

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05842

研究課題名(和文) 高周波交流磁場中における磁性粒子/酵素複合体クラスターの発熱および酵素活性の解明

研究課題名(英文) Heat generation and enzymatic activity of cluster structures formed by enzyme/magnetic particle hybrids subjected to a radio frequency alternating magnetic field

研究代表者

森本 久雄 (Morimoto, Hisao)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：00385957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、表面に酵素を固定化した磁性粒子(磁性粒子/酵素複合体)の自己組織化クラスター構造の形成とそれらクラスターの高周波交流磁場中における発熱およびこれに起因した酵素活性変化を解析した。磁性粒子/酵素複合体に高周波交流磁場を印加すると粒子の発熱によって粒子表面の酵素が活性化するが、直流・交流複合磁場中では複合体のクラスター形成が促進され、酵素活性のさらなる上昇がみられた。また磁性粒子/酵素複合体に回転磁場を印加すると酵素が活性化し、活性は回転磁場の周波数に応じて変化する。本研究では回転磁場と高周波交流磁場を同時に印加し、回転磁場のみ印加した場合に比べ活性がさらに上昇することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The heat generation of clusters formed by magnetic particles, on which enzyme is immobilized, and its effect on the enzymatic activity were investigated. When enzyme immobilized on magnetic particles is subjected to an ac magnetic field, the particles dissipate heat and as a result, the enzymatic activity increases. The present study showed that the enzymatic activity is further increased by additionally applying a dc magnetic field, which encourages the cluster formation of particles. The activity of enzyme immobilized on magnetic particles is increased under a rotational magnetic field and the activity increase changes depending on the frequency of the rotational magnetic field. The present study also showed that when immobilized enzyme is subjected to both rotational and ac magnetic fields, the enzymatic activity becomes higher than that under a rotational magnetic field.

研究分野：複雑流体, ソフトマター科学, バイオ・ナノ融合科学技術

キーワード：ナノマイクロ熱工学 磁性粒子 酵素 クラスター 交流磁場

### 1. 研究開始当初の背景

近年、酵素を固定化する担体として磁性ナノ・マイクロ粒子が注目されている [例えば、T. Mizuki *et al.*, PLoS One **8**, e66528 (2013); D.A. Uygun *et al.*, J. Appl. Polym. Sci. **123**, 2574 (2012); E. Ranjbakhsh *et al.*, Chem. Eng. J. **179**, 272 (2012) など]. 磁性粒子は磁石を用いて容易に収集出来るため、その表面に固定化された酵素を再利用可能であるという利点を持っている。また、勾配磁場や変動磁場を用いてその運動や位置制御が可能であることから [A. Aki *et al.*, J. Appl. Phys. **104**, 094509 (2008); H. Morimoto *et al.*, Phys. Rev. E **78**, 021403 (2008)], マイクロ化学分析システム ( $\mu$ -TAS) やマイクロバイオリアクターへの応用も期待されている。本研究の代表者は、表面に酵素を固定化した磁性粒子 (以後これを「磁性粒子/酵素複合体」とよぶ) を高周波交流磁場中に置くと、粒子の磁気ヒステリシスおよび渦電流に起因した発熱によって、粒子表面の酵素が加熱・活性化されることを見出した [基盤研究(C), 磁性粒子を利用したナノ・マイクロスケール局所加熱法の開発, 森本久雄, 平成 22 年度 - 平成 24 年度]. またこれと同時に外部磁場中における磁性粒子の自己組織化現象について研究を行ってきた [例えば、T. Ukai *et al.*, Phys. Rev. E **83**, 061406 (2011); Y. Nagaoka *et al.*, Langmuir **27**, 9160 (2011); H. Morimoto *et al.* J. Chem. Phys. **131**, 034905 (2009) など]. 最近の研究において、磁性粒子が自己組織化してクラスターを形成すると、ランダムに分散した状態に比べて粒子の発熱量が増加することが示された [D. Serantes *et al.*, J. Phys. Chem. C **118**, 5927 (2014)]. この特性を利用し、磁性粒子/酵素複合体を自己組織化させることによって粒子表面の酵素をさらに効率的に活性化することが可能になると期待される。しかしながら高周波交流磁場中の磁性粒子の発熱と粒子クラスター構造の関係はいまだ不明な点が多く、磁性粒子/酵素複合体の酵素反応に最適なクラスター構造について解析した研究例はない。

### 2. 研究の目的

本研究では、磁性粒子表面に酵素を固定化した磁性粒子/酵素複合体を作製し、高周波交流磁場中における磁性粒子の発熱に起因した酵素活性変化を解析する。磁性粒子は外部磁場中において自己組織化し、クラスターを形成するが、このクラスター構造の形成が磁性粒子の発熱および酵素活性におよぼす効果を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 磁性粒子/酵素複合体の作製

本研究では、主に鉄微粒子表面に  $\alpha$ -アミラーゼを固定化した「磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体」を対象に各種実験を行った。 $\alpha$ -アミラーゼ溶液に平均粒径約 1.1  $\mu\text{m}$  の鉄微粒子を

加えて 4  $^{\circ}\text{C}$  で静置し、 $\alpha$ -アミラーゼ分子を静電気力により粒子表面に固定化させた。固定化せずに溶液中に分散した  $\alpha$ -アミラーゼ分子を取り除くために粒子を磁石で集めた後に溶媒を捨て、再度滅菌水を加えて粒子を懸濁する作業を 3 度行った。

#### (2) 磁性粒子/酵素複合体の活性測定

磁性粒子/酵素複合体の活性測定に使用した実験装置の概略図を図 1 に示す。磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体の活性測定は以下の手順により行った。複合体が分散した溶液と  $\alpha$ -アミラーゼの基質であるデンプン溶液をテストチューブ内で混合し、これを円筒容器内に設置した。この容器内は恒温槽によって 25  $^{\circ}\text{C}$  に保たれた循環水で満たされている。円筒容器はクラスター形成のための磁場を発生する 2 対のコイルおよび磁性粒子発熱のための高周波交流磁場を発生するコイルに囲まれており (図 1 参照)、これらコイルが発生する外部磁場中で酵素反応を行った。なお、クラスター形成のための 2 対のコイルは互いに垂直に設置されており、これにより任意の方向の直流磁場あるいは回転磁場を印加した。反応終了後にヨウ素溶液を加え、波長 700 nm の吸光度を測定することによりデンプンの残存量を評価し、 $\alpha$ -アミラーゼの活性を求めた。

#### (3) 磁性粒子/酵素複合体のクラスター構造の観察

外部磁場中において磁性粒子/酵素複合体のクラスター形成が磁性粒子の発熱および酵素活性におよぼす影響を明らかにするために、複合体のクラスター構造を光学顕微鏡により観察した。粒子発熱のための高周波交流磁場は顕微鏡のレンズも加熱してしまうため、本研究では観察用サンプルセルに封入した複合体分散溶液に酵素活性測定時と同じ条件で磁場を印加し、その後速やかにサンプルセルを顕微鏡ステージに移動させクラスター構造の観察を行った。本実験で使用したサンプルセルは 2 枚のガラス基板で厚さ約 120  $\mu\text{m}$  の PDMS 薄膜スペーサーを挟んだ構造となっており、基盤の間に複合体分

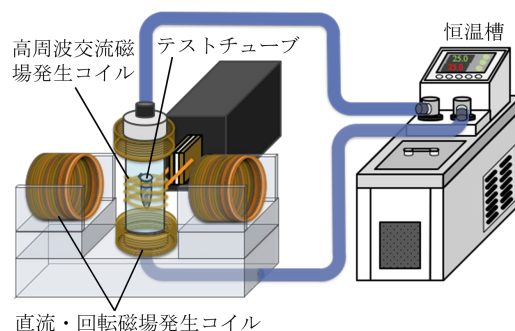


図 1. 磁性粒子/酵素複合体の活性測定に使用した実験装置の概略図。

散溶液を流し込んだ．外部磁場はサンプルセルと平行に印加した．画像解析ソフトウェアを用いて観察画像からクラスターのサイズを評価した．

#### (4) コンピュータシミュレーション解析

単磁区の強磁性粒子を対象に外部磁場中における粒子のクラスター形成および発熱特性の解析を行った．粒子の並進・回転運動を Langevin 方程式でモデル化し，これを数値的に解析した．直流・交流複合磁場中における粒子のクラスター構造および磁気特性を解析し，磁化のヒステリシスループから発熱量を評価した．

### 4. 研究成果

(1) 磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体を対象に直流・交流複合磁場中における酵素活性の測定を行った．まずテストチューブ内の複合体分散溶液に直流磁場を印加し，その際の酵素活性変化を解析した．テストチューブに対して直流磁場の方向を変化させて解析を行ったが，いずれの方向に磁場を印加した場合でも無磁場における酵素活性に比べて変化は認められなかった．一方，高周波交流磁場を印加すると粒子の発熱に起因した酵素活性の上昇がみられた．さらに直流・交流複合磁場中の酵素活性を調べると，交流磁場のみを印加した場合に比べてさらに活性が上昇することがわかった（図 2 参照）．活性上昇量は直流・交流磁場の成す角度に依存して変化し，両者の方向が一致する際に酵素活性は最大値を示した．さらに直流磁場強度を固定して交流磁場の振幅を増加すると，これに応じた活性も増加した．

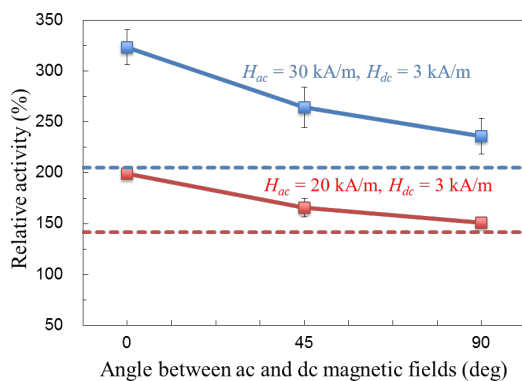


図 2. 直流・交流複合磁場中における磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体の酵素活性．グラフの縦軸は磁場中における酵素活性を無磁場におけるそれで規格化したものであり，横軸は直流・交流磁場の成す角度である．交流磁場の周波数および直流磁場の強度はそれぞれ 0.34 MHz, 3 kA/m であり，赤・青の記号は交流磁場の振幅が 20, 30 kA/m の場合の結果を表している．赤・青の点線はそれぞれ振幅が 20, 30 kA/m の交流磁場のみを印加した際の酵素活性である．

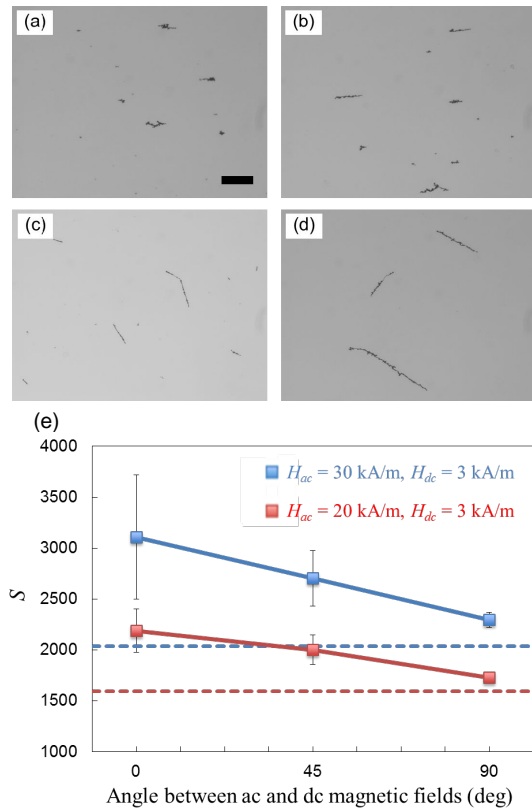


図 3. 直流・交流複合磁場中における磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体のクラスター形成．(a-d) クラスターの顕微鏡観察画像：(a) 交流磁場のみ，(b-d) 直流・交流複合磁場．交流磁場の振幅および周波数はそれぞれ 20 kA/m, 0.34 MHz であり，直流磁場の強度は 3 kA/m である．直流・交流磁場の成す角度は，90° (b), 45° (c), 0° (d) である．スケールバーは 100  $\mu$ m．(e) クラスターの平均サイズの実験パラメータ依存性．グラフの縦軸  $S$  はクラスターの長手方向サイズの平均値を磁性粒子の平均粒径で規格化したものであり，横軸は直流・交流磁場の成す角度である．交流磁場の周波数および直流磁場の強度はそれぞれ 0.34 MHz, 3 kA/m であり，赤・青の記号は交流磁場の振幅が 20, 30 kA/m の場合のクラスターサイズを表している．赤・青の点線はそれぞれ振幅が 20, 30 kA/m の交流磁場のみを印加した際のサイズである．

(2) 図 2 に示した直流・交流複合磁場中における磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体の酵素活性についてより詳細な検討を行うために，複合体のクラスター構造を光学顕微鏡により観察した．観察画像の一例を図 3a-d に示す．磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体は交流磁場中においても鎖状クラスターを形成するが（図 3a），直流・交流複合磁場中ではクラスターサイズは増大し，直流・交流磁場が互いに平行に近づくにしたがいクラスターサイズの増大がみられた（図 3b-d）．この傾向を定量化するために，クラスターの長手方向サイズの平均値を磁性粒子の平均粒径で規格

化したものを  $S$  と定義し、その実験パラメータ依存性を解析した。解析結果を図 3e に示す。図 2 および 図 3e より、クラスターサイズが大きくなると酵素活性も増大していることがわかる。このことよりクラスター形成によって粒子の発熱量が増大し、これによって酵素が活性化したものと考えられる。

(3) 磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体を対象に回転磁場中における酵素活性の測定を行った(図 4 参照)。回転磁場中において  $\alpha$ -アミラーゼの活性は上昇するが、これは複合体がクラスターを形成し、磁場に追従して回転することによって粒子表面の酵素分子と周囲の基質分子との衝突確率が増加したためであると考えられる。酵素活性は磁場の周波数がある値において極大となり、これを超えると減少を始める。これは溶媒との摩擦によるクラスターの崩壊に対応していると考えられる。次に回転磁場と粒子発熱のための高周波交流磁場を同時に印加したところ、回転磁場のみ印加した場合に比べて活性がさらに上昇することがわかった。

(4) コンピュータシミュレーションによると、単磁区の強磁性粒子は磁気モーメントが大きくなるとチェーンクラスターおよびそれらの両端が結合したループクラスターを形成する。ループクラスター全体の磁気モーメントはほとんどゼロであり、交流磁場中において磁気ヒステリシスをほとんど示さないことがわかった。ループクラスターは直流磁場の印加によって崩壊させることが出来るため、直流・交流複合磁場はヒステリシス損熱増加に有効であると考えられる。しかしながらこのことについては今後より詳細な解析が必要である。

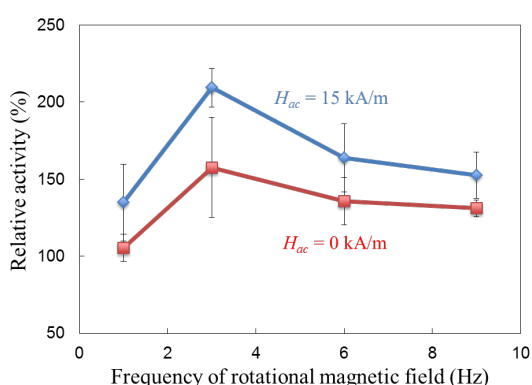


図 4. 回転磁場中における磁性粒子/ $\alpha$ -アミラーゼ複合体の酵素活性。グラフの縦軸は磁場中における酵素活性を無磁場におけるそれで規格化したものであり、横軸は回転磁場の周波数である。回転磁場の強度は 1.1 kA/m である。赤・青の記号はそれぞれ、回転磁場のみ印加した場合および回転磁場と周波数 0.34 MHz、振幅 15 kA/m の交流磁場を同時に印加した場合の酵素活性である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

M. Suzuki, H. Hayashi, T. Mizuki, T. Maekawa and H. Morimoto, “Efficient DNA ligation by selective heating of DNA ligase with a radio frequency alternating magnetic field”, *Biochem. Biophys. Rep.*, 査読有, Vol.8, pp.360-364 (2016).  
DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.10.006

M. Suzuki, A. Aki, T. Mizuki, T. Maekawa, R. Usami and H. Morimoto, “Encouragement of enzyme reaction utilizing heat generation from ferromagnetic particles subjected to an ac magnetic field”, *PLoS ONE*, 査読有, Vol.10, e0127673 (2015).  
DOI: 10.1371/journal.pone.0127673

[学会発表](計 4 件)

M. Karube, M. Suzuki, T. Mizuki, T. Maekawa and H. Morimoto, “Activity of an enzyme immobilized on ferromagnetic particles under an ac/dc combined magnetic field”, *12th International Conference on Surfaces, Coatings and Nano-Structured Materials (NANOSMAT 2017)* (September 2017, Paris, France).

軽部将幸, 鈴木政史, 水木徹, 前川透, 森本久雄, “交流・直流磁場による強磁性粒子表面に固定化された酵素の活性化”, *化学工学会 第 82 年会* (2017 年 3 月, 東京)

M. Suzuki, H. Hayashi, T. Mizuki, T. Maekawa and H. Morimoto, “Efficient DNA ligation using DNA ligase immobilized on ferromagnetic particles”, *10th International Conference on Surfaces, Coatings and Nano-Structured Materials (NANOSMAT 2015)* (September 2015, Manchester, UK).

M. Tateno, M. Suzuki, T. Mizuki and H. Morimoto, “Production of invert sugar using invertase immobilized on magnetic particles”, *10th International Conference on Surfaces, Coatings and Nano-Structured Materials (NANOSMAT 2015)* (September 2015, Manchester, UK).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 久雄 (MORIMOTO HISAO)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号: 00385957

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし