特集

繊維科学の未来を切り開く新展開

バイオ技術の繊維への新展開

林 壽 郎

最近、地球環境問題等で注目されている、酵素を利用した繊維表面処理法について概説する。特に安定性、回収等の酵素自身の課題改善のための水溶性高分子修飾技術に関する研究について紹介する。

1. はじめに

種々の天然繊維の表面処理をはじめ、高次機能性繊維材料の開発、あるいはバイオリアクターの分野などにおいて生体触媒である酵素が広く用いられてきた(図1, 表1)¹⁻³⁾。酵素は有機溶媒を必要とせず、深刻な地球環境問題を起こさないため、今後ますます大量使用が予想される。しかし、酵素による繊維材料の表面処理加工では、繊維性能の劣化だけでな

く、酵素自身の安定性や回収などの問題点が指摘され、より適切な改良策が緊急に必要である。筆者らも、これまでにセルラーゼによるセルロース系繊維材料の表面処理法を改善するために適当な水溶性高分子によりセルラーゼ酵素を修飾し、その効果について検討を進めてきた^{4,5)}。繊維材料の表面処理をはじめ、洗剤や化粧品分野における酵素利用が拡大する中で、水溶性を維持し高い酵素活性と耐熱性や保存安定性を高めるために酵素を種々の水溶性高分子で修飾することは極めて有効な手段と考えられる。ここでは、基本的なモデルとして、パパイニンやリポ蛋白リパーゼなどの汎用ヒドロラーゼを選び、化学結合による水溶性高分子修飾酵素を調製し、担体高分子素材や反応条件が修飾酵素の酵素活性、耐熱性や保存安定性にどのような影響を及ぼすかについて検討した結果についてまとめる^{6,7)}。

図1 酵素による繊維の機能化

表1 酵素による新しい繊維加工

酵 素 名	目 的	繊 維 加 工 技 術	繊維加工以外の用途
セルラーゼ	繊維素分解	セルロースの改質、ジーンズの洗い、捺染糊落とし	合成洗剤、医薬、飼料、紙パルプ
アミラーゼ	澱粉分解	糊抜き	医薬、澱粉加工
プロテアーゼ	タンパク分解	絹の精練、羊毛の改質	合成洗剤、医薬、食品
リパーゼ	油脂分解	原毛の精練	医薬、工業用、厨房浄化
カタラーゼ	H ₂ O ₂ 分解	残留H ₂ O ₂ 除去	食品、電子工業

Applications of Biotechnology in Textile Industry, HAYASHI Toshiro, 大阪府立大学先端科学研究所, Research Institute for Advance and Technology, Osaka Prefecture University

2. 水溶性高分子による酵素修飾

2.1 修飾酵素の有用性

酵素は広範な分野において、従来の化学触媒に代わる生体触媒として、製造・加工工業などでの需要の増大が期待される。これまですでに、500種類を超える酵素が市販されているが、今後さらに多くの酵素が上市されると思われる。これまでに、酵素の有効性を高めるための種々の技術導入が検討されてきたが、その中で水溶性高分子修飾酵素は1つの有力な手段となる。水溶性高分子修飾酵素は大略以下のような効果が期待される。

- ① 酵素活性の改善＝より高い酵素活性の維持、環境依存性の改良など
- ② 酵素安定性の向上＝熱安定性、保存安定性、プロテアーゼなどの自食防止
- ③ 取扱い条件の改善＝取り扱いの簡便化、酵素の回収・再利用の可能化など
- ④ 基質側での有用性＝従来の酵素処理反応の中で生じる材料側での問題点の解決

一方、これらの効果を実現するために、どのような素材・反応条件が最適であるかなどについての技術的な情報は意外に少ない。これらが明らかになれば、酵素による繊維処理加工法の改善、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・治療への医療応用への展開、その他広範な分野での応用面が大きく展開するであろう。

2.2 水溶性高分子担体

酵素修飾に適用される水溶性高分子としては非常に多くのものが挙げられるが、それらの代表的なものを表2にまとめた。水溶性高分子素材には、アニ

オン性、ノニオン性、カチオン性および両性に分類されるが、それぞれ目的とする応用分野によって最適の素材が選択できる。本研究では、その中から、アニオン性高分子素材として、メチルビニルエーテル/マレイン酸無水物共重合体 [MAMEC]、カルボキシメチルセルロース [CMC] を、ノニオン性素材として、ポリグリコシロキシエチルメタクリレート [PGEMA]、GEMA-アクリルアミド共重合体 [GEMA-AA] を、そしてカチオン性素材として部分アセチル化キトサン [PAC] を、それぞれ選択し、化学結合法による汎用ヒドロラーゼ酵素の修飾を試みた。

2.3 化学結合による酵素の修飾

一般に共有結合により高分子素材を酵素に結合させると酵素の比活性を低下させる。そこで共有結合法による酵素修飾においても、まず最初に酵素比活性を大きく低下させない反応系を探索することが重要課題となる。多くの場合、酵素分子のアミノ基と高分子担体の官能基とを反応させるが、担体の官能基の種類によってそれぞれ最適の手法が採用されることになる(表3)。

水溶性高分子による酵素修飾反応で最大の技術的問題は、修飾酵素をいかにして未反応の高分子担体および未修飾酵素から分離するかである。図2は、

表3 共有結合法による酵素固定の例

共有結合反応の種類	基質官能基
(1) シッフ塩基結合法	-NH ₂
(2) ジアゾニウムカップリング法	-NH ₂
(3) 臭化シアン活性化結合法	-OH
(4) イソシアナート誘導体への結合法	-NH ₂
(5) イソチオシアナート誘導体への結合法	-NH ₂
(6) カルボジイミド系による結合法	-NH ₂ -COOH
(7) トリアジニル誘導体への結合法	-OH
(8) ハロゲンアセチル誘導体への結合法	-OCOCH ₂ Br
(9) 酸アジド誘導体への結合法	-COOH
(9) カルボキシクロリド誘導体への結合法	-COOH

表2 水溶性高分子担体

種類	水溶性高分子の例	修飾反応の種類
アニオン性	MAMEC CMC ポリアクリル酸 ポリグルタミン酸	カルボジイミド法 酸アジド法 酸無水物法 カルボキシハライド法
ノニオン性	PEG HES デキストラン PGEMA PVA	CNBr法 ジイソシアナート法 トリアジニル法
カチオン性	キトサン ポリアミン ポリリシン	イソシアナート法 シッフ塩基結合法 カルボジイミド法
両性	コポリ(リシン/グルタミン酸) ゼラチン 各種電解質コポリマー

図2 水溶性高分子修飾酵素の基本操作例

反応後の分離法の一例として「ゲル濾過法」を適用した反応スキームを示す。実験段階ではこの手法である程度目的を果たすことが可能であるが実用化段階では極めて効率が悪い。実用面からは、化学反応の手法も含めてあまり手間のかからない手法を確立する必要がある。そこで、化学反応の後には適当な洗浄法あるいは限外濾過法などで残余触媒などの不都合な低分子化合物のみを分離除去し、未反応の水溶性高分子素材や未反応酵素はそのまま共存させた系で利用することも考えられる。この問題については後節でも検討する。

表 4 水溶性高分子修飾酵素の相対活性

修飾酵素	高分子担体 平均分子量	酵素 (wt-%)	基質 反応条件	相対活性 (RA)	
				PBS	PECF
free LPL	—	—	pNPL, pH5.60, 37°C	1.00	1.00
MAMEC-LPL-1	20,000	4.8	"	0.68	"
CMC-LPL-1	350,000	5.5	"	0.80	0.85
PGEMA-LPL-1	840,000	4.8	"	0.92	0.98
PGEMA-LPL-2	30,000	5.2	"	1.15	1.30
PGEMA-AA-LPL ^{a)}		8.0	"	0.98	"
PGEMA-AA-LPL ^{b)}		7.8	"	1.12	"
PGEMA-AA-LPL ^{c)}		8.9	"	1.05	"
PAC-LPL-1		6.6	"	0.78	"
free Pap	—	—	BAEE, pH7.40, 37°C	1.00	1.00
MAMEC-Pap-1	20,000	5.8	"	0.78	"
CMC-Pap-1	350,000	4.7	"	0.82	0.92
PGEMA-Pap-1	840,000	5.2	"	0.98	1.02
PGEMA-Pap-2	30,000	6.8	"	1.18	1.28
PGEMA-AA-Pap ^{a)}		7.0	"	1.05	"
PGEMA-AA-Pap ^{b)}		6.8	"	1.15	"
PGEMA-AA-Pap ^{c)}		6.5	"	1.07	"
PAC-Pap-1		6.9	"	0.86	"

a) GEMA (32.3mol%) ; b) GEMA (17.8mol%) ; c) GEMA (4.7mol%)

図 3 p-ニトロラウレート (pNPL) 基質加水分解相対活性 (RA) の pH 依存性: (1)非修飾 LPL, (2) PGEMA-LPL-2, (3)CMC-LPL-1 [37°C, PECF]

3. 水溶性高分子修飾酵素の特性変化

3.1 酵素活性の変化

本研究で調製された修飾酵素の比活性を測定した結果を表 4 にまとめる。ここでは、未修飾酵素の比活性を1.00とした場合の相対活性 (RA) で表示した。PGEMA 系修飾酵素は、他の高分子担体系に比べて大きな RA 値が得られた⁸⁾。PGEMA 系修飾酵素の RA 値が 1 以上となる理由は不明であるが、PGEMA の側鎖の糖成分が酵素に対して何らかの有為な効果を及ぼすためと考えられる。次に修飾酵素の比活性の pH 依存性を評価した実験結果例を図 3 に示す。未反応酵素に比べ、PGEMA 修飾酵素では広い pH 領域にわたって高い RA 値が得られた。一方、CMC 修飾酵素も糖鎖からなる担体であるにもかかわらず一般に RA 値が低く、単に糖鎖を持つというだけで RA 値が大きくなるのではないことが示唆された。

3.2 修飾酵素の安定性

酵素の有効利用の面から、如何に種々の環境下で長期間にわたってその酵素活性が維持されるかを調べることは重要である。PGEMA 修飾 LPL の場合の熱安定性について、未修飾酵素の場合と比較した結果例を図 4 に示す。実験条件としては、それぞれの条件下での PBS 溶液を所定の温度で 1 時間保持した後、37°C における残存活性 (ZA) を測定した。その結果、PGEMA 修飾酵素では未修飾酵素に比べて約10°C程温度安定性が高まった。この特性は実用

図 4 所定温度 (Tp) で酵素水溶液 (PECF) を一時間保持した後の pNPL 加水分解残存活性 (ZA) [pH5.60]: (1)非修飾 LPL, (2)PGEMA-LPL-2

図5 37.0℃で酵素水溶液 (PECF) を所定時間保持した後の pNPL 加水分解残存性 (ZA) [pH5.60] : (1)非修飾 LPL, (2)PGE-LPL-2

的な観点からも有用である。

次に、酵素水溶液 (37℃) の状態で長時間保持させた場合に、酵素活性がどの程度残存するかを調べた結果例を図5に示す。未修飾 LPL では、約60時間後に残存活性が完全に消失するのに対して、PGEMA 修飾酵素では150時間以上にわたって高い残存活性が維持された。未修飾酵素が残存活性を完全に消失する60時間の間に、修飾酵素の残存活性も有為な低下傾向を示し、それ以後は残存活性の低下がほとんど見られなかった。このことは、修飾酵素の分離操作が不十分なため、ある程度の量の未修飾酵素が修飾酵素中に混在し、その成分がはじめの60時間の間に活性消失したためと推定される。そこで、実用化の見地から修飾反応後のゲル濾過法による分離操作を省略して、かなりの量の未修飾酵素が修飾酵素と共存させた系で同様の実験を行った。その結果、はじめの60時間の間に大きな残存活

性の低下を示した後、それ以上の時間域では残存活性がほとんど低下しないという結果が得られ、この推定の妥当性が示された。

4. 修飾酵素による繊維処理加工法の改善

4.1 セルロース系繊維の酵素処理

我々は、これまでに綿、ビスコースレーヨン、キュプラ、アセテートなどの綿セルロース系繊維へのセルラーゼ酵素処理の特性について種々の検討を行ってきた⁹⁾。セルロース系繊維表面のセルラーゼ処理加工において、従来の酵素処理法では繊維内部にまで酵素が侵入することによる著しい繊維強伸度低下が指摘されていた。そこで、水溶性高分子修飾セルラーゼを調製し、高分子担体の繊維表面への親和性を利用して修飾酵素を繊維表面に偏在化させ、繊維内部への酵素侵入を抑制し、繊維強伸度を可能な限り維持させつつ、繊維表面から優先的に酵素による減量加工を遂行することを試みた。図6は、MAMEC 修飾セルラーゼと未修飾酵素の場合について綿糸の減量率と強度保持率との相関性を比較検討した結果例を示す。予想した通り、修飾酵素による処理綿糸の強度低下は未修飾酵素の場合よりも抑制されたが、その効果は必ずしも顕著ではなく今後のより詳細な検討が必要である。

一方、修飾セルラーゼについて興味深い特性も見出された。本実験で用いられた酵素はトリコデルマ系セルラーゼ (洛東化成工業：エンチロン40L) であり、アビセル基質に対するアビセラゼ活性の評

図6 酵素処理が40/2^sの精練綿糸強度に及ぼす影響

図7 ほう酸調整系でのアビセラーゼ相対活性

価では、硼酸調整系で pH7 付近において修飾セルラーゼの相対活性が未修飾セルラーゼに対し極めて大きな値が得られた (図7). すなわち、pH7 でのアビセラーゼ相対活性が、未修飾酵素では30%程度であるのに対して修飾酵素の場合は80%程度の値が得られた。その理由は未だ明確ではないが、硼酸と修飾酵素とアビセル基質が何らかの相互作用をもつためと推定される。

今後、バイオテクノロジーのあらゆる面での大きな伸展が期待される中で、生体触媒としての酵素の有用性がますます増大するであろう。その意味で、酵素の高次機能化、安定性の改良は非常に重要な課題となる。水溶性高分子修飾酵素という概念もさらに大きく展開して行く必要があろう。

4.2 タンパク質系繊維の酵素処理

21世紀は地球環境問題からも天然繊維素材の新たな展開が期待される。しかし、これまでに発展してきた繊維工業技術の集積を活用することにより、従来とは異なる高性能・高機能化天然繊維を創製するものでなければならない。これまでに羊毛をはじめとするタンパク質系繊維の酵素加工処理技術の実用化を目指した研究が進められてきた。その一例として、大阪府産学官協同研究事業「新規酵素の創製と繊維素材の改良」では、羊毛繊維表面のスケールのみを分解する酵素を産生する微生物を土壌中から見出し、羊毛繊維の強度を低下させずに羊毛の機能化加工を可能とする新規酵素を創製した報告は興味深い。さらに、その酵素を用いて羊毛生地 of 風合いを改良し、防縮性を高める酵素加工の実用化研究も報告されている¹⁰⁾。

図8 海水 (平均水温23℃) 中における PCL 未延伸糸の相対強度劣化 ($\sigma_{B,t}/\sigma_{B,0}$) (○) と重量減少 (W_t/W_0) (○) の浸漬時間依存性

4.3 繊維廃材の生分解処理

脂肪族ポリエステル of 1つであるポリカプロラクトン (PCL) が、土中菌や水中菌によって加水分解を受けることが明らかにされ、PCL を分解する細菌群およびそれらの精製酵素の研究が進められている¹¹⁾。一方、種々のリパーゼによる PCL 繊維の酵素分解挙動についても検討された¹²⁾。図8は、海水中での PCL 繊維の分解挙動例を示す。PCL は環境調和型の新しい生分解性繊維としての有用性が期待できる。

5. 繊維バイオリアクターへの応用

近年、バイオテクノロジーの急速な発展とともに、繊維素材を担体とする酵素などの生体触媒の固定化に関する研究が活発に展開され、バイオリアクターをはじめ、蛋白質や細胞の分割デバイスの設計による実用化研究が進められている¹³⁾。バイオリアクターによる有用物質の生産、エネルギーの発生、種々の物質の分析・定量、医療、環境汚染物質の処理などの応用が期待される。繊維素材は、軽量、高強度、大きな表面積を素材表面に多量の生体触媒を効率よく固定化でき、しかも反応系に接触し易いため、反応効率を最大限まで高められる。生体触媒の固定化法には、繊維状包括、繊維表面吸着、繊維表面結合、および中空糸による分離固定法などがある。紙面の都合で詳細は述べないが、バイオ技術への繊維素材の役割りは極めて大きく、バイオリアクター用担体として既存の繊維加工技術を活用するだけでなく、新しい高次な機能性を備えた繊維素材を全く独自に分子設計することも必要であろう。

参考文献

- 1) 福井三郎 (監); 「バイオリアクター」, 講談社サイエンティフィク, 講談社, (1995)
- 2) 千畑一郎 (編); 「固定化生体触媒」, 講談社サイエンティフィク, 講談社, (1986)
- 3) 本宮達也; 「ニュー繊維の世界」, 日刊工業新聞社, (1998)
- 4) J. Sugai, et al; Proc. Intern. Sympo. Fiber Sci. Tech., ISF-94, p. 92 (1994)
- 5) 菅井実夫ら; 平成8年度繊維学会年次大会要旨集, 1F-03 (1996)
- 6) 林 壽郎ら; 第44回高分子討論会要旨集, p. 2184 (1995)
- 7) 木村雅和ら; 第43回高分子研究発表会要旨集, p. 120 (1997)
- 8) 林 壽郎ら; 第9回バイオテクノロジーシンポジウム要旨集, S-38 (1994)
- 9) 菅井実夫ら; 平成9年度繊維学会秋季大会要旨集, C-9 (1997)
- 10) 高塚 正ら; 産業技術総合研究所報告, p. 64 (1996)
- 11) 林 壽郎ら; 第8回バイオテクノロジーシンポジウム要旨集, B-28 (1993)
- 12) 林 壽郎ら; 第42回高分子年次大会要旨集, p. 212 (1993)
- 13) 森川訓行ら; 生体材料, 14, 211 (1996)

林 壽郎 (はやし としお)

昭和42年京都大学大学院工学研究科修士課程修了, 同43年京都大学助手任官, 同大学助教授を経て, 平成6年大阪府立大学附属研究所教授を経て, 同大学先端科学研究所教授, 評議員として現在に至る。専門は生体材料設計学, 生分解性高分子合成, 医療用粘着・接着剤, 固定化酵素の研究。(大阪府立大学先端科学研究所, 〒599-8570 堺市学園町1-2, TEL. 0722-54-9842, FAX. 0722-54-9935)

コ ラ ム

今年の夏は「快適シャツ」が大流行(?)

地球温暖化京都会議を政府が提唱している「冷房28℃」という適正室内温度にちなんだ企画が相次いで発表された(日清紡・帝人/エコシス28℃, 織研新聞98.11.25, 東洋紡/快適シャツ, 日本繊維新聞98.12.11)。

これらは冷房設定が28℃でも快適に過ごせるドレスシャツであり, 省エネルギー・省資源にも貢献できることをアピールするものである。共鳴する人が多ければヒット商品間違いなしだが, さてどうなるか。

これまで冷房は25℃くらいに設定しているところが多いように思う。外から部屋に入って涼しいと感じるのは24℃より低い温度であるが30分から1時間もいると長袖がほしくなってしまう。27℃では外から入ったとき冷房が効いていないと思われてしまう。設定温度の1℃の違いは省エネルギーの面からも大きな違いがあるが, 体感の面からもハッキリとわかる。会員の皆様には繊維業界活性化と省エネルギーに貢献するために「快適シャツ」を購入していただきたいものである。

(H)