

## 第4章 培養上清遊離型エステラーゼの精製及び諸性質

### 第1節 緒言

*Comamonas acidovorans* TB-35株は、培養上清遊離型（CBSエステラーゼ）と菌体付着型（PURエステラーゼ）の2種類のエステラーゼを分泌する。第3章において、PUR分解活性を有するPURエステラーゼの精製及び諸性質について述べた。そこで本章では、CBSエステラーゼを精製しその諸性質について検討した。また、PURエステラーゼとの比較を行い、PUR分解と両酵素の関係について考察した。

### 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。V8-protease (*Staphylococcus aureus*由来)は、和光純薬工業社製を用いた。

#### 2-2 培地及び培養条件

培地及び培養条件は、第3章に準じた。TB-35株の培養上清を、酵素の精製に用いた。

#### 2-3 酵素活性の測定

第3章に準じた。

#### 2-4 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。

#### 2-4-1 硫酸アンモニウム沈殿法による粗分画

PURを唯一炭素源として培養したTB-35株の培養上清27 Lに、40%飽和となるように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30分間穏やかに攪拌した。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40%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800 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40%硫酸アンモニウム沈澱画分とした。

#### 2-4-2 疎水カラムクロマトグラフィー

40%硫酸アンモニウム沈澱画分を、0.5 M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) で平衡化したPhenyl-TOYOPEARL 650M (東ソー社製) カラム (1.6×10 cm) に供した。流速は5 ml/minとした。その後、0.5-0.0 M/30 minの硫酸アンモニウム濃度勾配にて溶出を行った。流速は3 ml/minとした。エステラーゼ活性画分を回収し、硫酸アンモニウム沈澱法により濃縮を行った。

#### 2-4-3 ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

疎水カラムクロマトグラフィーで溶出した活性画分を、0.2 M NaClを含む20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したSuperose 12 (Amersham Pharmacia Biotech社製) カラム (1.6×30 cm) に供した。流速は0.6 ml/minとした。活性画分を回収し、限外濾過 (YM10, Millipore社製) にて濃縮を行った。得られた酵素標品は、使用するまで-80℃にて保存した。

#### 2-5 分子量の測定

第3章で述べた方法に準じた。

## 2-6 N末端アミノ酸配列の決定

第3章で述べた方法に準じた。

## 2-7 プロテアーゼによる限定分解

Clevelandらの方法(33)に従い、精製酵素の限定分解を行った。精製酵素をSDS-PAGEに供し、Coomassie brilliant blue (CBB) R-250で染色した。染色後、バンドを切り取り約5.0 mlのTris-SDS緩衝液 (125 mM Tris-HCl [pH 6.8], 0.1% SDS) に浸して30分間振盪した。これを20%ポリアクリルアミドゲルの試料溝に入れ、0.1、0.5、1.0  $\mu\text{g}$ の*Staphylococcus aureus*由来V8-proteaseを溶解した5%グリセロールを含むTris-SDS緩衝液を10  $\mu\text{l}$ ずつ重層した。20 mA定電流で電気泳動を開始し、色素が濃縮ゲルの下端に近づいたところで泳動を停止し、30°Cにて1時間、ゲル中で試料タンパク質のプロテアーゼ限定分解を行った。その後泳動を再開し、以後は通常のSDS-PAGEと同様の操作を行った。

## 2-8 酵素の疎水性の測定

Mukaiらの方法(27)に従い、酵素の疎水性を測定した。0.15 mlのエタノール及び0.5 mlのPhenyl-TOYOPEARL 650M (東ソー社製) を含む20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 1.0 mlに20  $\mu\text{g}$ の精製酵素を添加し、室温で5分間攪拌した。その後、遠心し上清及び担体に含まれるタンパク質量を測定した。酵素の疎水性は、上清に遊離した酵素量に対するPhenyl-TOYOPEARLに吸着した酵素量の比で表した。

## 第3節 実験結果

### 3-1 酵素の精製

CBSエステラーゼの精製結果を表4-1に示した。Phenyl-TOYOPEARL 650Mカラムクロマトグラフィーの結果はPURエステラーゼとは異なり、緩衝液中の硫酸アンモニウム濃度を低下させることにより活性画分が溶出した。ゲル濾過クロマトグラフィーにより得られた

表4-1 CBS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 (%)
Culture supernatant	27000	25110.0	729.0	0.03	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	799	1887.0	79.8	0.04	1.3	11
Phenyl-TOYOPEARL 650M	222	178.0	31.1	0.17	5.7	4
Superose 12	74	4.7	16.2	3.45	115.0	2

活性は、*p*-nitrophenyl acetateを基質として測定した。1分間に1  $\mu$  molの*p*-nitrophenolを生じさせる酵素量を1 unitとした。

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4-1)。本酵素は、比活性3.45 U/mg、収率2%で精製された。

### 3-2 分子量の測定

精製したCBSエステラーゼの分子量をゲル濾過クロマトグラフィーを用いて測定したところ、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62,000 Daの単量体であることが示された。また、本酵素のSDS-PAGE及びゲル濾過クロマトグラフィーにおける移動度は、PURエステラーゼと一致した。

### 3-3 酵素的性質の検討

PURエステラーゼと同様に、精製したCBSエステラーゼの至適反応条件を決定した。基質として*p*-nitrophenyl acetateを用いた。その結果、至適pHは6.5、至適温度は45°Cであった。また、30分間の加熱後の残存活性を測定したところ、55°Cまでは安定であったが60°Cでは約85%の酵素が失活した。

### 3-4 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 (Xxx; not determined)であり、PURエステラーゼのN末端アミノ酸配列と完全に一致した(第3章)。

### 3-5 基質特異性

精製酵素を用いて、PUR及びポリジエチレングリコールアジペートの分解を行った結果を図4-2に示した。CBSエステラーゼは、PURエステラーゼと同様にポリジエチレングリコールアジペートを分解しジエチレングリコールを生じた。しかし、100 mUの酵素を添加してもPURは全く分解されず、分解産物であるジエチレングリコールは検出されなかつ

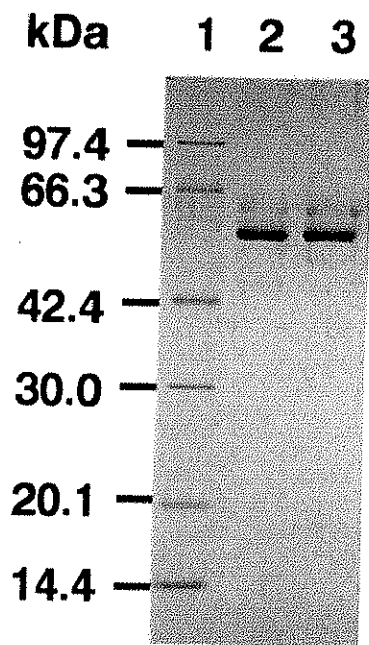


図4-1 CBSエステラーゼのSDS-PAGE

レーン1 ; 分子量マーカー  
レーン2 ; CBSエステラーゼ  
レーン3 ; PURエステラーゼ

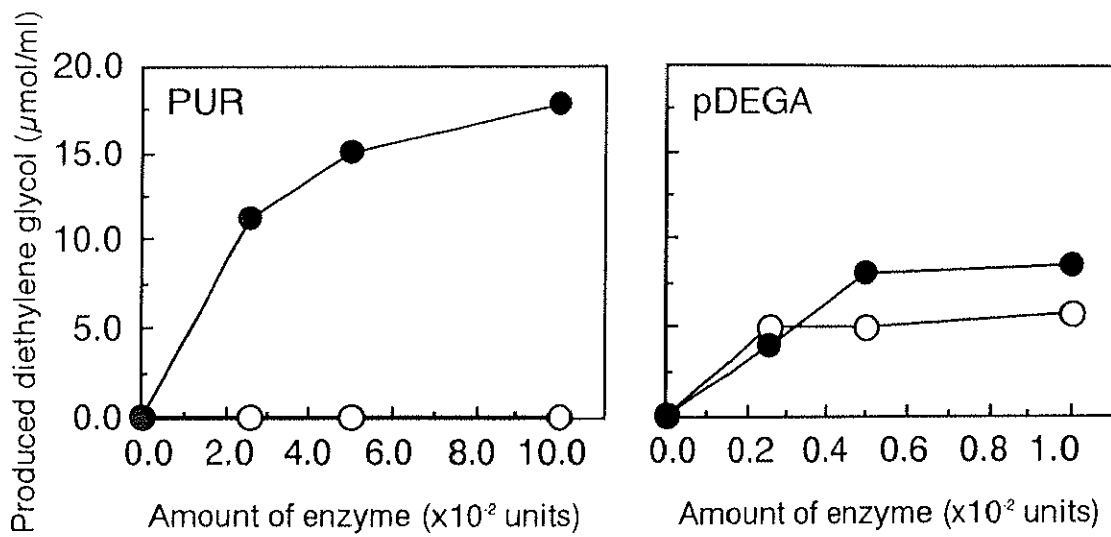


図4-2 PURエステラーゼ(●)及びCBSエステラーゼ(○)による  
 ポリウレタン(PUR)及びポリジエチレングリコールアジペート  
 (pDEGA)の分解

た。

### 3-6 プロテアーゼによる限定分解

精製したCBSエステラーゼ及びPURエステラーゼを、プロテアーゼを用いて限定分解した結果を図4-3に示した。両酵素は、V8-proteaseによって6本のポリペプチドに切断され、そのパターンは両酵素で完全に一致した。また、限定分解の結果生じた約25 kDaの断片（図中に図示）について、N末端アミノ酸配列を決定した。決定された配列は、Ala-Gln-Ser-Thr-Ser-Ile-Val-Asn-Ser-Ala-Leu-Alaであり両酵素とも同一の配列であった。

### 3-7 酵素の疎水性

CBSエステラーゼ及びPURエステラーゼの疎水性度を測定した結果を、表4-2に示した。15%エタノールを含む緩衝液中でPhenyl-TOYOPEARLへ吸着した酵素量は、PURエステラーゼでは85%であったが、CBSエステラーゼでは60%であった。PURエステラーゼの疎水性は、CBSエステラーゼの約4.4倍であった。

## 第4節 考察

TB-35株が培養上清に分泌するエステラーゼ（CBSエステラーゼ）の精製を行った。本酵素は、Phenyl-TOYOPEARL 650Mカラムに吸着したが、PURエステラーゼとは異なり緩衝液中の硫酸アンモニウム濃度を0.5から0.0 Mへ低下させることによって溶出した。このことより、CBSエステラーゼはPURエステラーゼと比較すると疎水性が低いことが示唆された。その後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行うことによって比活性が増大し、SDS-PAGEで単一のバンドを示すまで精製された。

図4-1に示したように、SDS-PAGEにおいてCBSエステラーゼとPURエステラーゼは全く同一の移動度を示した。表4-3に両酵素の性質を比較した結果をまとめた。両酵素間において、分子量、反応の至適条件（pH、温度）、温度安定性が一致した。さらに、そのN末



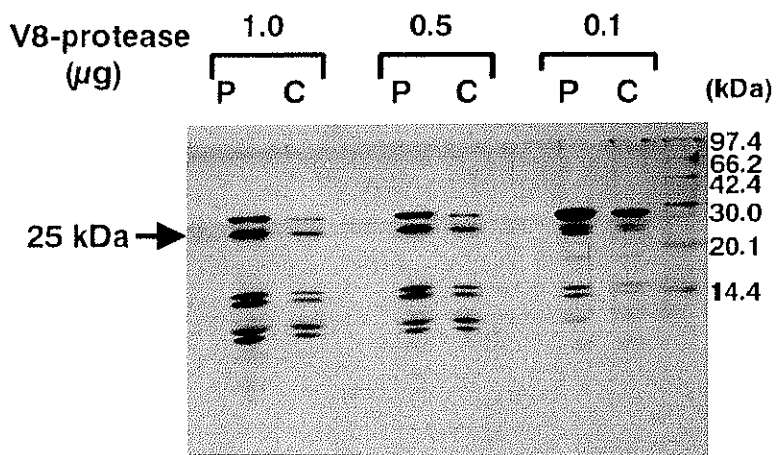


図4-3 プロテアーゼによるCBSエステラーゼ及びPURエステラーゼの限定分解  
 P : PURエステラーゼ  
 C : CBSエステラーゼ

表4-2 PURエステラーゼ及びCBSエステラーゼの疎水性

	Enzyme ( $\mu\text{g}$ of protein)		Hydrophobicity <sup>a</sup>
	TOYOPEARL -bound	Supernatant	
PUR esterase	17.1	2.9	5.9
CBS esterase	12.0	8.0	1.5

<sup>a</sup> 疎水性 (Hydrophobicity) は酵素の疎水性は、上清に遊離した酵素量に対するPhenyl-TOYOPEARLゲルに吸着した酵素量の比で表した。

表4-3 CBSエステラーゼとPURエステラーゼの性質の比較

	CBS esterase	PUR esterase
Molecular mass	62,000 (monomer)	62,000 (monomer)
N-terminal amino acid	XGGSDNDSSS- NNQGAPAVA <sup>a</sup>	XGGSDNDSSS- NNQGAPAVA <sup>a</sup>
Thermostability <sup>b</sup>	≤55°C	≤55°C
Relative activity	3.5 U/mg	18.3 U/mg
Substrate specificity		
<i>p</i> -nitrophenyl acetate	+	+
poly(diethylene glycol adipate)	+	+
PUR	-	+
Hydrophobicity index	1.5	5.9

<sup>a</sup> X; 未決定。

<sup>b</sup> 0-70°Cで30分間加熱した後の残存活性。

端アミノ酸配列、及び限定分解によって得られた25 kDa断片のN末端アミノ酸配列が完全に一致した。これらの結果より、CBSエステラーゼとPURエステラーゼは同一のポリペプチドである可能性が示唆された。しかし、両酵素はその基質特異性に大きな差異が認められた。すなわち、PURエステラーゼがPURとポリジエチレングリコールアジペートを分解可能であるのに対し、CBSエステラーゼはポリジエチレングリコールアジペートのみを分解し、PURを分解しなかった（図4-2）。PURの分解量が酵素量の増加に伴っているのに対し、ポリジエチレングリコールアジペートの分解量がほぼ一定となったが、これは基質に対して酵素が飽和したためであると考えられた。PURエステラーゼは、PURに含まれる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明らかとなっている。しかしPURエステラーゼと同一のポリペプチドであるCBSエステラーゼが、ポリジエチレングリコールアジペートを分解可能であるにもかかわらず、それが重合したPURを分解できないのは何故であろうか。

第3章において、PURエステラーゼがPURを分解するためには酵素がPUR表面へ疎水的に付着する過程が必要であり、本酵素には疎水性の高いPUR付着部位が存在することが示唆された。CBSエステラーゼとPURエステラーゼは、そのPUR分解活性以外に、酵素の疎水性に大きな違いが見られる（表4-3）。これらの結果より、CBSエステラーゼの疎水性の低下は、本来は酵素分子の外側に位置しているPUR付着部位付近の構造が変化した結果であると推察できる。そのため、PUR付着能が低下し、エステラーゼ活性は有しているもののPURを分解できなくなったと考えられた。ポリジエチレングリコールアジペートは粘性のある液状であり、PURと比較すると疎水性が低いいため、基質付着部位が機能していないCBSエステラーゼにも分解が容易であったと考えられた。