

インテリジェントな徐放性システムを利用した 新しい殺菌方法の開発 — 切削油から分離した *P. aeruginosa* の プロテアーゼの精製とその性質 —

*Development of New Sterilizing Method using an Intelligent Drug Delivery System -Purification and Characterization of a Protease from *P. aeruginosa* Grown in Cutting Oil-*

増井 昭彦* 藤原 信明* Ivanka Karadzic**
Akihiko Masui Nobuaki Fujiwara

(2007年6月14日 受理)

The *Pseudomonas aeruginosa* san-ai strain was isolated from water-soluble cutting oil used for cooling and lubrication during industrial metalworking processes. This strain, which is grown in a highly alkaline (pH 10) mixture of surfactants and mineral oil, produces an extracellular proteolytic enzyme. We have purified and characterized this 18 kDa protease. The *P. aeruginosa* san-ai protease functions optimally at pH 9.0 and 60 °C. Additionally, its monomeric structure contains at least one disulfide bond. The enzyme is stable in the presence of organic solvents. For that reason, it is suitable for peptide synthesis. Furthermore, the *P. aeruginosa* san-ai protease can be used in an intelligent drug delivery system (DDS) designed for applications in the metal industry for prevention of cutting oil putrefaction.

キーワード：*Pseudomonas aeruginosa*, プロテアーゼ, 切削油, ドラッグデリバリーシステム (DDS)

1. はじめに

微生物の制御は、医療・衛生面だけでなく、食品をはじめとする多くの産業界において共通の課題である。そのため、個々の用途に適した殺菌剤が合成・販売されている。しかしながら、これらの化学合成殺菌剤は、人体にも直接影響するケースが多く、さらには、発がん性物質あるいは環境ホルモンの原因物質として、長期にわたって人体に影響を及ぼす場合も少なくないことから、殺菌剤の使用量をできるだけ削減する

か、新しい殺菌システムの開発が望まれている。

金属の切削加工では、切削の際に発生する摩擦熱の冷却や潤滑性能の向上のため、切削加工油が用いられている。切削加工油は、従来、油性が用いられていたが、現在ではほとんど水溶性の油剤が用いられている。水溶性切削加工油は、90%以上が水であり、開放系で使用されるため、腐敗しやすく、化学合成殺菌剤を添加して腐敗対策を行っている。

水溶性切削加工油の腐敗は、その初期に *Pseudomonas aeruginosa* が優先的に増殖するのが特徴である。そこで我々は、化学合成殺菌剤にかわる新たな殺菌方法の試みとして、*P. aeruginosa* を分解・溶菌させる溶菌酵素を開発した¹⁾。

* 化学環境部 環境・エネルギー・バイオ系

** ベオグラード大学(セルビア)

一方、殺菌剤の使用量を削減するためには、殺菌剤を固定化することが考えられる。溶菌酵素についても、その実用化に当たっては、その利用形態から、酵素が安定して存在し、長期間活性を発現できることが必要である。そのためには、溶菌酵素についても、担体に固定化させ徐放性を持たせることが望ましい。固定化の方法としては、天然高分子、合成高分子、無機担体などへの吸着・結合、あるいはカプセル化などがある。工業的な利用には、担体はできるだけ安価で、開発する趣旨から環境保全に適した材質でなければならない。そのため、生分解性に優れた生体高分子であるゼラチンゲルへの封じ込めにより固定化させる方法を提案した²⁾。

この方法は、殺菌剤・酵素をゼラチンゲル中に固定化させておくと、腐敗菌 (*P. aeruginosa*) の生育に伴って分泌されるプロテアーゼが、ゼラチンゲルを分解し、固定化された殺菌剤・酵素を放出する。放出された殺菌剤・酵素は、腐敗菌に作用するというシステムである。すなわち、腐敗菌の生育がスイッチとなって、自らが殺菌・分解される。簡便で自然の生態系を利用した徐放性のインテリジェントな殺菌システムである (図 1)。

このインテリジェントな殺菌システムは、殺菌剤・酵素を必要な時にだけ作用させることができるため、殺菌剤・酵素の使用量を削減できる。さらに、固定化担体はゼラチンであるため、完全な生分解性を合わせ持つ。そのため、環境に対する負荷も低減できる。

本システムにおいて、ゼラチンゲルの分解とそれに伴う固定化薬剤の放出は、プロテアーゼの作用によって制御されている。そのため、本システムを確立するには、腐敗菌が分泌するプロテアーゼの性質を明らかにする必要があり、酵素を精製し、その特性を調べた。

2. 実験方法

(1) 使用菌株

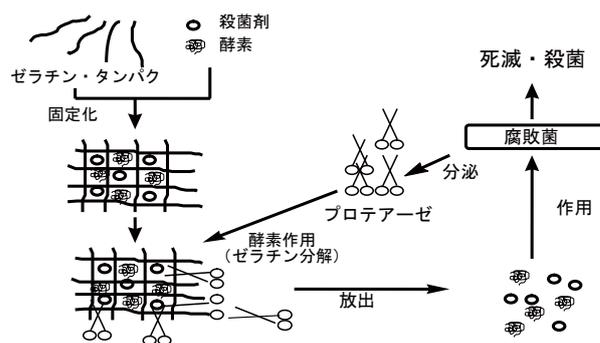


図 1 インテリジェントな徐放性殺菌システム
Model of an intelligent DDS.

使用菌株 *P. aeruginosa* san-ai は、腐敗した水溶性切削油中から単離した。

(2) 培養方法

P. aeruginosa san-ai は、LB 培地 (0.5 % NaCl, 0.5 % 酵母エキス, 1.0 % トリプトン) を用いて培養 (30 °C, 120 h) した。

(3) 酵素の精製

酵素の精製は、培養上清を限外濾過により濃縮後、硫酸塩析及びクロマトグラフィー [Butyl-トヨパール (東ソー), Sephadex G-75 (ファルマシア)] により行った。

(4) 酵素活性の測定

酵素活性は、Horikoshi の方法に従って、pH 7.6, 30 °C で測定した³⁾。

(5) タンパク量の測定

タンパク量は、標準タンパク質として牛血清アルブミン (和光) を用いて、Lowry の方法によって測定した⁴⁾。

(6) アミノ酸分析

酵素のアミノ酸分析は、酵素を 6N HCl 溶液中で加水分解 (110 °C, 22 h) し、遊離アミノ酸を Hitachi L-8500 アミノ酸分析計 (日立製作所製) を用いて測定した。

(7) 有機溶媒安定性

酵素の有機溶媒に対する影響は、酵素溶液を 25

表 1 *P. aeruginosa* san-ai のプロテアーゼの精製
Purification of the protease from *P. aeruginosa* san-ai.

精製過程	全蛋白質量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/ml)	精製度 (倍)	収率 (%)
培養濾液	6,417	105,760	17	1	100
限外濾過	825	75,766	92	6	72
硫酸塩析	38	26,820	706	43	25
Butyl-トヨパール	16	15,333	958	58	15
Sephadex G-75	2	10,960	5,480	332	10

%(v/v) 有機溶媒中で 30 °C, 10 日間振とうさせ, 残存活性を測定した.

3. 結果と考察

(1) 酵素の精製

精製は, 培養, 除菌, 濃縮後, 疎水及びゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより行った. 収率は約 10 %, 精製度は培養上清の約 330 倍であった (表 1).

(2) アミノ酸組成

本酵素のアミノ酸組成を調べたところ, 疎水性及び酸性アミノ酸の割合が多いことがわかった (データ省略). これは, アルカリ性の水溶性切削油中という一種の極限環境下で, 本酵素が自らの構造を保持するため, 分子表面が, 疎水性及び酸性アミノ酸に富んだ構造をとっているためであると予想される.

(3) タンパク質分子量

精製した酵素の分子量は, ゲルろ過の結果からは 18 KDa であった. 一方, 電気泳動分析からは, 還元的条件では 35 ± 2 KDa, 非還元的条件では 23 ± 2 KDa であった (図 2). 還元的条件と非還元的条件での分子量の違いは, 本酵素のモノマー同士が, ジスルフィド結合して 2 量化しているためと考えられる. また, ゲルろ過と電気泳動分析の結果が異なるのは, 本酵素の酸性アミノ酸の比率が高いことが影響していると思われる.

(4) 作用至適 pH と pH 安定性

本酵素の作用至適 pH は 9.0 で, アルカリ性のプロテアーゼであることがわかった (図 3). また, 本酵素は, pH 6-12 の範囲で安定であり, 他の *P. aeruginosa* 由来のプロテアーゼに比べて, 広い pH 領域で安定であることを示していた (図 4)⁵⁾.

(5) 作用至適温度と熱安定性

本酵素の作用至適温度は 60 °C であった (図 5). また, 60 °C, 90 分保持後の残存活性は, 約 65 % であり, 他の *P. aeruginosa* 由来のプロテアーゼより高い熱安定性を示した (図 6)⁵⁾.

(6) 阻害剤の効果

酵素活性に及ぼす阻害剤の影響を調べたところ, 本酵素の活性は, 1, 10-phenanthroline と EDTA^{*1)} により阻害されることがわかった. この結果から, 本酵素は金属プロテアーゼであると考えられる. また, DTT^{*2)} によっても阻害されることから, 本酵素はジスルフィ

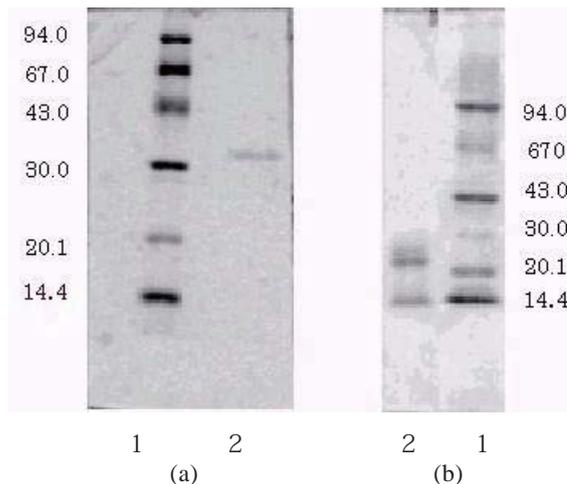


図 2 電気泳動分析による分子量決定
Molecular mass determination by SDS-PAGE.

(a) 還元的条件 (b) 非還元的条件
1: 分子量マーカー 2: 精製酵素

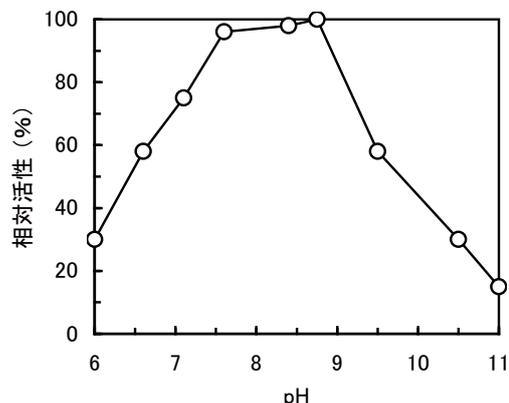


図 3 酵素の至適 pH

Effects of pH on enzyme activity.

緩衝液: pH 6.0(クエン酸), pH 6.6-7.6(リン酸), pH 8.4-9.5(トリス塩酸), pH 10.5-11(ホウ酸)

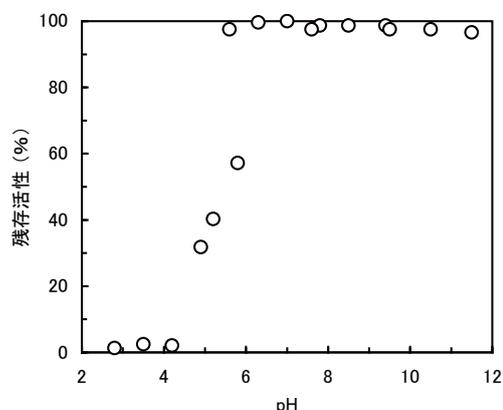


図 4 酵素の pH 安定性

Effect of pH on enzyme stability.

30 °C, 4 h 保持後の残存活性

緩衝液: pH 2.8-5.8(クエン酸), pH 5.6-7.8(リン酸), pH 7.6-9.4(トリス塩酸), pH 9.5-11.4(ホウ酸)

*1) ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt

*2) dithiothreitol

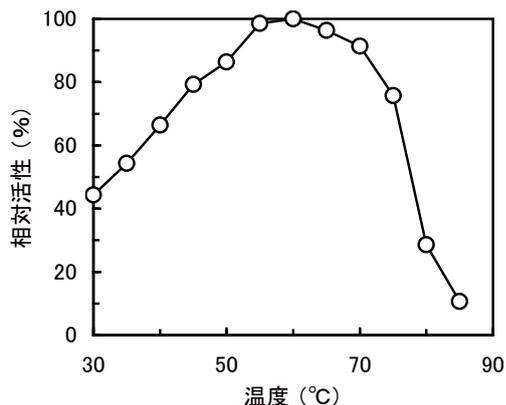


図5 酵素の至適温度
Effects of temperature on enzyme activity.

ド結合を持つと予想される。このジスルフィド結合を持つことが、酵素の熱安定化に寄与していると考えられる。

(7) 有機溶媒安定性

本酵素の有機溶媒に対する安定性を調べたところ、25% (v/v) 有機溶媒中で10日間振とう後の残存活性は、メタノール、エタノール、N, N-ジメチルホルムアミドの存在下では、60%以上の活性を維持していた(図7)。このことから、本酵素は、これらの有機溶媒中では比較的安定であり、ペプチド合成などに利用できる可能性がある。

4. まとめ

水溶性切削油の腐敗防止と殺菌剤使用量の削減のため、殺菌剤・酵素をゼラチンに固定化させ、腐敗菌 (*P. aeruginosa*) が分泌するプロテアーゼにより、殺菌剤・酵素が放出されるインテリジェントな殺菌システムを提案した。そのシステムを確立するため、酵素を精製し、その特性を調べたところ、本酵素は分子量約18 kDa、至適温度は60°C、至適pHは9.0であり、pH 6以上で安定であった。また、疎水性及び酸性アミノ酸に富んでおり、分子内にジスルフィド結合を持つことが予想された。阻害剤の影響から、金属プロテアーゼであることがわかった。さらに本酵素は、メタノール、エタノール、N, N-ジメチルホルムアミドなどの有機

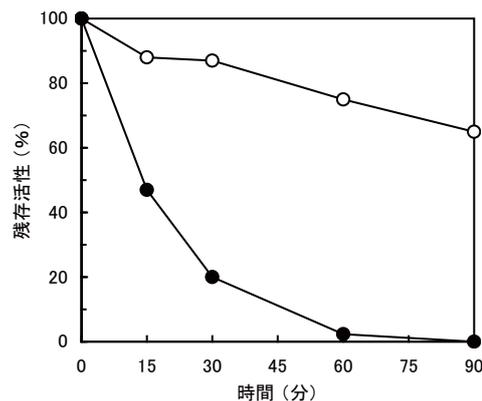


図6 酵素の熱安定性
Thermal stability of the enzyme.

60°C と 70°C で種々の時間保持後、残存活性を測定
○ : 60°C ● : 70°C

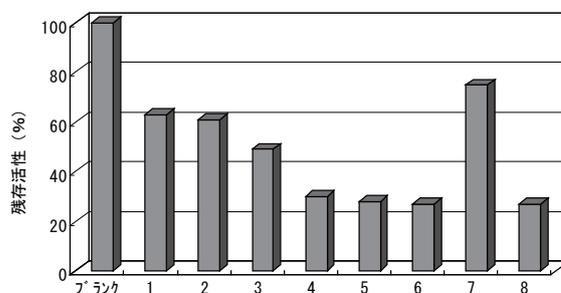


図7 酵素の有機溶媒安定性
Organic solvent stability of the enzyme.

25%有機溶媒中、10日間振とう
(160 rpm, 30°C) 後の残存活性

1:メタノール, 2:エタノール, 3:アセトン,
4:ブタノール, 5:クロロホルム, 6:ヘキサン,
7:N, N-ジメチルホルムアミド, 8:イソプロパノール

溶媒存在下で安定で、ペプチド合成などの工業的利用の可能性がわかった。

参考文献

- 1) 大阪府, 三菱石油: 特開平 11-279014.
- 2) 藤原信明, 増井昭彦, 古本昭子: 最新酵素利用技術と応用展開, シーエムシー (2001) p.341.
- 3) K. Horikoshi: Agric. Biol. Chem., **35** (1971) p.1407.
- 4) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: J. Biol. Chem., **193** (1951) p.265.
- 5) K. Morihara: Biochim. Biophys. Acta, **73** (1963) p.113.