

ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレンのヒドロゲル化と

酵素の固定に関する研究 II

松田 清美・山田 和典・平田 光男(応用分子化学科)

[緒言]

酵素は生体内触媒として、生体内で起こる多数の化学反応に関与している。その特徴は、一般の化学触媒とは異なり、常温・常圧という温和な条件下で効率よく反応を触媒し、その反応特異性が非常に高く、高純度の生成物を得ることができることである。酵素はこのように優れた性質を持つが、工業的に使用する場合、その多くが水溶性のため、回収が困難で使い捨てになる。そこで、酵素を水不溶性にして繰り返し使用するため、基盤に固定化して利用することが考えられている¹⁾。

本研究では、固定化基盤を高分子基質にグラフト重合により種々のモノマーを導入して調製する。その際の調製条件(モノマーの選択とグラフト量)と酵素を固定化するときの反応条件(固定化試薬の種類、濃度、反応時間など)の最適化を行う。前報では、高分子基質としてポリエチレン(PE)板を用い、酵素を固定化する方法には共有結合法を選択して、PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板にトリプシンを固定化し、その活性を pH、温度、グラフト量、固定化量などから評価した。第 II 報では、高分子基質として多孔質フィルムである延伸 PTFE(ePTFE)フィルムを用いてグラフト化膜を調製し、ウレアーゼを固定化して酵素固定化時の反応条件の最適化と活用効率を高めることを目指している。グルコースオキシダーゼ(GOD)を固定化した膜は、グルコースに応答してインスリンの透過制御を行うことのできる糖尿病対策への利用を目指している。

[実験]

高分子基質として、ePTFE フィルム(厚さ 35 μm 、平均孔径 3.0 μm 、空隙率 79%または厚さ 40 μm 、平均孔径 0.5 μm 、空隙率 83%)を用い、酸素プラズマ処理と光重合を併用して PHEMA または PAA グラフト化 PTFE (ePTFE-g-PHEMA または ePTFE-g-PAA) 膜を調製した。酸素プラズマ処理時間は 120 秒とし、光重合時間を調節することによりグラフト量を制御した。

酵素の固定化は共有結合法を用い、ePTFE-g-PHEMA 膜へはウレアーゼを直接固定化法とスペーサーを用いる方法に従った。Fig. 1 に反応の模式図を示す。直接固定化法では、PHEMA グラフト鎖に 1,1'-カルボジイミダゾール(CDI)を結合させた後、リン酸緩衝溶液中でウレアーゼの固定化を 4 $^{\circ}\text{C}$ で行った。スペーサーを用いる方法では、6-アミノ-n-カプロン酸をスペーサーとして導入した後、直接法と同様にウレアーゼを固定化した。

ウレアーゼの酵素活性は、基質に尿素を用い、pH や温度を変化させて分解生成するアンモニウムイオンをインドフェノール法により比色定量(635 nm)し、反応時間に対するアンモニウムイオン濃度の関係から初速度を求め、native ウレアーゼの初速度と比較して評価した。

ePTFE-g-PAA 膜への GOD の固定化は直接法により、縮合試薬として 1-シクロヘキシル-3-(2-モルフォリノエチル)メソ-p-トルエンスルホン酸(CMC)を用いてリン酸緩衝溶液中、4 $^{\circ}\text{C}$ で行った。GOD の酵素活性は基質としてグルコースを用い、4-アミノアンチピリンとフェノールを分解生成物である過酸化水素による酸化縮合で赤色色素とし 505 nm における吸光度変化から決定した。

GOD 固定化 ePTFE-g-PAA 膜を用いたインスリンの透過実験は、2槽型セルの中央に膜を設置し、

膜のグラフト面の向き，2槽に入れる溶液の pH 変化または基質添加によるインスリン透過量を吸光度を測定することにより行った。

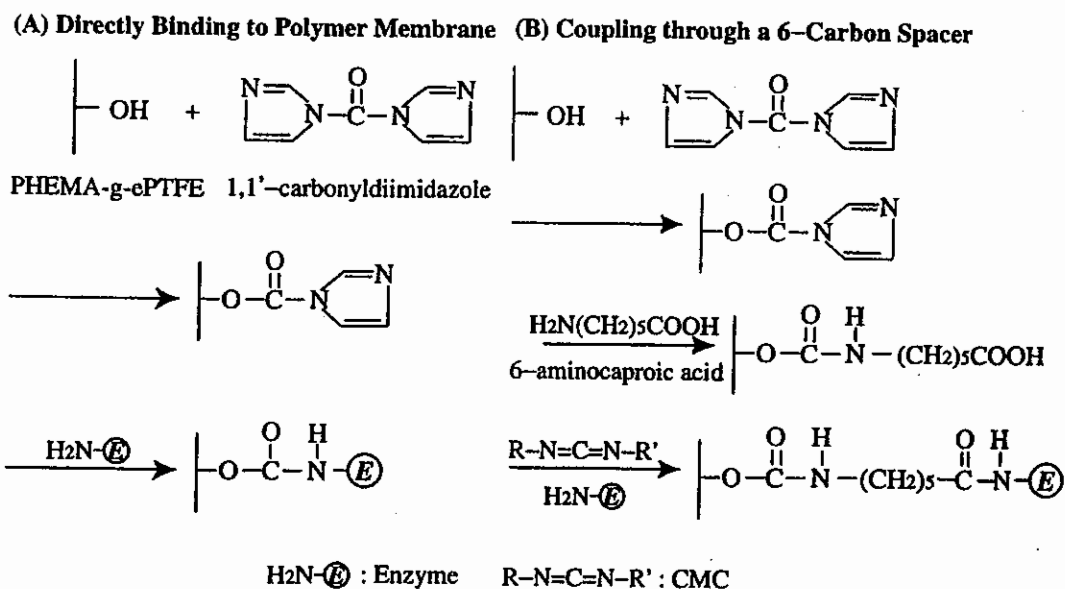


Figure 1 The reaction schemes for covalent immobilization of enzymes through the directly binding with CDI (A) and the coupling with 6-carbon spacer after the reaction with CDI (B)

[結果および考察]

ウレアーゼ固定化 ePTFE-g-PHEMA 膜

酵素活性の固定化時 pH 依存性

pH 4.0 から 9.0 で固定化したウレアーゼの酵素活性の固定化時 pH 依存性を Fig. 2 に示す。固定化されたウレアーゼの相対活性は，直接固定化法では pH 7.0 で最大となった。一方，スペーサーを用いた方法では，pH 6.0 で最大となった。これは，pH が異なるとウレアーゼの活性部位のアミノ基のプロトン化とカルボキシル基の解離が起こり，ウレアーゼ分子の形態が変化したものと考えられる。また，直接固定化したウレアーゼの酵素活性の最大 pH が 7.0 であるのに比べ，スペーサーを用いて固定化したウレアーゼの酵素活性の最大 pH が 6.0 となったのは，スペーサーを用いた固定化法の方が固定化が起こりやすく，この理由としてはウレアーゼ中のアミノ基数が減少したことによる等電点の低下が推定される。

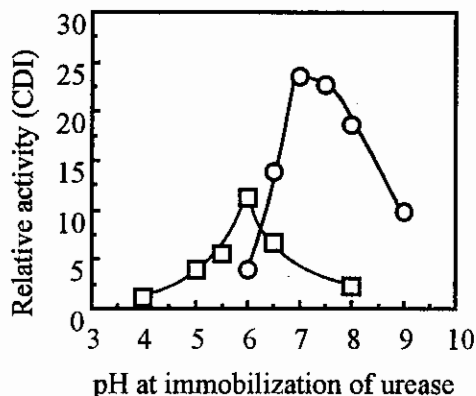


Figure 2 Changes in the relative activity with the pH value at the immobilization of urease onto ePTFE-g-PHEMA films at 30 °C

酵素活性のグラフト量依存性

固定化量のほぼ等しい (21.6~24.8 mg/g 膜) ウレアーゼ固定化 ePTFE-g-PHEMA 膜のグラフト量に対する固定化ウレアーゼの相対活性を Fig. 3 に示す。ウレアーゼの相対活性は、直接固定化法ではグラフト量 1.09 mmol/g で最大値 26.7%を示し、スペーサー法では 0.66 mmol/g で最大値 22.4%を示した。グラフト量の増加は、双方とも固定化ウレアーゼの相対活性を低下させた。このことは、高グラフト量の ePTFE-g-PHEMA 膜ではグラフト層が厚くなり内部に固定化されたウレアーゼと基質との接触性が低下し、酵素活性の低下に至ったものと考えられる。低グラフト量の ePTFE-g-PHEMA 膜に固定化したウレアーゼは、洗浄、活性測定および保存中にウレアーゼの遊離や失活が少なく、反復利用が可能であった。

酵素活性の温度依存性

native および固定化ウレアーゼの酵素活性の温度に対する変化を Fig. 4 に示す。Native ウレアーゼの酵素活性は 30℃で最大となり、固定化ウレアーゼでは 30~60℃の範囲で一定となった。このことから固定化することにより酵素活性は native より相対的に低下するが広い温度範囲での使用が可能となる利点が見出された。

固定化酵素の再利用性

Fig. 5 に温度を変えて測定した比活性と測定回数を示す。固定化ウレアーゼの酵素活性は、30 から 60℃では測定回数に対しほぼ一定値を示したが、70℃では急激に低下した。Fig. 4 の結果も合わせると、70℃ではウレアーゼが変性し失活したものと考えられる。

GOD 固定化 ePTFE-g-PAA 膜

インスリン透過性への固定化面の影響

インスリンの透過実験を、グラフト面の向きを変えて行った結果を Fig. 6 に示す。グラフト面を供給側に向けた場合、pH 7.35 では 8.00 に比べ

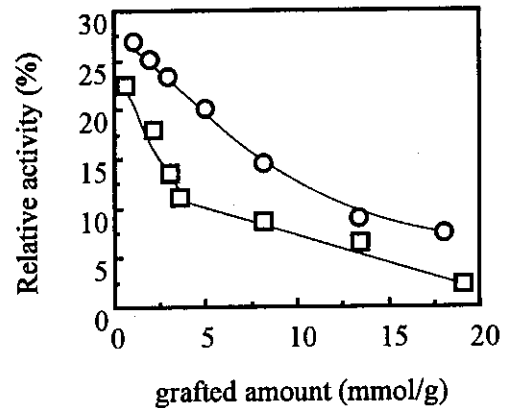


Figure 3 Changes in the relative activity with the grafted amount for urease immobilized onto ePTFE-g-PHEMA films at 30 °C

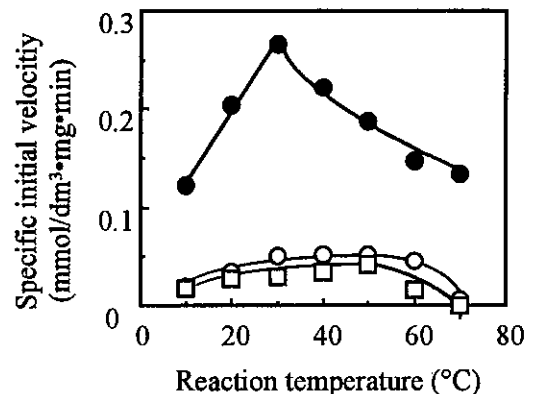


Figure 4 Changes in the specific initial velocity of native (●), immobilized directly(○) and coupling through 6-AA as spacer(□)

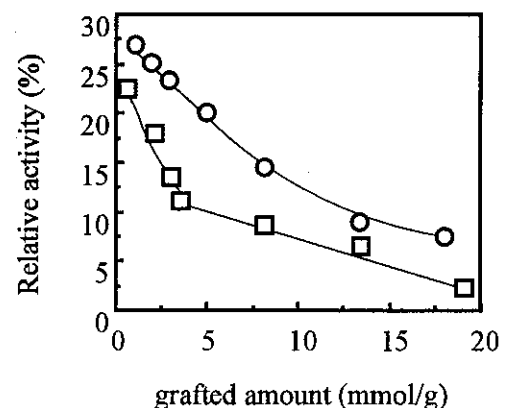


Figure 5 Changes in the relative activity with the grafted amount for urease immobilized onto ePTFE-g-PHEMA films at 30 °C

インスリンの透過量は大きかった。このことは、pH 7.35の方がグラフト鎖が収縮しているためとインスリンとの静電的反発が少ないため、透過が促進されたものと考えられる。グラフト面を透過側に向けた場合には、双方とも透過した。

グルコース添加によるインスリンの透過性発現

Fig. 7に GOD 固定化面を透過側に向け、インスリンの透過しないことを確認後、供給側にグルコースを添加した場合のインスリン透過量の変化を示す。グルコース添加後、徐々にインスリンの透過が確認された。このことは、低分子であるグルコースが膜を透過して GOD と反応し、膜近辺の pH

が低下したことによりグラフト鎖が収縮し孔が開いたためと考えられる。一方、GOD 固定化面を供給側に向け同様の実験を行った結果を Fig. 8 に示す。グルコース添加後、速やかにインスリンの透過が起こった。これは、グルコースと GOD の反応が同一槽内で起こるため、グラフト鎖の収縮が速やかに起こったためである。

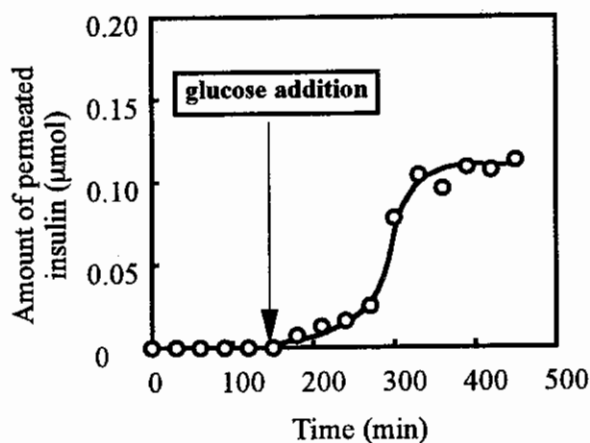


Figure 7 Effect of glucose addition on the insulin permeation through the GOD immobilized ePTFE film of grafted amount of 6.0 mmol/g

Grafted surface : feed side

Glucose addition : permeated side

[結論]

以上より、ウレアーゼ固定化 ePTFE-g-PHEMA 膜は広い温度範囲で酵素活性を保持し、反復使用が可能であることが明らかとなった。また、GOD 固定化 ePTFE-g-PAA 膜は、酵素反応を利用してインスリンの透過制御が可能であることが明らかとなった。

[参考文献]

- 1) J. P. Chen, S. H. Chiu, *Bioprocess Eng.* 21 (1999) 323

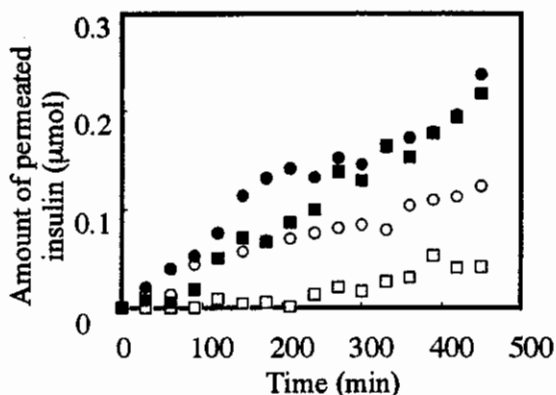


Figure 6 Changes in the insulin permeabilities through ePTFE-g-PAA film of 3.1 mmol/g with time in the phosphate buffer solution adjusted to pH 8.00 (□, ■) and pH 7.35 (○, ●)

Grafted surface: permeated side (shaded)

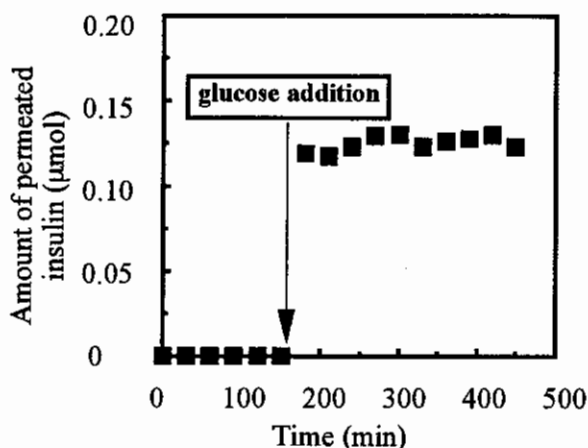


Figure 8 Effect of glucose addition on the insulin permeation through the GOD immobilized ePTFE film of grafted amount of 6.0 mmol/g

Grafted surface : permeated side

Glucose addition : permeated side