



@ High School

富山県立富山中部高等学校スーパーサイエンス部
瀬口 楓, 松森友宏, 春若純菜 (指導教諭: 浮田直美)

ナタマメ粉末のウレアーゼ活性 高い酵素活性をもつ種子粉末の活用性を探る

本研究は日本農芸化学会2019年度大会(開催地:東京農業大学)での「ジュニア農芸化学会」において発表されたものである。ウレアーゼとは尿素を二酸化炭素とアンモニアに加水分解する、微生物や植物に広く存在する酵素である。ウレアーゼはナタマメに豊富に存在することが知られている酵素で、アンモニア産生などのバイオリクター装置に利用できる反応素子として大きく期待されている。本研究は尿素を用いたバイオリクター装置に使用可能で、安定かつ活性の高いウレアーゼの酵素反応条件の詳細な検討を行い、さらにこれまで広く用いられているナタマメ以外のマメ科植物由来ウレアーゼの利用の可能性を検証しており、学会から高く評価された。



本研究の目的・方法・結果および考察

【目的】

ウレアーゼは尿素をアンモニアと二酸化炭素に分解する酵素で、1926年にSumnerによってJack bean(ナタマメ)から初めて結晶化された、活性中心にニッケルを含む分子量約48万のタンパク質である⁽¹⁾。近年では、アンモニアを燃料とした燃料電池システム^(2,3)や、発生する二酸化炭素をカルシウムイオンと反応させて土の強度増加を図る研究⁽⁴⁾が行われており、バイオリクターで用いることのできる反応素子としてウレアーゼの活用が注目されている。

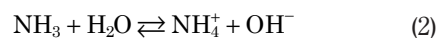
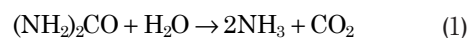
純度の高いウレアーゼを精製するには多くの工程が必要であるが⁽⁵⁾、粉末化したナタマメ種子に含まれるウレアーゼ活性が長期にわたって維持されるのであれば、簡単に調整可能な粉末化ナタマメ種子をウレアーゼ供給体として利用可能であると考えた。われわれはナタマメ種子のウレアーゼ活性が、pHや塩の添加によって失活す

るかどうかどうかを、希硫酸による反応停止と逆滴定により測定する方法により詳しく調べ、ナタマメ種子のウレアーゼ活性が長期にわたり保たれる条件を見いだした。また、ほかのマメ科種子でウレアーゼ活性が高いものを探した。

【方法】

[ウレアーゼ活性有無の判定方法]

フェノールフタレイン溶液を加えた尿素水溶液にマメ科種子の粉末を加えて、溶液が赤色に呈色した場合(塩基性になった場合)を活性ありとした。



[NH_4^+ の $\text{p}K_a$ は9.24; H_2CO_3 の $\text{p}K_a$ は6.35 (25°C)⁽⁶⁾]

[種子を粉末にする方法]

マメ科種子をキムタオルに包み、ハンマーでたたいて砕き、さらにセラミックミル(京セラ社製:スパイス用)で粉末化した。

(実験1) 白ナタマメ種子のウレアーゼ活性とpH

以下の操作を施した白ナタマメ種子の活性を調べた。

- ・表1上: 種子を異なるpHの水溶液に一週間浸けて、表面を水で洗浄後細かく砕き、さらに多量の水で洗浄して乾燥させ、乳鉢ですりつぶした。
- ・表1下: 種子粉末を異なるpHの水溶液にしばらく浸けてから、ろ紙を用いてろ過後、水で数回洗浄(ろ液が中性でなかった場合は中性になるまで洗浄)。
なお、ろ紙を用いて種子粉末を水で洗浄すると、ウレアーゼはろ液に流出するが、12回洗浄した後もろ紙上

表1 ■ pHの異なる水溶液に浸けた白ナタマメ種子の酵素活性

◎ 種子そのままを1週間漬ける ⇒ 表面、内部を多量の水で洗う⇒ すりつぶす

水溶液	飽和 NaCl aq (5.5 mol/L)	NaCl aq (0.51 mol/L)	クエン酸水溶液 (1.0 mol/L)	Na ₂ CO ₃ aq (1.0 mol/L)
液性	中性	中性	酸性	塩基性
pH	7	7	1.3	12
活性	有	有	無(失活)	有

◎ 粉末にした種子をそれぞれの水溶液に浸す

水溶液	H ₂ SO ₄ aq (0.045 mol/L)	Na ₂ SO ₄ aq (0.023 mol/L)	HCl aq (1.0 mol/L)	CH ₃ COOH aq (0.1mol/L)	HCl aq + NaOH aq 途中まで中和
液性	酸性	中性	酸性	酸性	弱酸性
pH	約1	7	0	約3	4
活性	無(失活)	有	無(失活)	無(失活)	有

の種子粉末の酵素活性は高かったため、この方法で活性の有無が判定できると考えた。

(実験2) 逆滴定法によるアンモニア生成量の算出

次の①～③の白ナタマメ種子試料をそれぞれ用いて、温度や濃度を変えて実験した。

- ①水とともにすりつぶした「大根おろし状」のナタマメ種子0.3g, 35°C, 尿素水溶液0.17mol/L 3.0mL
- ②ナタマメ粉末0.06g, 5°C, 尿素水溶液0.017mol/L 3.0mL (低温・低基質濃度)
- ③ナタマメ粉末0.001gを含む0.10g混合粉末※, 22°C (常温), 尿素水溶液0.17mol/L 3.0mL ※ごく微量の酵素を使用するために、生分解性プラスチックのポリブチレンサクシネート粉末を混ぜて約100倍に希釈

①～③の各条件の溶液をそれぞれ複数個用意し、一定時間ごとに希硫酸を加えて反応を停止し、NaOH水溶液で逆滴定してNH₃生成速度を求めた。

(実験3) ナタマメ由来のウレアーゼの熱安定性

白ナタマメ粉末と、生化学用ウレアーゼ(ナタ豆由来ウレアーゼ:富士フィルム和光純薬)を加熱もしくは冷却後に、ウレアーゼ活性の有無を調べた。

○白ナタマメ種子:(a)～(d)は粉末状

- (a) 100°Cで1時間～4時間35分, 乾燥器内で加熱
- (b) -196°Cの液体窒素の中で5分間冷却
- (c) フライパンで1分30秒炒った
- (d) 沸騰水中で1時間煮てろ過

(d-1) ろ液

(d-2) ろ紙に残ったもの

- (e) 水とともにすりつぶした「大根おろし状」のナタマメ種子を冷蔵庫(5°C)や冷凍庫(-20°C)で保存
- (f) 種子のまま水に浸けて、1年間冷蔵庫(5°C)で保存

○生化学用ウレアーゼ

(A) 100°Cで1～4時間35分, 乾燥器内で加熱

(B) -196°Cの液体窒素の中で5分間冷却

(実験4) ナタマメ粉末の利用に向けた実験

近年、アンモニアを直接燃料とした燃料電池による発電研究が進められている⁽³⁾。この発電では、窒素と水のみが生成し、有害物質や二酸化炭素を排出しない。そこで、尿素溶液とウレアーゼを混合して生成するアンモニアを効率良く利用できないかと考えた。

水に溶解しやすいアンモニアを気体として多量に発生させること、アンモニアと同時に発生する二酸化炭素を含まないようにすることを目指して、陽イオン交換膜を用いた装置(図1(A))を用いて、以下の①～③の手順で実験を行った。

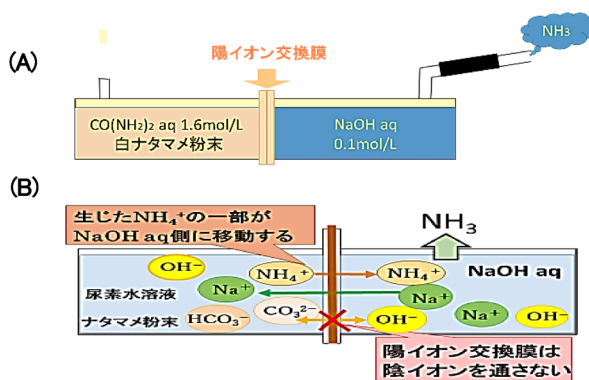


図1 ■ (A): アンモニア発生装置 (B): イオンの移動の模式図

①ダニエル・ボルタ電池装置(ケニス社)の中央に陽イオン交換膜を挟み、仕切られた片側に0.1mol/L NaOH水溶液を入れる

②逆側に白ナタマメ粉末と1.6mol/L尿素溶液を入れる

③NaOH側から気体のNH₃が発生したかどうかを、湿らせた赤色リトマス紙, pH試験紙, 臭いで確かめた。

(実験5) ナタマメの栽培と成長過程での種子の酵素活性

本校の屋上で、植木鉢やプランターに白ナタマメと赤ナタマメの種子を園芸培養土に植えて、施肥せずに水だけ与えて育てた。莢の中で結実していく過程での、種子のウレアーゼ活性を調べた。

(実験6) マメ科植物種子のウレアーゼ活性

ナタマメ以外の身近なマメ科植物種子にもウレアーゼ活性があるかどうか調べた。

【結果と考察】

(実験1) 表1に示したようにpH 3以下の強酸性下でウレアーゼは失活した。高濃度のNaCl水溶液に長期間浸けても失活しなかったため、pHの低下がウレアーゼ

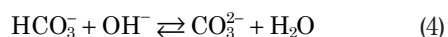
の変性の大きな要因であるとわかった。

(実験2) ①では1分間に 2.5×10^{-4} molのアンモニアが発生した。②の低温、低基質濃度では反応開始30秒後には尿素の1/10が分解された。③では20分で尿素の1/10が分解された。マメ粉末1g、1分間あたり発生するアンモニア量に換算すると、②は 3×10^{-4} mol、③は 5×10^{-3} molとなり、極微量のマメ粉末で反応が進むことがわかった。

(実験3) 水で煮た(d)は酵素活性が見られなかった。低温の水に浸した(e), (f)は長期間酵素活性があったので、高温になると水中でウレアーゼの高次構造が変化して、熱変性が進むと考えられる。一方、乾燥粉末状の(a), (b), (c)はいずれも酵素活性があったので、乾燥状態では高い温度でも熱変性は進みにくいと考えられる。数カ月間、サンプル瓶に常温で保存していたナタマメ粉末も高い活性があり、乾燥粉末は常温で長期保存ができることがわかった。また、純度の高い生化学用ウレアーゼ(A)(B)も酵素活性は高いままだった。これらの結果から、 100°C でも水分がなければ、ウレアーゼは熱変性ににくい安定な酵素であることがわかった。

(実験4) 赤色リトマス紙は青色に変化し、pH試験紙はpH 10を示し、明らかなアンモニア臭があった。

アンモニアの溶解によって溶液が塩基性に変化していくと、生じた CO_2 は HCO_3^- や CO_3^{2-} になる。



陽イオン交換膜を半透膜として用いたのは、 NH_4^+ は陽イオン交換膜を通して反対側のNaOH水溶液中で気体の NH_3 として発生し、 HCO_3^- や CO_3^{2-} は膜を通れないため(図1(B))、 CO_2 成分と分離できると考えたからである。イオンでない CO_2 分子は膜を通過する可能性があるため、純粋な NH_3 ガスを回収するには、発生した NH_3 に対してソーダ石灰を用いることにより、 CO_2 と水の除去ができると考えられた。

(実験5) 校舎屋上の施肥しないプランターで栽培したが、ナタマメは結実するまで成長した。マメ科植物は根粒菌と共生するので、肥料は少なく済む。ナタマメは夏の暑さに強く、水を十分に与えていれば結実する栽培しやすいマメであることがわかった。

マメ科種子は無胚乳種子であり、発芽したナタマメの子葉にはウレアーゼ活性は残っていたが、落下した子葉には酵素活性はなかった。成長して開花した後、莢の中

表2 ■ マメ科植物種子の粉末のウレアーゼ活性

	白ナタマメ	赤ナタマメ	黄大豆	黒大豆	青大豆	ツルマメ
属	ナタマメ属	ナタマメ属	ダイズ属	ダイズ属	ダイズ属	ダイズ属
活性	+++	+++	+	++	++	++
種子						
	長径 23 mm 短径 12 mm	長径 28 mm 短径 16 mm	直径 9.2 mm	直径 10.1 mm	直径 10.4 mm	長径 5 mm 短径 3 mm
産地	愛知県	愛知県	富山県	北海道 (帯広)	岩手県	本校裏 神通川 河川敷

	金時豆	白花生	かたてつゆ (たけいんぶ)	赤かたてつゆ (あかたけいんぶ)	白かたてつゆ (しろたけいんぶ)
属	インゲン属	インゲン属	ソラマメ属	シャジクソウ属	シャジクソウ属
活性	-	-	-	-	-
種子					
	長径 16 mm 短径 10 mm	長径 23 mm 短径 10 mm	直径 3 mm	直径 1.8 mm	直径 1.2 mm
産地	北海道	北海道	本校裏 神通川 河川敷	本校裏 神通川 河川敷	ニュージー ランド

の種子のウレアーゼ活性を調べた。小さな未熟な種子には酵素活性はなかったが、成熟種子の大きさに成長すると、柔らかい緑色の未熟な状態でもウレアーゼ活性があった。収穫した硬い成熟種子には高い酵素活性があった。

(実験6) マメ科植物は栽培しやすいので、ほかのマメ科種子もウレアーゼとして使用できないか、ウレアーゼ活性を調べた結果を表2に示す。

ナタマメ属とダイズ属の種子粉末に高いウレアーゼ活性があった。野生種のツルマメは栽培種のダイズの原種と考えられている⁽⁷⁾。また、「枝豆」として販売されているダイズの未成熟種子(未加熱)にも活性があった。Sumnerはナタマメ由来のウレアーゼを研究する以前に、脱脂ダイズのウレアーゼを用いた研究を行っていた⁽¹⁾。ナタマメはダイズよりもウレアーゼ活性が高い⁽¹⁾、ダイズには多くの品種があり世界で広く栽培されている。野生種のツルマメも含めてダイズ属の種子粉末は、身近で利用しやすいという点から、酵素ウレアーゼとして活用できる。

まとめ

ナタマメ種子の粉末はウレアーゼ活性が非常に高い。ナタマメ粉末は水で煮たり、強酸性水溶液に浸けたりすると直ちに失活するが、 5°C 以下の水に浸けたり、乾燥状態で 100°C の高温に置いたりしてもすぐには失活しない。長期間常温保存が可能なこの粉末は、酵素ウレアーゼとして利用しやすい。ナタマメ属およびダイズ属の多

くの品種の種子にも同様なウレアーゼ活性がある。尿素から生じるアンモニアと二酸化炭素の有用性から、ナタマメとダイズの種子粉末には、バイオリクターで用いることのできる反応素子として活用できる可能性がある。

本研究の意義と展望

安価で入手しやすいナタマメやダイズ種子粉末に含まれるウレアーゼは、粉末のまま常温で長期保存可能であること、いつでもどこでも尿素溶液にその粉末を加えれば、アンモニアを発生させることができること、反応は溶液をやや強い酸性にするだけで容易に停止できることが本研究により明らかになった。また発生したアンモニアは燃料電池の燃料として注目されているため、これらのマメ粉末を膜に吸着することでバイオリクターの反応素子として活用することも可能である。加えてアンモニアと同時に生成する二酸化炭素はカルシウムイオンと反応させると炭酸カルシウムに変えることができるため、土壌の改良に役立てることができる。今後、活性の

あったマメに存在するウレアーゼの比活性測定や性質の検証による酵素の選別や、酵素粉末の固相化法を検討することにより、高機能化バイオリクター装置の作製が可能となり、有用なアンモニアと二酸化炭素のさらなる活用が期待される。

文献

- 1) James B. Sumner: "The chemical nature of enzymes" Nobel Lecture, 1946年12月
- 2) 雑賀 高, 浜野友紀: 尿素を燃料とする水素エネルギーシステム, 2011.
- 3) 京都大学, ノリタケカンパニー, 三井化学, トクヤマ, 日本触媒, 豊田自動織機: 「アンモニア燃料電池」SIP委託研究 2017年7月共同発表
- 4) 鹿渡洗一, 林 和幸, 木下尚樹, 安原英明: 生体触媒反応を介したセメンテーションによる改良砂の力学特性, 第40回岩盤力学に関するシンポジウム講演集, 2011.
- 5) 小橋恭一: 博士論文「ウレアーゼの結晶化法ならびにウレアーゼ阻害剤について」学位論文1963年6月
- 6) 国立天文台: 理科年表, 2009.
- 7) 杉山信太郎: 日本醸造協会誌, **87**(12), 890 (1992).

Copyright © 2019 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.57.653