

酵素を用いた新規環境浄化セパレーションシステムの開発

島山 広 大*・榊 秀次郎

Development of a novel environmental clean-up separation system using enzyme

Kodai HATAKEYAMA* and Shujiro SAKAKI

(平成23年11月25日受理)

The purpose of this research is development of a novel environmental clean-up separation system that can separate or detoxify a toxic substance. We developed a unique method for converting atmospheric aldehyde into alcohol using formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* (PFDH) doped in a polymer film. A film of poly(2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate) (PMB), which has a chemical structure similar to that of a biological membrane, was employed for its biocompatibility. In this study methacryloyl-group chemical modified PFDH was prepared by use of 2-methacryloyloxyethylisocyanate. To synthesize a novel enzyme-monomer complex, the modified PFDH was polymerized with MPC by a conventional radical polymerization method. To measure enzyme activity of poly(modified PFDH-co-MPC), formaldehyde and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) were used as substrate and coenzyme. For molecular weight measurement, poly(modified PFDH-co-MPC) was analyzed by SDS-PAGE. The poly(modified PFDH-co-MPC) had enzyme activity and was large molecular. From these results, the novel enzyme and synthetic monomer complex have been created.

1. 緒言

本研究では、汚染物質をバイオ分子の特異性により物質変換し、分離・無害化できる新しい環境対応型のセパレーションシステムを構築するための膜素材の合成と評価を行う。特にホルムアルデヒドは、硬化剤や改質剤として、医療現場では殺菌剤として利用されているが、シックハウス症候群の原因物質であり、特異的に分離・無毒化できる方法の開発が必須となっている。そこで、この社会的問題を解決するために酵素の特異性を利用し、空気中にて長期作動する機序を確立する高分子膜を新たに設計する。この新規住環境浄化セパレーションシステムを搭載することで、極微量のホルムアルデヒドも、安全な化合物に変換できることを証明する。

現在までに構築したシステムは、ホルムアルデヒド分解酵素（ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、FDH）（東洋紡績（株））溶液及び、ホスホリルコ

リン基含有高分子（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）とブチルメタクリレート（BMA）共重合体、MPC：BMA=0.3：0.7（日油（株））溶液を混合した混合溶液をキャストした膜でホルムアルデヒドを分解あるいはアルコールに変換できることを明らかにしてきた¹⁾。

しかしながら、キャストした膜であるので、気体の透過性はなく、膜の強度は非常に低い。そこで、酵素フィルムをナノファイバー化し、他の固定化担体との複合化を行い、気体の透過性及び、強度の確保が必要である。

また、ホルムアルデヒドを分解する微生物の探索や研究及び、微生物を用いた水溶液中のホルムアルデヒド（ホルマリン）の分解に関しては既に見知がある（特許第3774774号）が、安全性及び、選択性のあるホルムアルデヒド分解酵素を用いた気相中のホルムアルデヒドを完全に無害な化合物に変換（分解）できるセパレーションシステムに関しては、全く研究されていない。

更に、酵素反応を大気中で長期間安定に行うこと

* 秋田高専専攻科学生

は、一般に極めて困難であると考えられており、従来、これに関連する研究はほとんどない。

そこで本研究では、含水性及び、吸保湿性が高く、酵素の安定性を維持することの可能な、ホスホリルコリン基含有高分子及び、酵素を複合化することにより、酵素反応を気相中でも効率的に行うことを示すとともに、ホルムアルデヒドを安全な化合物に変換（分解）可能な新規プロセスを構築すること及び、ホスホリルコリン基含有高分子と酵素を複合化した後に、これをナノファイバー化し表面積を大きくして反応効率を高めるとともに、他の担体と複合化することにより、気体の透過性及び、強度の双方を確保することを目的としている。

2. 実験

2-メタクリロイルオキシエチルイソシアネート (MOI) 修飾ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ (FDH) (MOI 修飾 FDH) の調製

バイオ分子としては、ホルムアルデヒド分解酵素（ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ）(FDH) を用いた (Fig. 1)。

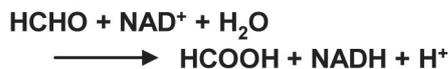


Fig. 1 Decomposition of formaldehyde by formaldehyde dehydrogenase (FDH).

FDHのアミノ基（N末端アミノ基及び、リジン残基）と結合可能な官能基としてイソシアネート基及び、重合可能な官能基としてメタクリル基を有する2-メタクリロイルオキシエチルイソシアネート (MOI) (昭和電工 (株)) (Fig. 2) を用いた。

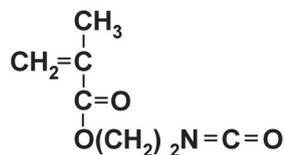


Fig. 2 Chemical structure of 2-methacryloyloxyethyl isocyanate (MOI).

10.0mg/mL FDH 溶液2000 μ L (100mM 炭酸緩衝液 (pH 10.0)) に20.7mg/mL MOI 溶液40 μ L 加え混合し、4 $^{\circ}$ C・1時間反応させた。反応終了後、PD-10カラム (GEヘルスケア・ジャパン (株)) にてMOI

修飾FDHを精製した (Fig. 3)。尚、PD-10カラムの精製条件は、溶出液:10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), 流量:0.5mL/min, フラクシオン容量:1.0mL/フラクシオン, 検出:吸光度 (280nm) にて行った。

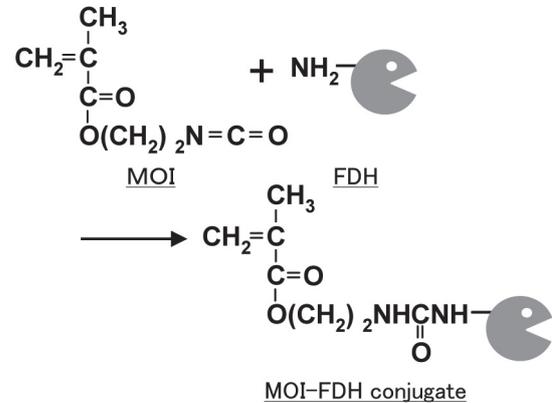


Fig. 3 Preparation of MOI-FDH conjugate.

MOI 修飾 FDH の修飾率の測定

1.0mg/mL の MOI 修飾 FDH 溶液500 μ L, 1.0mg/mL の FDH (未修飾 FDH) 溶液500 μ L あるいは, 0, 0.125, 0.25, 0.5mM グリシン (和光純薬工業 (株)) 水溶液に, 100mM 炭酸緩衝液 (pH 10.0) 500 μ L 及び, 0.1wt% トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) (東京化成工業 (株)) 水溶液 500 μ L を加え, 40 $^{\circ}$ C・2時間・遮光状態でインキュベートした。インキュベーション終了後, 10% SDS 水溶液500 μ L 及び, 1N-HCl 溶液250 μ L 加えた後に, 335nm の吸光度を測定した。

グリシン検量線を用いて MOI 修飾 FDH の残存アミノ基を計算し各修飾剤の修飾率を求めた結果, 修飾率は11.2%であった。

MOI 修飾 FDH/MPC 複合体の調製

含水性及び、吸保湿性が高く、酵素の安定性を維持することの可能な、ホスホリルコリン基含有モノマーとして2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) (日油 (株)) (Fig. 4) を²⁾、水溶性アゾ重合開始剤として、2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride (VA-044) (和光純薬工業 (株)) (Fig. 5) を用いて、密閉反応容器に4.846mg/mL MOI 修飾 FDH 溶液 (10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) 413 μ L, 20mg/mL VA-044 溶液 (10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) 42 μ L, 40mg/mL MPC 溶液 (10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0))

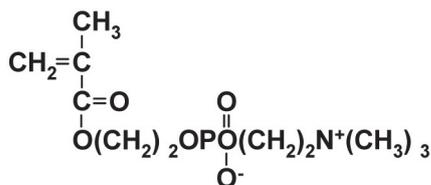


Fig. 4 Chemical structure of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC).

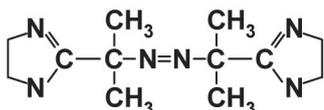


Fig. 5 Chemical structure of VA-044.

1000 μ L, 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 545 μ L を加えた。Ar 雰囲気下 35 $^{\circ}$ C \cdot 2, 4, 6, 8 時間重合した。

MOI 修飾 FDH/MPC 複合体の酵素活性測定

基質として 0.185% ホルムアルデヒド水溶液 1000 μ L, 補酵素として 10mM β -NAD⁺ 水溶液 300 μ L, 希釈液として 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1800 μ L を混ぜた。測定直前に 8.0mg/mL FDH (未修飾 FDH, 未重合 FDH) 溶液 (10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) あるいは, MOI 修飾 FDH/MPC 複合体溶液 (10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) 1000 μ L を加え, 340nm の吸光度を 0~50 秒間測定した。未修飾 FDH の酵素活性を 100% として, 各重合時間 (2, 4, 6, 8 時間) の MOI 修飾 FDH/MPC 複合体の相対酵素活性を示した (Fig. 6)。

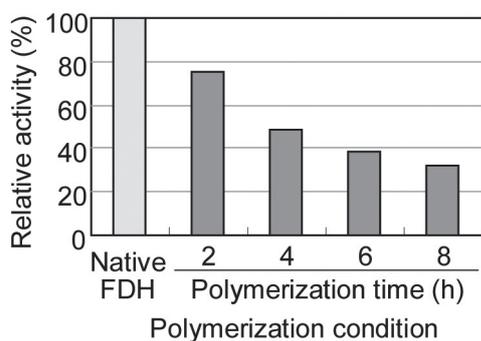


Fig. 6 Relative enzyme activity of poly(MOI-FDH conjugate-co-MPC).

複合体の相対酵素活性測定結果より, 重合時間が短いほど酵素活性が高くなった。これは, 開始剤から

生じるラジカルが酵素の活性中心を攻撃したことによると思われる。

MOI 修飾 FDH/MPC 複合体の SDS-PAGE による分子量測定

未修飾 FDH, MOI 修飾 FDH, MOI 修飾 FDH/MPC 複合体 (重合時間: 2, 4, 6, 8 時間) を 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 1 mg/ml に希釈した。各溶液と トリス SDS β -ME サンプル処理液 (コスモバイオ (株)) を等量混合し, 10 分間煮沸処理して, SDS 化した。

分子量マーカー (アトー (株)), 各サンプルを 20 μ L を, 以下の条件で電気泳動に供し, 泳動結果は, Fig. 7 に示した。

泳動条件

- ・ゲル: 7.5% 均一ゲル (e-PAGEL: アトー (株))
- ・泳動液: 25mM Tris, 19.2mM Gly., 0.1% SDS
- ・電流: 20mA 定電流
- ・泳動時間: 90分
- ・染色: EzStain AQua (アトー (株))

A: molecular weight marker
 poly(MOI-FDH conjugate-co-MPC)
 B: polymerization time (2 h)
 C: polymerization time (4 h)
 D: polymerization time (6 h)
 E: polymerization time (8 h)
 F: MOI-FDH conjugate
 G: native FDH

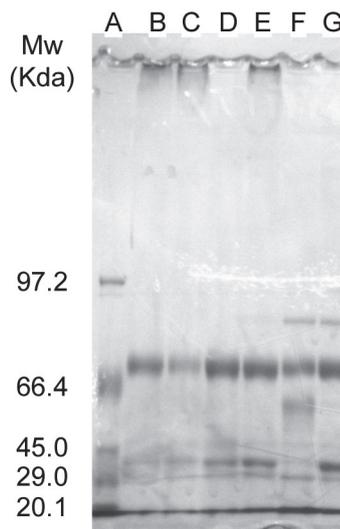


Fig. 7 SDS-PAGE of poly(MOI-FDH conjugate-co-MPC), MOI-FDH conjugate and native FDH.

F, Gで見られるバンドは、それぞれ未修飾FDH, MOI修飾FDHである。FDHの分子量は150,000であるが、 β -MEにより分子量75,000のサブユニットに還元されたため、97,200と66,400の間にバンドが確認された。

また、B, C, D, Eでは、未修飾FDHあるいは、MOI修飾FDHのバンドは確認されず、非常に高分子量のバンドが確認された。

また、重合時間が2時間のMOI修飾FDH/MPC複合体でも非常に高分子量のバンドが確認されたことにより、FDH1分子に7.1分子のMOIが化学修飾されたMOI修飾FDHが架橋剤として働いたことがわかった。

以上の結果より、非常に高分子量且つ、酵素活性

を有する新規生体高分子・合成高分子複合材料を創成できた。

3. 参考文献

1. Enzyme Conversion of Atmospheric Aldehydes into Alcohol in a Phospholipid Polymer Film, Naoki Tanaka, Akihiro Watari, Tomoko Asada, Shigeru Kunugi, Yin-Fai Lee, Satoshi Yamada, Kenshiro Shuto and Shujiro Sakaki, Journal of Bioscience and Bio engineering, Vol.104, No.4, 228-231 (2009)
2. 先端医療を支える新素材 MPCポリマー, 石原一彦, The Mainichi Journal, Vol.6, No2, 68-70, 2010