

プラスチック化合物の抗体酵素による分解評価 ならびに反応メカニズムの検討

兵庫医療大学薬学部 芝崎 誠司

1. 緒言

プラスチック化合物は日用品、工業材料、医用材料などの用途において不可欠である。プラスチック系廃棄物の処理に関する様々な問題と、自然環境への悪影響が認識され、リサイクルが活発に展開されている。しかし、プラスチック製品の中にはリサイクルが困難であるものも少なくなく、これに対して生分解性プラスチックが問題解決の糸口として期待されている。生分解性プラスチックは、誤って自然環境中に放出されたとしても、環境中の微生物群によって分解および代謝され、自然界における物質循環系に戻る環境に配慮した材料として注目を集めている。今後、多様な性質を持つ生分解性プラスチックが既存のプラスチックにとって代わることが考えられる。しかし、国内のプラスチック生産量約 1,500 万トンのうち、数パーセントしか生分解プラスチックに換えられなかったとしても、その全てを土壌等の自然環境に放出すると、分解に関与する微生物による生態系の破壊が憂慮される。

そこで、酵素反応のように温和な反応条件を用いつつも、速やかにプラスチック化合物を分解できる技術の展開が望まれる。一般的に酵素は担体に固定化することで、熱安定性の向上や適応 pH 域が拡大されることが知られている。これまで我々は、タンパク質分子を微生物細胞の表層へ固定化する、分子ディスプレイ技術を確立している。この技術により創製された酵母はアーミング酵母(Arming yeast)とよばれ(Shibasaki et al., Anal. Sci. 2009)、微生物細胞に、重金属補足担体、バイオセンサー、

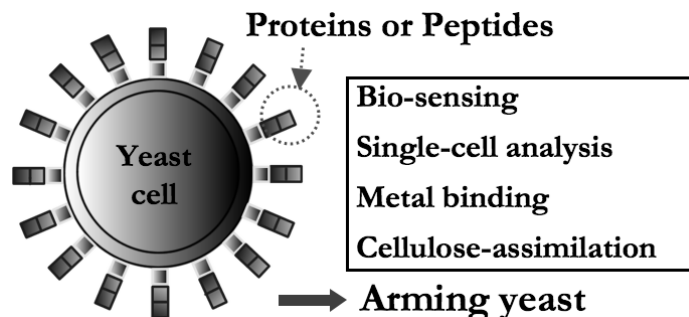


図 1 分子ディスプレイ技術によるアーミング酵母の創製

ワクチンなどの新しい機能を付与することが可能となっている。特に、酵素分子をディスプレイすることにより、自己増殖可能な菌体触媒が数多く開発されている。本研究では、出芽酵母を宿主細胞とし、エステラーゼ活性を持つ酵素、ならびに抗体酵素のディスプレイを試み、プラスチック系化合物に対してより分解活性の高いクローンの創出、ならびに分解能評価と反応機構の検討を目指した。

2. 実験

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁タンパク質である α アグルチニンをアンカーとして、*Candida antarctica* 由来リパーゼ B (CALB) のディスプレイについて主に、提示株の培養条件（炭素源濃度、時間、温度等）と酵素活性の相関について検討した。リパーゼ活性はリパーゼキット S により測定した。プラスチック化合物のモデルとして使用した基質のポリウレタンは、2,4-トリレンジイソシアネートと 1,6-ヘキサジオールにより合成した。次に、エステラーゼ活性を持つ抗体酵素 E691 のディスプレイについて検討した。まず、アンカーの α アグルチニンの C 末側 320 アミノ酸の N 末側と E691 の C 末側の融合部分に配置するリンカーの長さを検討した。次に、E691 を構成する重鎖 CDR3 と軽鎖 CDR1 のそれぞれに、PCR を用いてランダム変異を導入した。この PCR によって得られた断片を酵母表層ディスプレイ用ベクター pCAS1 の *BgIII-KpnI* サイトに挿入し、E691 変異体クローン遺伝子ライブラリーを作製した。

3. 結果と考察

YPD 培地で培養した CALB 提示酵母株を各種条件で培養し、酵素活性を測定した結果、SDC (0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acids, 1% Casamino acids, 2% Glucose) 培地にて 5 日間、30℃で培養した場合に最も高いリパーゼ活性が得られた。同条件で培養した酵母細胞を新たな SDC 培地懸濁し、フィルム状に加工したポリウレタンとインキュベートしたところ、コントロール株との比較により、CALB による作用と考えられる分解が観察された。抗体酵素 E691 変異体クローンの作製は、pCAS1-E691 遺伝子ライブラリーを、酢酸リチウム法により MT8-1 酵母細胞株に導入し、FITC 標識 TSA との結合をフローサイトメーターにより評価し、酵素活性の上昇が期待できるクローンを選抜した。CALB 提示酵母細胞株同様、幾つかのクローンにおいてポリウレタンの分解活性が確認されているが、抗体酵素による分解反応のメカニズムを考察するためには、さらなる電子顕微鏡等による形態変化の確認や、分解産物の解析が必要である。