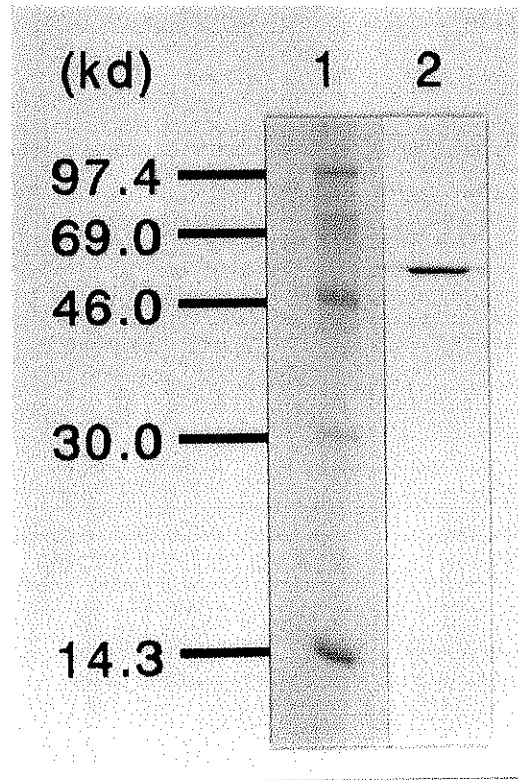


図 3-1 SDS-PAGEの結果

レーン 1: 分子量マーカー
レーン 2: PURエステラーゼ

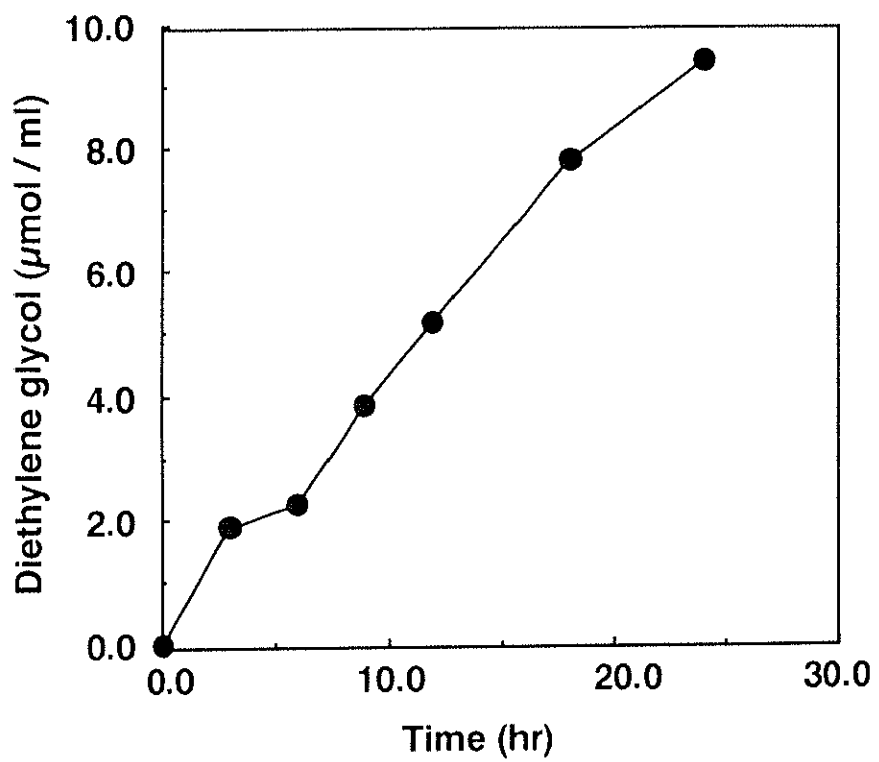


図3-2 PURエステラーゼによるPUR分解反応

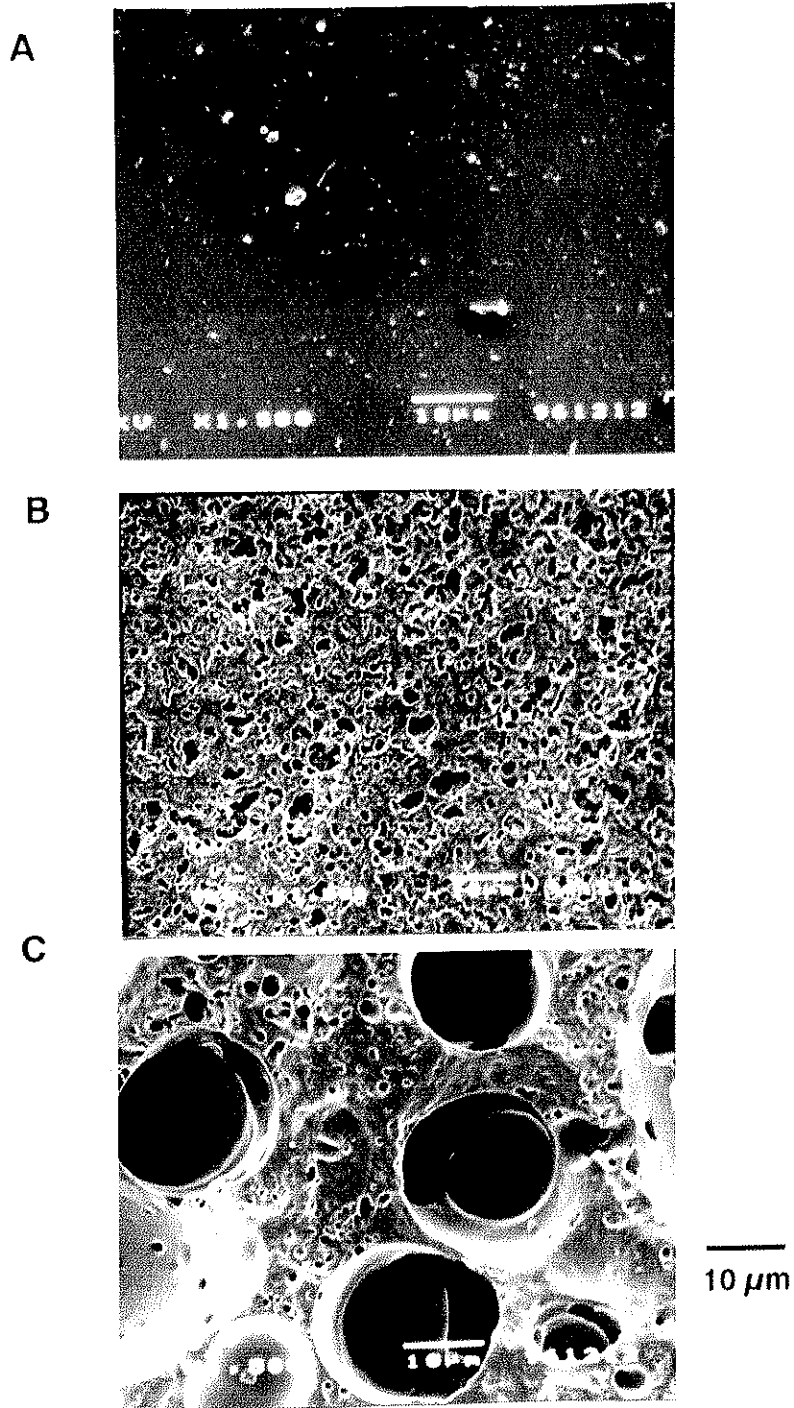


図3-3 酵素分解後のPUR表面の電子顕微鏡写真

2×2×1mmのPURを用い、30℃で24時間分解反応を行った。
 酵素は、A；0 U（コントロール）、B；0.02 U、C；0.2 Uの量を用いた。

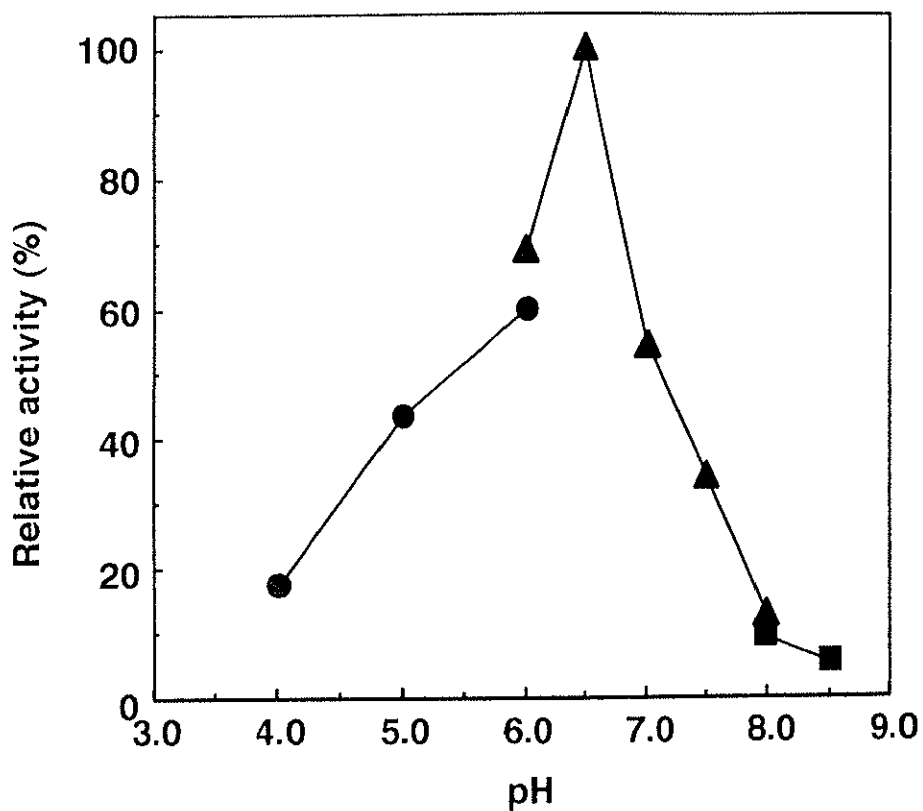


図3-4 PURエステラーゼ活性に及ぼすpHの影響

酵素活性は本文に記した方法で、30°Cで測定した。緩衝液は、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0-6.0) (●)、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0-8.0) (▲)、0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0-9.0) (■)を用いた。最も高い活性を100%とした。

3-4-2 酵素活性に及ぼす温度の影響

反応温度を30℃から55℃まで変化させたときの、PUR分解活性を測定した。図3-5に示したように、本酵素は45℃で最も高いPUR分解活性を示し、45℃以上では急速に活性が低下した。

3-4-3 酵素の安定性に及ぼす温度の影響

精製酵素を各温度の20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中にて30分間加温した後、エステラーゼ活性を測定した。図3-6に示したように、本酵素は55℃まではその活性を維持していたが、60℃では85%が失活し、70℃で完全に失活した。

3-5 基質特異性

精製酵素の基質特異性について検討した結果を表3-2に示した。精製酵素は、PURのポリエステル部位を構成するポリジエチレングリコールアジペート (分子量2,500) を分解し、ジエチレングリコールとアジピン酸を生じた。L-乳酸を構成単位とするポリ乳酸については、低分子量 (分子量5,000) のものでは若干の分解活性がみられたが、高分子量 (分子量20,000) のものは全く分解されなかった。また、同様に脂肪族ポリエステルであるPHB及びP(HB-co-HV)は分解されなかった。トリグリセライドについては、トリブチリンに対して高い分解活性を示したが、トリオレインに対しては分解活性を示さなかった。

3-6 界面活性剤の影響

本酵素のPUR分解活性及び*p*-nitrophenyl acetate分解活性に及ぼす、deoxy-BIGCHAPの影響を検討した。deoxy-BIGCHAPの濃度は、0.0%から2.0%とした。図3-7に示したように、本酵素のPUR分解活性は、0.04%以上のdeoxy-BIGCHAP存在下においてほぼ完全に阻害された。一方、水溶性の基質である*p*-nitrophenyl acetateの分解活性に対しては、deoxy-BIGCHAP添加の影響は認められず一定の活性を示した。

3-7 酵素濃度の影響

一定表面積 (2×2×1 mm) のPURに対して、酵素濃度を変化させたときのPUR分解活

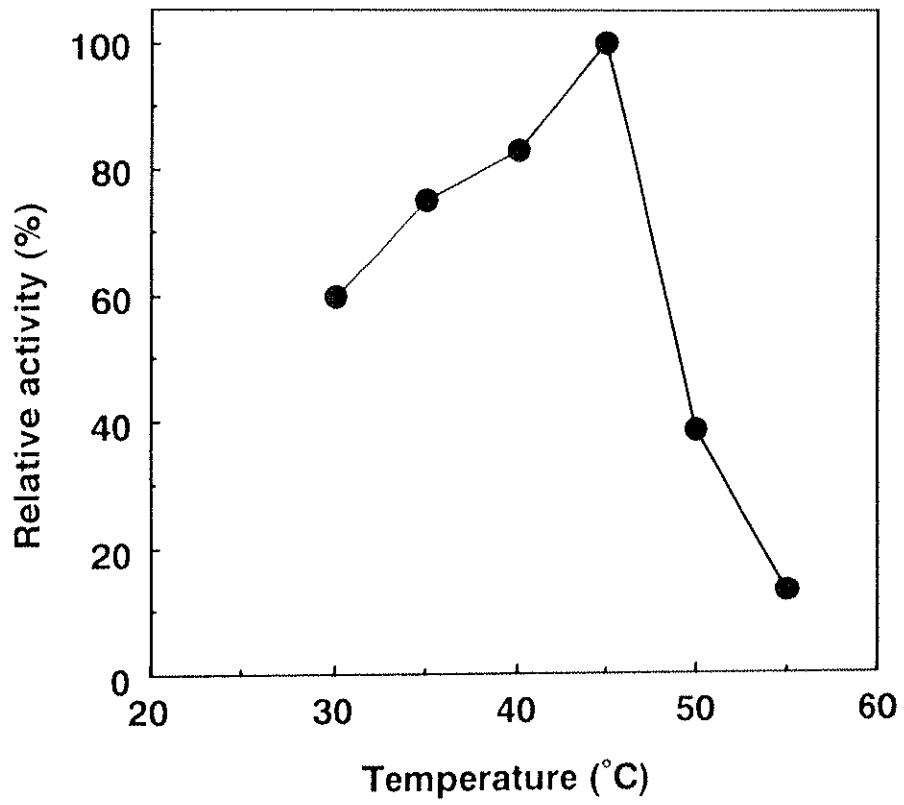


図3-5 PURエステラーゼ活性に及ぼす温度の影響
最も高い活性を100%とした。

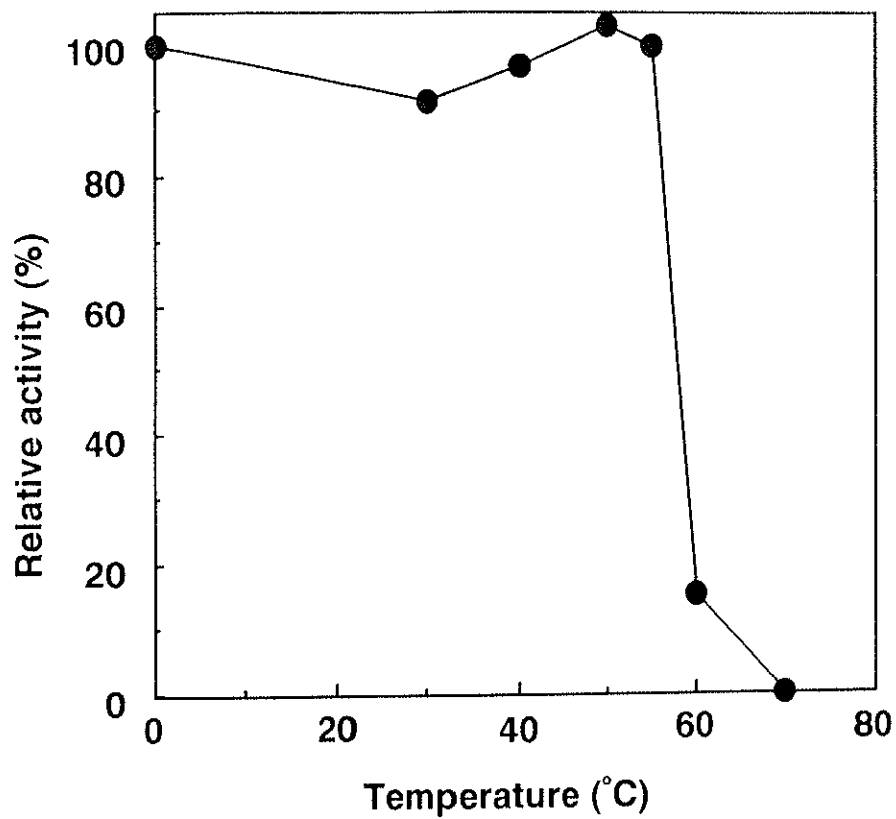


図3-6 PURエステラーゼの安定性に及ぼす温度の影響

酵素を30°Cから70°Cの20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で30分間インキュベートした後、エステラーゼ活性を測定した。氷上で30分間静置した酵素の活性を100%とした。

表3-2 PURエステラーゼの基質特異性

Substrate	Activity (% of degradation)
Poly(diethylene glycol adipate)	36.4
Tributylin	100.0
Triolein	0.0
Poly(3-hydroxybutyrate)	0.0
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	0.0
Poly(L-lactic acid) (M.W. 5,000)	7.7
Poly(L-lactic acid) (M.W. 20,000)	0.0

最も高い活性を100%とした。

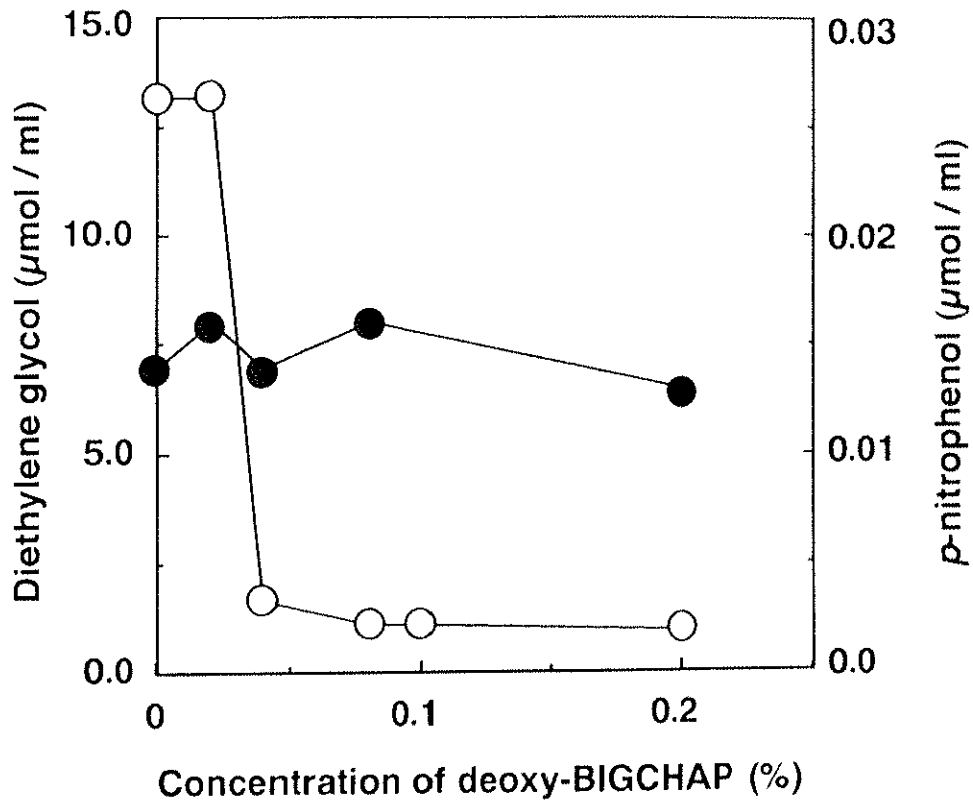


図3-7 PURエステラーゼ活性に及ぼす界面活性剤の影響

基質として、PUR(○)及び*p*-nitrophenyl acetate(●)を用いた。PURの分解によって生じたジエチレングリコールの量及び*p*-nitrophenyl acetateの分解によって生じた*p*-nitrophenolの量を、本文に記した方法で測定した。

性について検討した。図3-8に示したように、本酵素のPUR分解活性は15 μ g/mlまでは酵素量の増加に比例して上昇したが、15 μ g/ml以上では一定となった。PHAデポリメラーゼにおいては、酵素濃度が一定値以上になるとPHA分解活性が低下する現象が報告されている(27)。しかし、本酵素においては分解活性の低下は見られなかった。

3-8 N末端アミノ酸配列の決定

精製酵素のN末端アミノ酸配列を、エドマン分解法にて決定した。本酵素のN末端アミノ酸配列は、Xxx-Gly-Gly-Ser-Asp-Asn-Asp-Ser-Ser-Ser-Asn-Asn-Gln-Gly-Ala-Pro-Ala-Val-Alaであった。1残基目のアミノ酸は決定されなかった。

第4節 考察

TB-35株由来のPURエステラーゼは、最終ステップ以外はカラムクロマトグラフィーを必要としない簡便な方法により精製された。本酵素は室温においても24時間程度であれば失活せず、極めて安定であった。

本実験に用いたPUR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を構成成分のひとつとしている。精製された本酵素により固体PURが分解され、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。このことから、TB-35株によるPUR分解はPURエステラーゼによって行われ、PURのポリエステル部に含まれるエステル結合が切断されていることが明らかとなった。これまでエステル系PUR分解におけるエステラーゼの関与が指摘されていたが、本酵素において初めて完全精製した酵素によるPURの分解が確認された。

本研究以外にも、ポリエステルを分解する酵素が数種類知られている。

Poly(hydroxybutyrate) (PHB)は微生物が合成する天然のポリエステルであり、それを特異的に分解するエステラーゼはPHBデポリメラーゼと呼ばれている。しかし、本酵素はPHB及びPHBとPoly(hydroxyvalerate) (PHV)の共重合体であるP(HB-co-HV)を分解せず、それらと

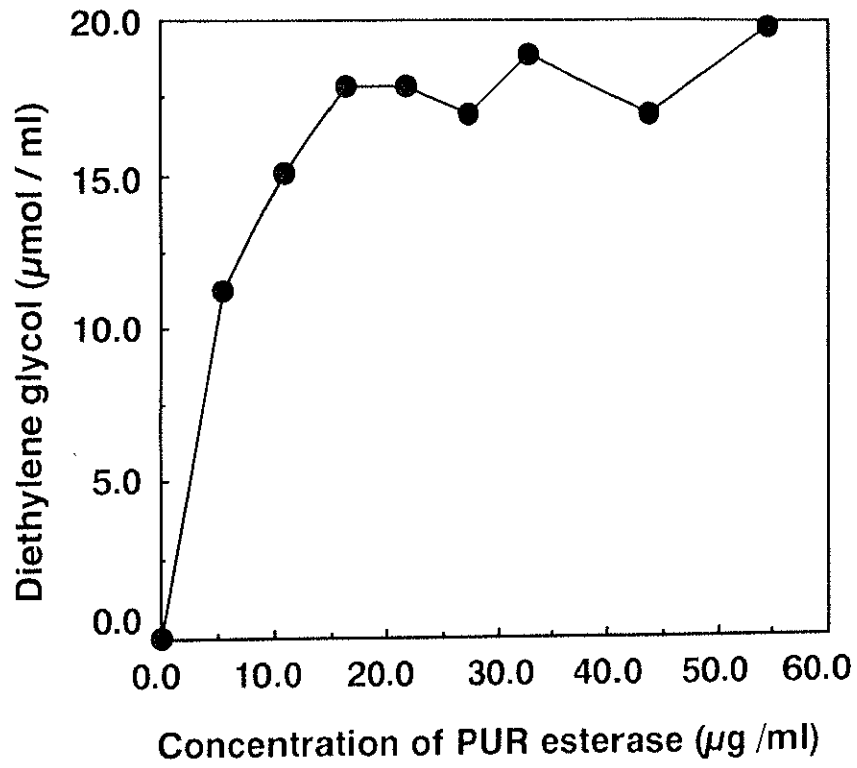


図3-8 PURエステラーゼ活性に及ぼす酵素濃度の影響

は異なる酵素であることが明らかとなった。乳酸を基本単位とするポリエステルであるポリ乳酸については、ごくわずかな分解活性を示すのみであった。また、本酵素は炭素数3の短鎖脂肪酸を構成脂肪酸とするトリブチリンを分解することができたが、炭素数8の長鎖脂肪酸を構成脂肪酸とするトリオレインは分解しなかった。すなわち、本酵素はエステラーゼの一種であるがリパーゼではないことが示された。

本研究で用いたPURは水及び有機溶媒に不溶性である。このような不溶性基質を分解する酵素には活性部位の他に基質付着部位が存在し、その基質付着部位を介して基質に疎水的に付着すると考えられている。本酵素はゲルろ過クロマトグラフィーの担体に吸着するなど、高い疎水性を有することが示された。また、本酵素のPUR分解活性は0.04%のdeoxy-BIGCHAPを添加することにより阻害された。一方、水溶性基質である*p*-nitrophenylacetateに対してはdeoxy-BIGCHAPによる阻害は認められず、本酵素のエステラーゼ活性は界面活性剤の影響を受けないことが示された。これらの結果より、本酵素はPUR表面に疎水的に付着し、その付着がPUR分解における重要なステップのひとつとなっていることが示唆された。また、界面活性剤は本酵素のエステラーゼ活性には影響を及ぼさなかったことから、酵素がPURに付着する部位と加水分解を触媒する部位は互いに独立して機能していると考えられた。

基質への付着と加水分解の機構は、PHBデポリメラーゼにおいて詳細に研究されている。Mukaiらは、PHBデポリメラーゼによるPHBの分解機構モデルを提唱した(図3-9-A)(27)。それによると、まず酵素のC末端に位置する基質付着部位が基質へ付着し、それに引き続いて活性部位が基質へアタックする。この2段階反応モデルに基づくと、過剰の酵素存在下ではPHB分解が阻害されるという現象が説明できる。すなわち、過剰の酵素存在下では、基質表面を基質付着部位が覆ってしまう結果、活性部位が作用できなくなる。PHB付着部位を欠損したPHBデポリメラーゼは、エステラーゼ活性を有するがPHBに付着できなくなるという報告もなされており(25)、基質付着部位がPHB分解に必須であることが裏付けられている。

PURエステラーゼは、PHBデポリメラーゼと同様に固体基質を分解する酵素であるが、本酵素のPUR分解反応は過剰の酵素存在下では一定の活性を示し、PHBデポリメラーゼの

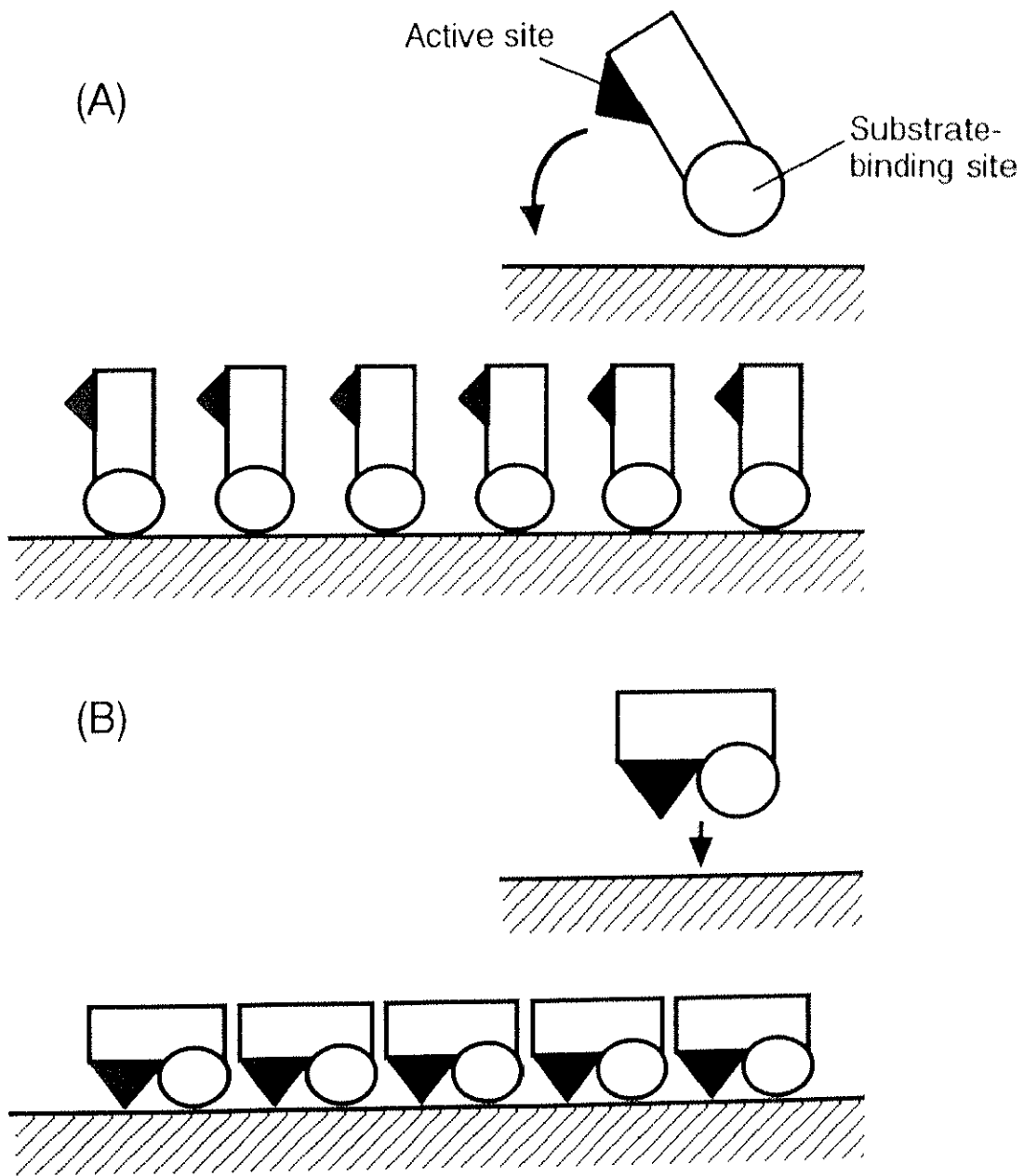


図 3-9 PHBデポリメラーゼ及びPURエステラーゼの分解機構モデル
 (A); PHBデポリメラーゼ (27), (B); PURエステラーゼ
 下段は酵素が過剰に存在したときの様子

ような活性低下は認められなかった。これらの知見に基づき、本酵素の推定構造を図3-9-Bに示した。本酵素では活性部位と基質付着部位が立体的に近接しているため、付着と加水分解が同時に起こる。酵素が基質表面積に対して過剰に存在しても活性部位は作用できるため、基質表面が酵素によって飽和された後は酵素活性は一定となると考えられた。

本酵素は、菌体表面に付着していながら同時にPURを分解することができる。本酵素にはPURに特異的な基質付着部位の他にも、菌体表面に付着する部位が存在することも考えられた。