<研究論文>

(受理:平成21年1月21日)

合成ポリペプチド設計と生体材料としての応用 (第4報) 水溶性合成ポリペプチド修飾リパーゼによる ポリ(ϵ -カプロラクトン)繊維の酵素分解

林 隆紀*・淀谷 真也**・古田 雅一***・林 壽郎****

要 旨

水溶性合成ポリペプチド担体として、コポリ(L-グルタミン酸/L-アラニン)(EA)による修飾リボ蛋白リパーゼ(LPL)(EA-LPLと略称)を用いたポリ(ϵ -カプロラクトン)(PCL)繊維の酵素分解特性について、酵素分解に伴う繊維の乾燥重量減少率および抗張力低下の度合いを測定することから検討し、未修飾LPLの場合との比較を行った。未修飾LPLによるPCL繊維の分解は当初、繊維表面から進行するが、酵素分解の進行に伴い、繊維の抗張力低下の度合いは重量減少率よりも速やかに進行した。これは、酵素分解の進行に伴い、酵素分子が次第に繊維内部へも侵入することを示唆するものと考えられる。それに対して、EA-LPLの場合には、酵素活性そのものは未修飾LPLに比べて若干低下するが、酵素分解によるPCL繊維の重量減少に伴う抗張力低下の度合いが効果的に抑制され、PCL繊維表面のみでの分解がかなり長期にわたって維持された。これは、水溶性高分子担体の高さと繊維表面層のPCLとの相互作用に基づくものと考えられる。また、PCL繊維の延伸処理により、繊維配向性および結晶性が向上すると、酵素分解速度が顕著に低下することが明らかとなった。

1. 緒 言

酵素は、従来の化学触媒に対して水溶液中で種々の反応が可能となるため、地球環境保全の立場からもその有用性が認められ、今後の需要の増加が期待される。酵素は、合成触媒に比べて多くの長所を持っている反面、短所も少なくない。その最大の欠点は高次構造の不安定性であり、外的要因により容易に失活することが指摘されている。そこで、酵素の安定性を高めるために適当な高分子担体に固定化することが試みられてきた¹⁻⁵⁾。さらに、水媒体中で分子分散した状態を維持しながら種々の触媒反応を進めるため、水溶性高分子担体で酵素を修飾させた水溶性の修飾酵素の設計は極めて有用と考えられる⁶⁻⁸⁾。水溶性の修飾酵

素は、未修飾酵素に比べて大きなより高い酵素活性の低下もなく、熱安定性や保存安定性の飛躍的改善、プロテアーゼ等の自食防止などの効果が得られるだけでなく、取扱いの簡便化、酵素の回収・再利用の可能化などが期待でき、技術改良や省エネルギー化などの環境問題の改善にも大きく寄与する。水溶性の修飾酵素の用途には、酵素による繊維処理加工をはじめ、洗剤・化粧品などにおける添加酵素の安定化、水溶性酵素を用いた診断・治療への医療応用などが期待される。

一方、これまで種々の天然繊維の表面処理をはじめとして、高次機能性繊維材料の開発の分野において酵素が広く用いられてきた。しかしながら、繊維材料の表面処理加工においては、酵素処理による繊維性能の劣化などの問題点が指摘されている⁹⁾。今後ますます酵素利用度が高まる中で適切な改良策が期待されている。われわれは、水溶性高分子による修飾酵素を用いた繊維表面の処理加工の改善を試みた。ここでは、水溶性合成ポリペプチドに共有結合によりリボ蛋白リパーゼ(LPL)を修飾させて得られる修飾LPLによるポリ(ϵ -カプロラクトン)(PCL)繊維の酵素分解挙動を調べ、未修飾LPLの場合との比較検討を行った。

* 佛教大学社会学部公共政策学科

京都市北区紫野北花ノ坊町96 〒603-8301

** 鈴鹿工業高等専門学校生物応用科学科

三重県鈴鹿市白子町 〒510-0294

*** 大阪府立大学理学部生物科学科

堺市中区学園町1-2 〒599-8570

**** 大阪府立大学名誉教授

京都市北区西賀茂南川上町25 〒603-8814 (自宅)

(原稿受付日:平成20年11月18日)

PCLは脂肪族ポリエステルの中でも比較的生分解され易い高分子であり、地球環境調和型の生分解性高分子材料としての有用性が期待されている。

2. 実験

2.1 修飾リポ蛋白リパーゼの調製

従来の共有結合法で高分子担体と酵素を化学結合する場合、一般に酵素の比活性の低下が問題となっている。本研究では、水溶性合成ポリペプチド担体として、コポリ(L-グルタミン酸/L-アラニン)(EA)共重合体を選択した。EAは、一般の水溶性高分子とは異なり、分子骨格鎖が酵素分子と同じペプチド結合であることから酵素反応に対して何らかの良好な効果が期待できる。EAとLPLの共有結合法には、カルボジイミド法と活性エステル法とを組合せてEA-LPLを調製した¹⁹⁾。Fig. 1には酵素修飾反応のスキームを示す。

Fig. 1 Scheme of the modification reaction of lipoprotein lipase (LPL) by copoly (L-glutamic acid/L-alanine) (EA)

リポ蛋白リパーゼ (LPL) は²¹⁾、酵母や動物などに広く存在し、主に動物組織や心臓、骨格筋、乳腺などに分布している。臨床生化学的には、ヘパリン静注後の血漿中の脂質分解酵素とみなされている。本研究で用いた LPL は *Pseudomonas fluorescens* 由来のリパーゼ (EC 3.1.1.3) であり天野製薬 (Amano Pharmaceutical Co., Ltd) から恵贈されたものをそのまま用いた。本研究で採用した水溶性担体 EA は、共重合組成 (E ; 78mol%)、粘度平均分子量が 50,300 の試料であり、LPL 修飾率が 14.0wt% の EA-LPL を用いた¹⁹⁾。

p-ニトロフェニルラウレート (pNPL) 基質を用いて相対活性 (未修飾酵素の活性を 1.00 とした場合の同条件下での活性の比) を測定した結果、本実験に用いた EA-LPL は 0.84 (pH 7.0, 37.0°C) であった。

2.2 ポリ(ε-カプロラクトン) (PCL) 繊維

酵素分解試験に供した PCL 繊維試料はユニチカ (株) より恵贈された。本研究で採用した PCL 繊維の特性を Table 1 に示す²⁰⁾。PCL は融点が約 60°C の比較的結晶性の低い高分子であるが、適切な溶融紡糸を行うことにより、高強度の繊維が得られる。本研究で用いた PCL 繊維は数平均分子量が約 80,000 の PCL (商品名 TONE P-787, Union Carbide Co. 製) をユニチカ (株) が独自の溶融紡糸法により、210°C で製糸されたモノフィラメント (直径 $280 \pm 5 \mu m$) であり、種々の異なる延伸率 (DR) の PCL 繊維が供試された。

Table 1 Physical Properties of PCL Fibers

Draw Ratio	Density (g/cm ³)	Tm (°C)	Degree of Orientation (%)	Crystallinity Index (%)
DR=1 (undrawn)	1.1403	59	0.3368	40.0
DR=7 (drawn)	1.1446	62	0.9768	65.0

2.3 ポリ(ε-カプロラクトン) (PCL) 繊維の酵素分解

本研究では、0.1M PBS (pH 7.0, 25°C) 中に PCL 繊維試料を浸漬し、適当な濃度に調整した未修飾 LPL あるいは EA-LPL 水溶液を加え、緩やかにかきまぜながら PCL 繊維試料の酵素分解を行わせ、それぞれ所定時間毎に繊維試料を取出した後、乾燥重量の減少率 (W_t/W_0) を求めた。ここで、 W_t および W_0 は、それぞれ、酵素分解に伴う PCL 繊維の乾燥重量および初期重量を表す。一方、テンシロン UTM-II-20 型 (東洋ボルドウィン (株)) を用いた単純抗張力測定 ($n=5 \sim 6$) から、抗張力保持率 ($\sigma_{B,t}/\sigma_{B,0}$) を求めた。ここで、 $\sigma_{B,t}$ および $\sigma_{B,0}$ は、それぞれ、所定時間後および初期の破断時抗張力を表す。

Fig. 2 Effect of the storage time in 0.1M-PBS (pH 7.0 and 25°C) on residual activity (A) of p-nitrophenyl laurate (pNPL) hydrolysis at pH 7.0 and 25.0°C: (1) (●) free LPL and (2) (○) EA-LPL

なお、本研究の実験条件 (0.1M PBS; pH 7.0, 25°C) 下での観測時間内で LPL の酵素活性がどのように変化するかを確認するために LPL 酵素活性の経時変化について検討した結果を Fig. 2 に示す。未修飾 LPL の残存活性 (ZA) は時間経過に伴い若干の低下が認められたが、修飾 LPL の場合は測定時間内の酵素活性の実質的な低下は認められなかった。

3. 結果および考察

3.1 LPL による酵素分解の速度論的考察

Fig. 3 および 4 は、PCL 未延伸繊維 (DR=1.0) について、種々の酵素濃度での未修飾 LPL および EA-LPL による酵素分解に伴う繊維乾燥重量の減少率 (W_t/W_0) の経時変化を示す。

本実験系は、LPL 酵素が基質である PCL 繊維の表面に接触することにより分解が始まることが示唆され、従って、分解速度は繊維の表面積に関して一次反応で進行すると考えられる。すなわち、繊維表面積を $[A]$ とすれば、分解速度は (1) 式で与えられる。

$$-d[A]/dt = K[A] \quad (1)$$

ここで、 K は一次反応速度定数である。さらに、繊維長さがその直径に比較して十分長いと考えると、繊維重さ (W) が $[A]^2$ に比例するため、(1) 式に初期条件を入れて積分すれば、近似的に (2) 式が導かれる^{21, 22)}。

$$(W_t/W_0)^{1/2} = 1 - (Kt/r_0d_0) \quad (2)$$

ここで、 r_0 および d_0 は、それぞれ初期繊維半径および密度である。もし、酵素反応が繊維表面で進行するならば、 $(W_t/W_0)^{1/2}$ と t との実験プロットは直線となり、その傾きから K が求められることになる。

Fig. 3 Dry weight ratio (W_t/W_0) of the undrawn PCL fiber as a function of free LPL degradation time (h) at 25°C and pH 7.0: (1) $[E]=0.10$ wt%, (2) $[E]=0.15$ wt%, (3) $[E]=0.20$ wt%, and (4) $[E]=0.25$ wt%

Fig. 4 Dry weight ratio (W_t/W_0) of the undrawn PCL fiber as a function of EA-LPL degradation time (h) at 25°C and pH 7.0: (1) $[E]=0.40$ wt%, (2) $[E]=0.60$ wt%, (3) $[E]=0.80$ wt%, and (4) $[E]=1.00$ wt%

Fig. 3 および 4 で得られた実験結果を (2) 式を用いて、 $(W_t/W_0)^{1/2}$ の時間プロットを行った結果を、それぞれ、Fig. 5 および 6 に示す。いずれの場合も、分解の初期では良好な直線性が示され、分解速度が繊維の表面積に対して一次反応で進行していることが示唆される。

また、PCL 未延伸繊維について LPL による酵素分解の比較的初期段階での挙動を SEM 写真撮影により直接観測した結果、繊維表面は比較的なめらかな状態を維持しながら繊維径のみが減少していくことがすでに報告されており¹⁸⁾、本研究での知見からも、その妥当性が認められる。しかしながら、分解反応後期においては、未修飾 LPL

Fig. 5 $(W_t/W_0)^{1/2}$ of the undrawn PCL fiber as a function of free LPL degradation time (h) at 25°C and pH 7.0 in 0.1 M-PBS: (1) $[E]=0.10$ wt%, (2) $[E]=0.15$ wt%, (3) $[E]=0.20$ wt%, and (4) $[E]=0.25$ wt%

Fig. 6 $(W_t/W_0)^{1/2}$ of the undrawn PCL fiber as a function of EA-LPL degradation time (h) at 25°C and pH 7.0 in 0.1 M-PBS: (1) $[E]=0.40$ wt%, (2) $[E]=0.60$ wt%, (3) $[E]=0.80$ wt%, and (4) $[E]=1.00$ wt%

の場合 (Fig. 5) には、直線性からのズレが出現し、酵素分解速度の低下が示唆される。これは、Fig. 2 に見られるように、未修飾 LPL の酵素活性が次第に低下していくことを反映しているものと考えられる。それに対して、EA-LPL の場合 (Fig. 6) には最後まで直線性を維持していることが示された。

Fig. 7 は、それぞれ、未修飾 LPL および EA-LPL の場合について PCL 未延伸繊維の比較的初期段階における R 値と酵素濃度との相関性を示す。明らかに PCL 繊維の分解速度は酵素濃度に対して、EA-LPL の場合は未修飾

Fig. 7 The rate constant, K , for the enzymatic degradation of the undrawn PCL fibers as a function of the concentration of LPL at 25°C and pH in 0.1 M PBS: (1) (●) free LPL and (2) (○) EA-LPL

3.2 酵素分解に伴う繊維の抗張力低下

酵素による繊維表面処理を行う場合に、繊維重量減少に伴う繊維の抗張力低下をできる限り抑制することが重要である。Fig. 8 および 9 は、PCL 未延伸繊維の場合について、未修飾 LPL および EA-LPL による加水分解に伴う乾燥重量減少率 (W_t/W_0) と抗張力保持率 (σ_{Bt}/σ_{B0}) の経時変化について得られた実験結果の例を示す。未修飾 LPL の場合、基本的には、一般の吸収性合成繊維の非酵素的加水分解に顕著に見られる現象としての重量減少が未だ明らかに見られない期間内に残存抗張力のみが消失して行くような分解機構とは基本的に異なり、重量減少と抗張力低下が同時に進行して行く酵素分解の特性を示している。しかしながら、抗張力保持率 (σ_{Bt}/σ_{B0}) の低下の度合いが重量減少率の場合よりも顕著に進行し、測定値のばらつきも一般に初期に比べて次第に大きくなる傾向を示している (Fig. 8)。これは、酵素分子が次第に繊維内部まで侵入して PCL 繊維分子鎖の切断が進むためと考えられる。他方、EA-LPL の場合 (Fig. 9) は、酵素活性そのものは未修飾の場合に比較して若干の低下は認められるが、繊維重量減少に伴う抗張力低下が顕著に抑制されることが示され、抗張力測定の際のばらつきも比較的小さい状態が保持されている。EA-LPL は、水溶性高分子である EA が PCL 繊維内部への侵入を抑制するために、大半の EA-LPL が

LPL のそれより若干低下しているが、それぞれ一次の相関性を示している。なお、PCL 繊維は酵素が存在しない系では同じ時間内においては実質的な重量および抗張力保持率の低下は全く認められなかった。

Fig. 8 Decrease of (W_r/W_o) and relative tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) for the undrawn PCL fiber degraded in 0.1 M PBS at 25°C and pH 7.0 as a function of free LPL degradation time (h) ($[E]=0.10$ wt%, $\sigma_{B,o}=595$ g)

Fig. 10 Decrease of (W_r/W_o) and ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) for PCL fibers with drawn ratio of DR=7 degraded in 0.1 M PBS at 25°C and pH 7.0 as a function of free LPL degradation time (h) ($[E]=0.10$ wt%, $\sigma_{B,o}=2450$ g)

Fig. 9 Decrease of (W_r/W_o) and ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) for the undrawn PCL fiber degraded in 0.1 M PBS at 25°C and pH 7.0 as a function of EA-LPL degradation time (h) ($[E]=0.40$ wt%, $\sigma_{B,o}=595$ g)

Fig. 11 Decrease of (W_r/W_o) and ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) for PCL fibers with drawn ratio of DR=7 degraded in 0.1 M PBS at 25°C and pH 7.0 as a function of EA-LPL degradation time (h) ($[E]=0.30$ wt%, $\sigma_{B,o}=2850$ g)

PCL 繊維の表面に存在し続けることになり、繊維内部の PCL 分子鎖の切断が比較的起こり難くなるためと考えられる。

さらに、それぞれの LPL による、同一酵素濃度下での延伸試料繊維 (DR=7.0) の酵素分解を検討した。Fig. 10 および 11 は、未修飾 LPL および EA-LPL による酵素分解に伴う (W_r/W_o) および ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) の分解時間依存性に及ぼす繊維の延伸率の影響を調べた結果を示す。PCL 繊維の延伸処理により、とりわけ繊維表面層における繊維配向性および結晶性が向上し、酵素分解速度が顕著に低下するとともに、EA-LPL による酵素分解では、繊維重量減少に伴う抗張力保存性がさらに改善されることが示唆された。

4. 結 論

PCL 繊維は生分解吸収性繊維素材として、LPL により容易に加水分解を受けることが示された。また LPL による PCL 繊維の分解は初期段階では繊維表面近傍で進行することが示されたが、PCL 繊維の分解の進行に伴い、繊維の抗張力保持率 ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) の低下が、未修飾 LPL の場合には繊維重量減少率 (W_r/W_o) よりも速やかに進行することが確認された。これは、酵素分解の進行に伴って、酵素分子が次第に繊維内部へも侵入することにより、繊維内部の高分子鎖切断が進み、繊維強度の低下を促進すると考えられる。それに対して、EA-LPL の場合には PCL 繊維の重量減少に伴う抗張力保持率の低下が抑制され、PCL

繊維表面からの分解がより長期にわたって維持されながら進行することが示唆された。

以上の結果から、水溶性高分子固定化酵素は酵素安定性を改良する²³⁾だけでなく、繊維材料の酵素による表面処理加工などにおいて、繊維性能劣化を抑制できる有効な手段となることが明らかとなった。

引用文献

- 1) R. Axen, "Insoluble Enzymes", (Eds. M. Salmons, C. Soronio, and S. Garattini), *Raven Press*, New York, p. 9 (1974)
- 2) E. K. Katchalski, "Enzyme Engineering", (Eds. H. H. Weetall and G. P. Royer), *Plenum Press*, New York, p. 12 (1982)
- 3) T. Hayashi, *Die Makromol. Chem.*, **70/71**, 139 (1993)
- 4) H. Seo, K. Itoyama, K. Morimoto, T. Takagishi, M. Oka, and T. Hayashi, *Eur. Polym. J.*, **34**, 917 (1998)
- 5) S. Yodoya, T. Takagi, M. Kurotani, T. Hayashi, M. Furuta, M. Oka, and T. Hayashi, *Eur. Polym. J.*, **39**, 173 (2003)
- 6) C. Dinnella, et al, *Macro. Rapid Commun.*, **15**, 909 (1994)
- 7) M. Fujimura, et al, *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 747 (1987)
- 8) I. Fuke, T. Hayashi, Y. Tabata, and Y. Ikada, *J. Control Release*, **30**, 27 (1994)
- 9) A. C. Paulo, et al, *Textile Res. J.*, **66**, 287 (1996)
- 10) Y. Tokiwa, T. Ando, and T. Suzuki, *J. Ferment. Technol.*, **54**, 603 (1976)
- 11) Y. Tokiwa and T. Suzuki, *Nature*, **270**, 76 (1977)
- 12) W. J. Cook, J. A. Cameron, J. P. Bell, and S. J. Huang, *J. Polym. Sci., Polym. Lett., Ed.*, **19**, 159 (1981)
- 13) M. Mochizuki and M. Hirami, "Polymers and Other Advanced Materials", P.N. Prasad, Eds., *Plenum Press*, New York, p. 589 (1995)
- 14) C.A. Pettigrew, et al, *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, **A32**, 811 (1995)
- 15) A. C. Albertsson, R. Renstad, B. Erlandsson, C. Eldsater, and S. J. Karlsson, et al, *J. Appl. Polym. Sci.*, **70**, 61 (1998)
- 16) M. Mochizuki, K. Nakayama, T. Hayashi, and T. Hasuda, *Pure & Appl. Chem.*, **71**, 2177 (1999)
- 17) C. Eldsater, B. Erlandsson, R. Renstad, A. C. Albertsson, and S. Karlsson, *Polymer*, **41**, 1297 (2000)
- 18) T. Hayashi, M. Kanai, M. Furuta, M. Oka, T. Hayashi, *Polym. J.*, **33**(1), 38 (2001)
- 19) 林 隆紀, 淀谷真也, 古田雅一, 林 壽郎, 日本接着学会誌 (投稿中)
- 20) M. Mochizuki, K. Nakayama, R. Qian, B-Z. Jiang, M. Hirami, T. Hayashi, T. Masuda, and A. Nakajima, *Pure & Appl. Chem.*, **69**, 2567 (1997)
- 21) T. Hayashi and Y. Ikada, *Biomaterials*, **11**, 409 (1990)
- 22) T. Okada, T. Hayashi, and Y. Ikada, *Biomaterials*, **13**, 448 (1992)
- 23) 松浦 明, 林 隆紀, 古田雅一, 林 壽郎, 荒井基夫, *生体材料*, **19**(2), 55 (2001)

<Original Paper>

Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) Fibers by Lipoprotein Lipase Modified with a Water-soluble Polypeptide

Takanori HAYASHI*, Shinya YODOYA**, Masakazu FURUTA*** and Toshio HAYASHI****

* Department of Public Policy, School of Sociology, Bukkyo University
96 Kitahananobo-cho, Murasakino, Kita-ku, Kyoto 603-8301, JAPAN

** Department of Chemistry and Biochemistry, Suzuka National College of Technology
Shirako, Suzuka, Mie 510-0294, JAPAN

*** Department of Biological Science, Osaka Prefecture University
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai-shi, Osaka 599-8570, JAPAN

**** Emeritus Professor of Osaka Prefecture University
25 Nishigamo Minamikawakami-cho, Kita-ku, Kyoto 606-8814, JAPAN

(Accepted for publication : January 21, 2009)

Abstract

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) fibers were degraded by lipoprotein lipase (LPL) modified with copoly (L-glutamic acid/L-alanine) (EA) *in vitro*. The degradation of PCL fibers by EA-modified LPL (EA-LPL) was assessed by the weight loss, mechanical properties loss such as tensile strength and ultimate elongation decrease. The results were compared with those obtained with free LPL. The degradation kinetics on the weight loss of PCL fibers suggested that the degradation of PCL fibers gradually proceeded from the surface of fibers into their core. The weight loss of PCL fibers in the course of EA-LPL digestion took place almost in parallel with the strength loss of PCL fibers, while the strength loss took place at a higher rate than the weight loss of PCL fibers in the course of free LPL digestion. The degradation of PCL fibers was found to depend on the draw ratio and crystallinity of PCL fibers.

Key words : Poly(ϵ -caprolactone) fiber/copoly(L-glutamic acid/L-alanine)/Enzymatic Degradation/a water-soluble polypeptide modified LPL/Weight loss/Mechanical Properties/

(Received : November 18, 2008)