

第6章 組換型ポリウレタン分解酵素の精製及び諸性質

第1節 緒言

Comamonas acidovorans TB-35株は、ポリウレタン分解活性の異なる2種類のエステラーゼ（PURエステラーゼ及びCBSエステラーゼ）を分泌する。第3章及び第4章にて、これらの2種類の酵素について精製、諸性質の検討を行った結果、両酵素は同一のポリペプチドであることが示唆された。この2種類のエステラーゼの関係をより詳細に明らかにするため、PUR分解酵素遺伝子（*pudA*）の発現産物を精製し、その諸性質を検討することとした。

第2節 実験材料及び実験方法

2-1 供試菌株及び試薬

供試菌株として、*pudA*をコードするプラスミドpUR22を有する*E. coli* JM109（pUR22/*E. coli* JM109）を用いた。試薬は、第3章に準じた。

2-2 培地及び培養条件

形質転換体の培養に用いる培地は、第5章に準じた。

100 μ g/mlのアンピシリン及び2%のグルコースを含むLB培地2 mlを小試験管に入れ、20%グリセロールを含む生理食塩水中で凍結保存（-80°C）されたpUR22/*E. coli* JM109を1白金耳植菌し、37°Cで1晩往復振盪培養を行った（120 oscillations/min）。この培養液を、同LB培地を100 ml加えた500 ml容培養フラスコに植菌し、37°Cで3時間往復振盪培養を行った。この前培養液を、100 μ g/mlのアンピシリンを含む3 LのLB培地を入れた5 L容

ジャーファーマンター (model MD-50, 丸菱バイオエンジニアリング社製) に植菌した。ジャーファーマンターにおける培養条件は、第3章に準じた。ただし、培養は34°Cで6.5時間行った。

2-3 酵素活性の測定

エステラーゼ活性、PUR分解活性及びポリジエチレングリコールアジペート分解活性の測定法は、第3章に準じた。

2-4 酵素の精製

精製操作はすべて室温にて行った。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 粗酵素液の調製

pUR22/*E. coli* JM109の培養液を、8,000 rpmで15分間遠心分離し、得られた菌体のうち約15 g (湿重量) を33 mlの20 mMリン酸カリウムバッファー (pH 7.0) に懸濁した。菌体懸濁液をフレンチプレス (大岳製作所社製) にて2回破碎し、15,000 rpm、20分間遠心して得た上清を粗酵素液とした。

2-4-2 硫酸アンモニウムによる粗分画

粗酵素液に、40%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30分間攪拌した。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) を加え、沈澱を溶解させた。さらに同様に遠心し、生じた沈澱を除去した上清を40%硫酸アンモニウム沈澱画分とした。

2-4-3 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、あらかじめ1 M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) にて平衡化したPhenyl-TOYOPEARL 650M (東ソー社製) カラム (1.6×10 cm) に供した。その後、0.5-0.0 M/60 minの硫酸アンモニウム濃度勾配で溶出を行った。流速は1.5 ml/minとした。溶出液を3 mlごとにフラクションコレクターにて分取し、活性画分を限外濾過 (YM10, Millipore社製) にて濃縮した。これをエステラーゼ(I)とした。

次に、0.2% deoxy-BIGCHAPを含む同緩衝液にて、流速1.5 ml/minで溶出を行った。溶出した活性画分を回収し、限外濾過 (YM10, Millipore社製) にて濃縮した。これをエステラーゼ(II)とした。

2-4-4 エステラーゼ(I)の精製

0.2M NaClを含む同緩衝液で平衡化したSuperose 12 (Pharmacia社製) カラム (1.6×50 cm) に、流速0.5 ml/minでエステラーゼ(I)を注入した。1 mlごとにフラクションコレクターにて分取し、活性画分を回収した。これを限外濾過にて脱塩及び濃縮した後、20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したQ-Sepharose FF (Pharmacia社製) カラム (1.6×10 cm) に供した。流速は1.5 ml/minとし、カラムを素通りした画分を回収した。回収した画分は、限外濾過により濃縮を行った。酵素は、使用前まで-80℃で保存した。

2-4-5 エステラーゼ(II)の精製

2-5-3で得たエステラーゼ(II)画分を、20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したQ-Sepharose FF (Pharmacia社製) カラム (1.6×10 cm) に供した。流速は1.5 ml/minとし、カラムを素通りした画分を回収した。回収した画分は、限外濾過により濃縮を行った。酵素は、使用前まで-80℃で保存した。

2-5 分子量の測定

精製した2種類の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。電気泳動の操作、使用した標準タンパク質、染色方法等は全て第 3 章に準じた。

2-6 N末端アミノ酸配列の決定

第 3 章に準じた。

2-7 プロテアーゼによる限定分解

精製した 2 種類のエステラーゼを、V8-プロテアーゼを用いて限定分解を行った。方法は第 4 章に準じた。

2-8 酵素の疎水性の測定

酵素の疎水性の測定法は、第 4 章に準じた。

第 3 節 実験結果

3-1 酵素の精製

pudA を発現した *E. coli* の菌体破砕液を Phenyl-TOYOPEARL 650M 疎水クロマトグラフィーに供した結果、0.5-0.0 M 硫酸アンモニウム緩衝液で溶出した画分、及び 0.2% dcoxy-BIGCHAP を含む緩衝液で溶出した画分にエステラーゼ活性が検出された。前者と後者の全活性の比は約 1 : 10 であった。さらにそれぞれを精製し、エステラーゼ(I)とエステラーゼ(II)を得た。エステラーゼ(I)とエステラーゼ(II)の比活性は、それぞれ 7.5 U/mg、22.3 U/mg であった。

3-2 SDS-PAGE

精製した両エステラーゼを SDS-PAGE に供した結果、分子量約 62,000 Da の位置に単一のバンドが検出された (図 6-1)。組換え型のエステラーゼ(I)、(II) 及び TB-35 株由来の 2 種類

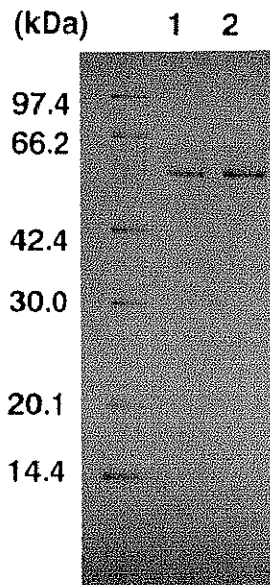


図6-1 エステラーゼ(I)及びエステラーゼ(II)のSDS-PAGE

レーン1 ; エステラーゼ(I)

レーン2 ; エステラーゼ(II)

のエステラーゼの移動度は完全に一致した。

3-3 基質特異性

精製したエステラーゼ(I)とエステラーゼ(II)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6-2に示した。エステラーゼ(II)はPUR及びポリジエチレングリコールアジペートを分解した。図6-3に分解されたPURを走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した結果を示した。TB-35株由来の菌体付着型エステラーゼによる分解と同様に、PUR表面に微細な穴が生じ分解されていく様子が観察された。一方、エステラーゼ(I)はエステラーゼ(II)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たが、PURは分解しなかった。

3-4 プロテアーゼによる限定分解

精製したエステラーゼ(II)及びTB-35株由来のPURエステラーゼを、プロテアーゼによって限定分解した結果を図6-4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た。両酵素の分解パターンは完全に一致した。また、エステラーゼ(II)の限定分解の結果生じた約25 kDaの断片(図6-4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であった。この配列は、PudAの241から252番目のアミノ酸配列(第5章)に相当した。

3-5 酵素の疎水性

エステラーゼ(I)とエステラーゼ(II)の疎水性度を測定した結果を、表6-1に示した。エステラーゼ(II)の疎水性度は、エステラーゼ(I)の約3.7倍であり、TB-35株由来の2種類のエステラーゼが示した値とほぼ同等であった。

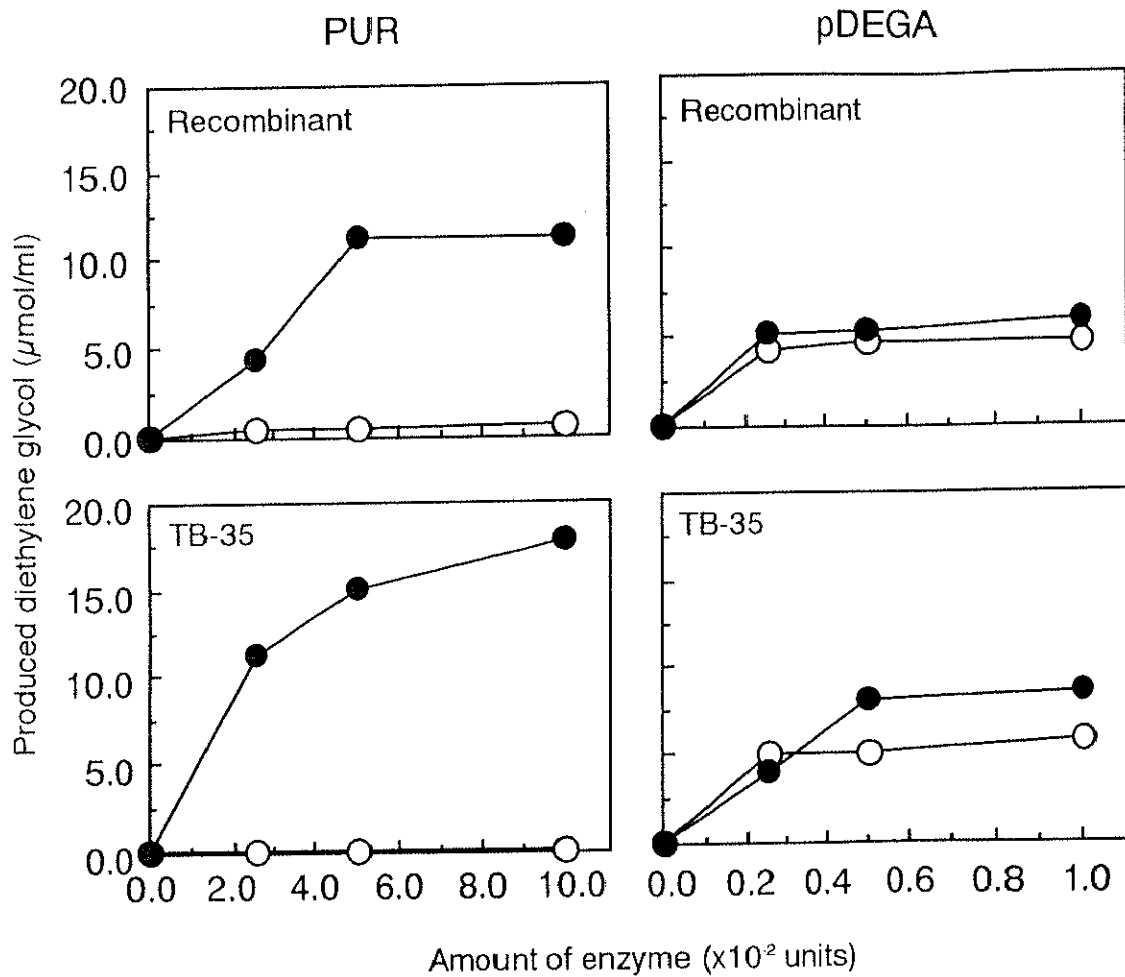


図6-2 組換え体及びTB-35株由来エステラーゼによるPUR及びポリジエチレングリコールアジペートの分解

左図；PURを基質とした。上段；組換え体のエステラーゼ(I) (○)、エステラーゼ(II) (●)。下段；TB-35株由来のCBSエステラーゼ (○)、PURエステラーゼ (●)。

右図；ポリジエチレングリコールアジペート (pDEGA) を基質とした。上段；組換え体のエステラーゼ(I) (○)、エステラーゼ(II) (●)。下段；TB-35株由来のCBSエステラーゼ (○)、PURエステラーゼ (●)。

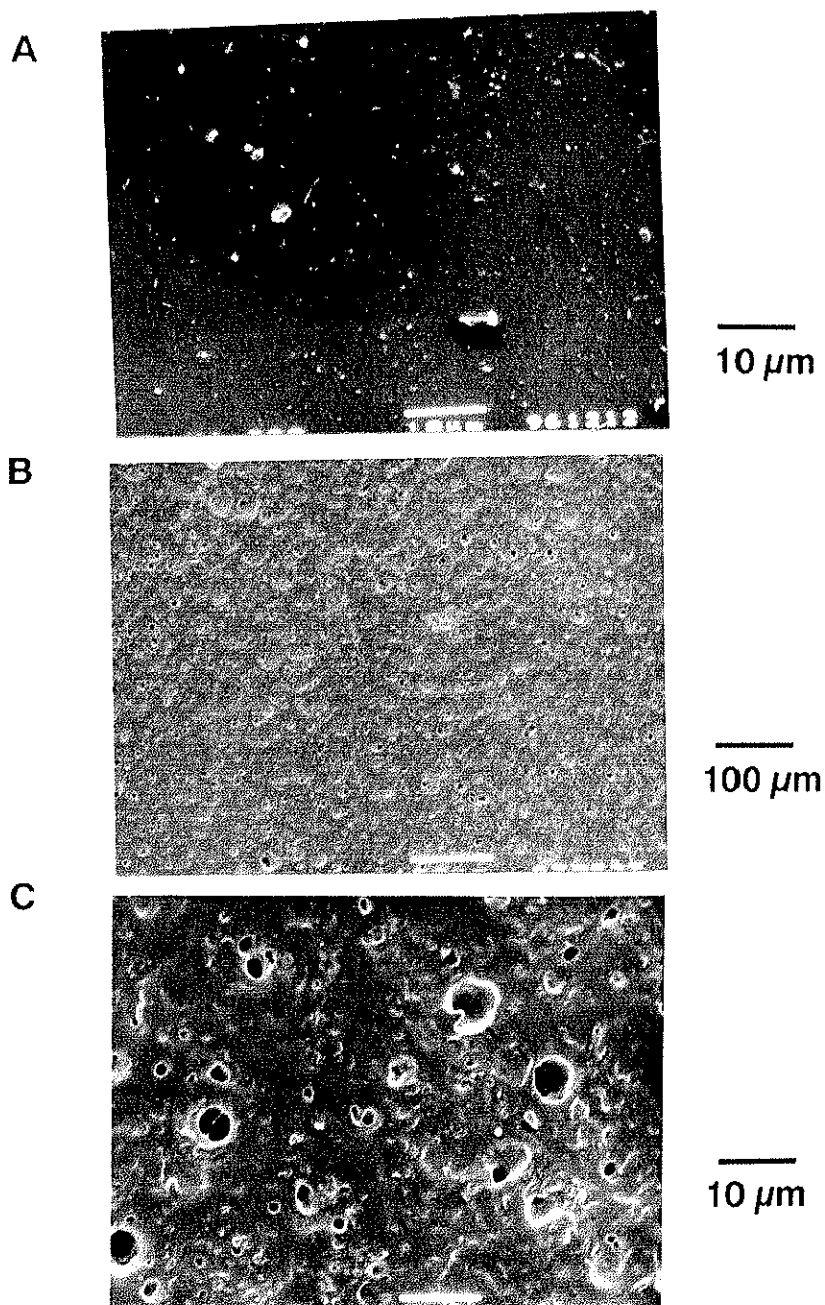


図6-3 酵素分解後のPUR表面の電子顕微鏡写真

2×2×1mmのPURを用い、30℃で24時間分解反応を行った。
酵素量は、A ; 0 U、B, C ; 0.05 Uとした。

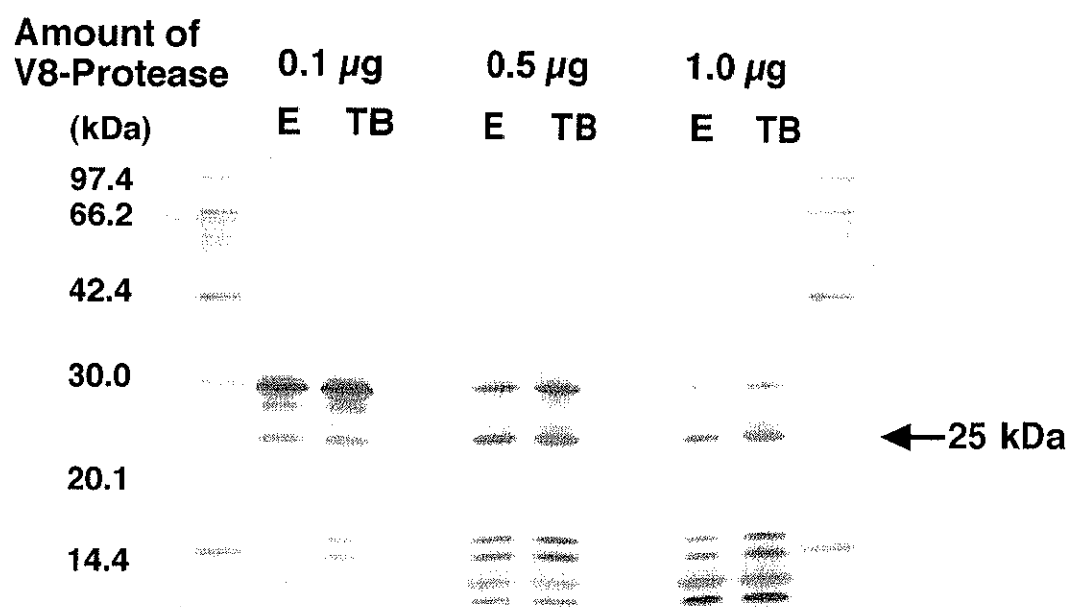


図6-4 プロテアーゼによるエステラーゼ(I)及びPURエステラーゼの限定分解

E : 組換体由来のエステラーゼ(II)
 TB : TB-35株由来のPURエステラーゼ

表6-1 TB-35株由来エステラーゼ及び組換え型エステラーゼの疎水性

	Enzyme (μg of protein)		Hydrophobicity
	TOYOPEARL -bound	Supernatant	
TB-35			
CBS esterase	12.0	8.0	1.5
PUR esterase	17.1	2.9	5.9
Recombinant			
esterase I	10.0	10.0	1.0
esterase II	15.7	4.3	3.7

第4節 考察

TB-35株由来のポリウレタン (PUR) 分解酵素 (PURエステラーゼ) を発現した *E. coli* の菌体破砕液より、2種類のエステラーゼ (エステラーゼ(I)、エステラーゼ(II)) が精製された。両エステラーゼをSDS-PAGEに供したところ、分子量62,000 Daの位置に単一のバンドが見られた。シグナルペプチドの切断部位が不確定であったため、発現産物のN末端アミノ酸配列を決定することはできなかったが、エステラーゼ(II)についてはポリペプチド内部のアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列は、PudAの241から252番目のアミノ酸配列に相当し、またTB-35株由来のPURエステラーゼ内部のアミノ酸配列とも完全に一致した。PURエステラーゼ遺伝子 (*pudA*) を持たない *E. coli* においては、エステラーゼ活性は全く検出されなかったことから、エステラーゼ(I)とエステラーゼ(II)はいずれも *pudA* の発現産物であることが示された。

エステラーゼ(I)とエステラーゼ(II)のPUR及びポリジエチレングリコールアジペートに対する基質特異性を検討した結果、エステラーゼ(II)は両基質を分解するが、エステラーゼ(I)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。この基質特異性より、エステラーゼ(I)はTB-35株由来のCBSエステラーゼに、エステラーゼ(II)は同じくPURエステラーゼに相当すると考えられた。エステラーゼ(I)とエステラーゼ(II)の発現比率や疎水性度の差も、TB-35株由来のCBSエステラーゼとPURエステラーゼの関係に類似していた。

第4章において、TB-35株由来のCBSエステラーゼとPURエステラーゼの関係について述べ、その酵素学的諸性質より両酵素が同一のポリペプチドであることを推察した。本章において、単一のPUR分解酵素遺伝子からCBSエステラーゼ及びPURエステラーゼに相当する2種類の発現産物が得られたことより、TB-35株由来の2種類のエステラーゼは同一の遺伝子産物であり、同一の一次配列を有することが明らかとなった。これらの結果より、PURエステラーゼとCBSエステラーゼの相違は、PUR付着部位周辺の立体構造の変化によることが、改めて推察された。他の高分子分解酵素においては、このように同一のポリペプチドが異なる基質特異性を示すという例はない。しかし、*Bacillus subtilis* 由来のセ

リンプロテアーゼ、Subtilisin Eにおいて、分子内シャペロンの役割を果たしているプロ
プチドの変異によって、成熟Subtilisin Eの基質特異性が変化するという報告がなされてい
る(37)。TB-35株のPURエステラーゼにおけるシャペロニンの関与は不明であるが、構造
の異なる2種類の酵素が発現したことから、何らかのフォールディング機構が存在する
可能性が考えられた。