

令和元年6月9日現在

機関番号：15501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0241

研究課題名（和文）バイラメラ空間内脱水酵素反応を利用した炭酸カルシウム中空ナノ粒子の気泡塔合成（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Synthesis of Hollow Calcium Carbonate Nano-particles in a Bubble Column using Carbonic Anhydrase Reactions in Bilamellar Systems(Fostering Joint International Research)

研究代表者

吉本 誠 (Yoshimoto, Makoto)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：80322246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：炭酸脱水酵素は二酸化炭素の水和を著しく促進するため、二酸化炭素の吸収による炭酸カルシウム粒子の生成反応に有用である。本研究では、まず、樹状高分子（デンドリマー）と酵素の複合体を調製して、その活性や安定性を明らかにした。また、複合体を種々の固体表面に強固に吸着させ、流通式触媒反応器へ応用した。次いで、脂質二分子膜小胞（リポソーム）に酵素を共有結合させ、カルシウムイオン共存下、形状や大きさが異なる粒子の生成反応プロセスへ適用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炭酸脱水酵素は二酸化炭素の吸収を触媒するため温室効果ガスの低減プロセスへの応用が期待されている。本研究では、本酵素とリポソームあるいは樹状高分子との新規な複合体の調製と応用を研究した。特に樹状分子と炭酸脱水酵素の複合体は正電荷をもつため、負電荷をもつ固体表面に容易かつ強固に固定化できる。酵素-高分子複合体により高密度に修飾された反応器は、二酸化炭素が関与する様々な分析やプロセスへの応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Carbonic anhydrase can significantly promote the hydration of carbon dioxide. Therefore, the enzyme is useful for the absorption of carbon dioxide followed by the formation of calcium carbonate particles. In this work, first the enzyme-dendronized polymer conjugates were prepared and their activity and stability were clarified. Then, the conjugates were firmly immobilized on the solid surface through adsorption for the application to catalytic flow-through reactors. Second, the enzyme molecules were covalently coupled with phospholipid bilayer vesicles (liposomes) and the catalyst was applied to the formation processes of calcium carbonate particles with different size and morphology in the presence of calcium ions.

研究分野：化学工学

キーワード：炭酸脱水酵素 樹状高分子 リポソーム 酵素反応

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

炭酸脱水酵素は活性部位に亜鉛を含有する金属酵素であり、二酸化炭素の水和反応を著しく促進する。これまでに炭酸脱水酵素はさまざまな担体に固定化され、医薬として有用な酵素阻害剤の探索や二酸化炭素関連化合物の検出等に応用されている。炭酸脱水酵素の機能を実用的な反応器において安定に活用できれば、二酸化炭素ガスの水相への吸収と炭酸カルシウムへの固定化の一連の操作を常温常圧において高効率化できる。酵素を触媒とする二酸化炭素処理プロセスを構築するためには、酵素反応により生成する炭酸イオンとカルシウムイオンによる粒子生成を効率的に促進する反応場や触媒の再利用、さらに流通式操作を実現する必要がある。すなわち、炭酸脱水酵素が関与する合理的な反応場を形成する担体の選定と酵素の固定化技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炭酸脱水酵素を樹状高分子(デンドリマー)と結合させて、さらにリポソームと複合させた新規な触媒を調製する。この触媒を用いて、二酸化炭素を原料とした炭酸カルシウム粒子合成プロセスを構築することである。このために、主として次の項目を検討する。

(1) 正電荷をもつ樹状高分子に炭酸脱水酵素を高密度に共有結合させた新規な触媒を開発する。この高分子-酵素複合体をガラス製反応器(マイクロピペットまたはガラス繊維で構成されたフィルター)の負電荷をもつ表面に吸着固定化させて、原料を連続的に供給して生成物を得る流通式の酵素触媒反応器に適用する。

(2) リポソームに共有結合させた炭酸脱水酵素を調製して、産業排ガスを模擬した10%の二酸化炭素を含有するガスからの二酸化炭素の高速吸収操作を行う。さらに炭酸イオンとカルシウムイオンを共存させ、炭酸カルシウム微粒子を形成させる。この際の各種反応操作条件が生成粒子の大きさや形状に及ぼす効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 樹状高分子への炭酸脱水酵素(BCA)の複合化

ETH-Zurich Peter Walde 教授のグループで酵素固定化への応用展開が進められているアミノ基を有する樹状高分子(*de*-PG2)^{1,2)}を、酵素への結合部位となるリンカー分子(*N*-succinimidyl 6-hydrazinonicotinate acetone hydrazone; S-HyNic)で修飾・精製した。さらに、高分子に修飾されたHyNic量を定量した。次にBovine carbonic anhydrase (BCA)を別のリンカー分子(*N*-succinimidyl 4-formylbenzoate; S-4FB)で修飾・精製した。精製時や保存時に安定なBCA-4FB溶液を調製するために、種々のBCA:4FB比、緩衝液を用いてBCA修飾反応を行った。上述の各修飾反応は室温(23℃)で4h行った。BCA-4FB中のBCA1分子当たりの4FB数を決定するために、4FBのモデル化合物として用いた濃度既知の4-formyl-*N*-methyl-benzamide (methyl-4FB)溶液とBCA溶液の各スペクトルを精製BCA-4FBの吸収スペクトルに対してフィッティングさせた。HyNicで修飾された高分子とBCA-4FBを種々のHyNic:4FB比で混合して、室温で15-20h静置することによりBisaryl hydrazone (BAH)結合を介して高分子とBCAを共有結合させた。反応経過は紫外可視分光光度計で測定した354nmの吸光度(A_{354})に基づいて追跡した。反応液から高分子に結合していない酵素を除去するために、遠心ろ過分離操作を繰り返した。未結合のBCAは A_{280} に基づいて定量した。得られた高分子-BCA複合体(以下*de*-PG2-BAH-BCAとする)は4℃で保存した。

(2) BCAの酵素活性の測定

BCA活性は、*p*-nitrophenyl acetate (*p*-NA)を用いて、BCAの共存下における生成物の指標となる A_{405} ($\epsilon_{405} = 10510 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)または A_{348} ($\epsilon_{348} = 5400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)の増加速度に基づいて決定した。活性測定は25℃において行った。

(3) 樹状高分子と複合させた炭酸脱水酵素による反応操作

de-PG2-BAH-BCAを溶解させた10mM sodium phosphate 緩衝液(pH 7.2)をガラス製マイクロピペット(内径1.6mm、長さ14cmまたは内径0.64mm、長さ12.5cmの2種類)またはガラス繊維フィルター(直径7mm、厚み約0.68mm)と接触させ、*de*-PG2-BAH-BCAを吸着固定化させた。比較のため、遊離BCAを同様の条件で上述の担体に固定化した。シリンジポンプを用いてマイクロピペットに1.0mM *p*-NA溶液を送液して、ピペット出口で採取した溶液の A_{405} を測定した。また、フィルターはETH-Zürichにおいて作製されたホルダーユニットに1枚または2枚を重ねて装着して、同様に基質溶液を連続的に送液して反応器出口における生成物濃度を測定した。各反応操作は室温(23℃)において行った。

(4) リポソームへのBCAの複合化

双性脂質 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)、負電荷をもつ 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) 及びカルボキシ基をもつ 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(glutaryl) (NG-POPE) をモル比 65:20:15 で混合して、乾燥脂質膜水和・凍結融解・Extrusion 法によりリポソームを調製した。リポソームのカルボキシ基を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) と

N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS)により活性化して、BCA分子の表面に分布するアミノ基と共有結合させた。リポソームに結合しなかったBCAはゲルクロマトグラフィーで分離除去した。脂質(POPC)濃度は酵素法で測定した。BCA-リポソーム複合体の懸濁液は4で保存した。

(5) BCA-リポソーム複合体を用いた炭酸カルシウム粒子生成反応操作

静止液系において、BCA-リポソーム複合体を塩化カルシウム及び各種濃度の二酸化炭素を含有する溶液に懸濁して、炭酸カルシウム微粒子の生成に伴う溶液の濁度変化を追跡した。溶液のpHはTrisにより制御した。カルシウムイオン濃度は電極法により測定した。また、BCA-リポソーム複合体を懸濁させた外部循環式エアリフト型気泡塔に模擬産業排ガスとして、10%二酸化炭素を含有する窒素ガスを通気して、粒子生成反応操作を行った。生成微粒子は乾燥させて電子顕微鏡(SEM)で形状、大きさを観察した。

4. 研究成果

(1) 樹状高分子 - BCA 複合体 (*de*-PG2-BAH-BCA(Fig.1A))の特性

樹状高分子(*de*-PG2)のアミノ基のうち、11%がHyNicで修飾された。BCA:4FB = 1:2 (モル比)で調製したBCA-4FB溶液中のBCAと4FBの各濃度をスペクトルフィッティングあるいは4FB濃度を測定するとともにBCA濃度を活性に基づいて決定して得られた4FB/BCA比は、MSR = [4FB]/[BCA] = 0.97 ± 0.26であった。なお、BCA 1分子に高分子への結合部位が1つある状態 (MSR ≈ 1) が望ましい。上述の調製条件はBCA/4FB混合比を種々変化させて最適化したものである。また、4FBによるBCAの修飾反応とBCA-4FBの精製操作はいずれも0.1 M sodium phosphate/0.15 M NaCl 緩衝液(pH 7.2)で行った。pHが低い緩衝液を用いるとBCA-4FBは凝集したため、BCAの修飾には上述の緩衝液を用いる必要があることを明らかにした。*de*-PG2-HyNicとBCA-4FBを混合した際の吸収スペクトルの経時変化をFig.1Bに示す。なお、BAH形成反応時において高分子とBCAの凝集を抑制するために反応溶液中に1 M NaClを共存させた。354 nm付近の吸光度が時間の経過とともに増大しており、BAH結合が形成していることがわかる。この変化と $\epsilon_{354} = 29,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ より、反応系内のBAH結合濃度を48.4 μM と計算できる。反応時に仕込んだBCA量と、*de*-PG2-BAH-BCAの精製操作で分離されたBCA量から物質収支に基づいて高分子と複合化されたBCA量を決定した。その結果、1,000 repeating unitの*de*-PG2 1分子には、平均175のBAH結合と115分子のBCAが存在することがわかった。BAH結合の数がBCA分子数よりも大きいのは、BCA分子の一部は2分子あるいはそれ以上の4FBに修飾されているためと考えられる。2分子の4FBが結合したBCAの存在はエレクトロスプレー質量分析(ETH-Zürich)により確認した。*de*-PG2-BAH-BCA溶液を4で保存したところ、少なくとも40日間ほぼ初期の活性を維持していた。一方、55以上における熱安定性は、遊離BCAに比べて低下した。

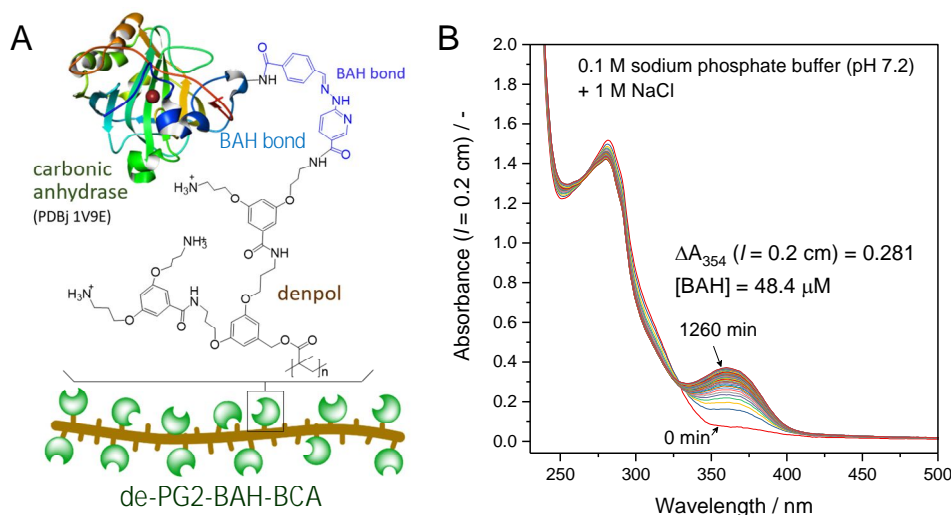


Fig.1 (A) デンドリマー (*de*-PG2) と炭酸脱水酵素 (BCA, PDBj code 1V9E) の複合体の概念図 (B) *de*-PG2-HyNic と BCA-4FB 混合溶液の吸収スペクトルの経時変化

1,000のrepeating unitsと正電荷をもつポリマー及び100分子以上のBCAから形成される*de*-PG2-BAH-BCAは大きな分子サイズをもつ。これをリポソームに内包させた場合、リポソームと*de*-PG2-BAH-BCAの分離が困難であること、リポソームへの封入効率が低いと予想されること等から、当初の目的としていたリポソーム内水相へのBCA-樹状高分子複合体の封入は行わず、リポソーム表面への複合化について検討した。しかし、負に帯電させたリポソームとBCA-樹状高分子複合体の結合は低レベルであった。そこで、当初の計画を変更して、高濃度の*de*-PG2-BAH-BCA溶液を直接種々のガラス製固体表面に接触させ、触媒を吸着固定化する手法を

採用した。これにより、当初予測していなかった高活性かつ安定であり実用性が高い複数の流通式反応系を構築でき、その有用性を実証できた。具体的な結果を以下の(2)で述べる。

(2) *de*-PG2-BAH-BCA による流通式触媒反応操作

de-PG2-BAH-BCA を脱塩後、10 mM sodium phosphate 緩衝液(pH 7.2)に溶解してマイクロピペット及びガラス繊維フィルターと pH 7.2 において一定時間接触させ、緩衝液で洗浄した。この操作により、マイクロピペット(内径 1.6 mm, 長さ 14 cm)の内壁とフィルターにそれぞれ 11.2 pmol/cm^2 と 31.6 pmol/cm^2 の BCA が固定化された(フィルターは外表面積基準の値である)。小容量のマイクロピペット(内径 0.64 mm, 長さ 12.5 cm)には上述の体積が大きいものと同程度の *de*-PG2-BAH-BCA が固定化された。SEM 観察の結果、フィルターは細い繊維の集合体であり、高い比表面積をもつため *de*-PG2-BAH-BCA が効率よく吸着することがわかった。一方、遊離 BCA は同一条件下においてマイクロピペットには殆ど固定化されなかった。一方、フィルターには *de*-PG2-BAH-BCA の場合よりは低レベルであるが遊離 BCA が固定化された。上述のマイクロピペットに 1.0 mM *p*-NA 溶液を送液したときの反応器出口における A_{405} の経時変化を Fig.2A に示す。*de*-PG2-BAH-BCA を固定化したピペットを通過させると出口で生成物が連続的に検出された。また、 A_{405} 値は基質の送液速度に依存しており、流速を増大させると生成物濃度が低下している。これらの結果より、ピペット内壁において樹状高分子に複合化された BCA が *p*-NA の分解反応を触媒していることがわかる。さらに、Fig.2B に示すように、*de*-PG2-BAH-BCA を固定化したフィルターを用いて流通式操作を行ったところ、生成物が連続的かつ安定に得られた。

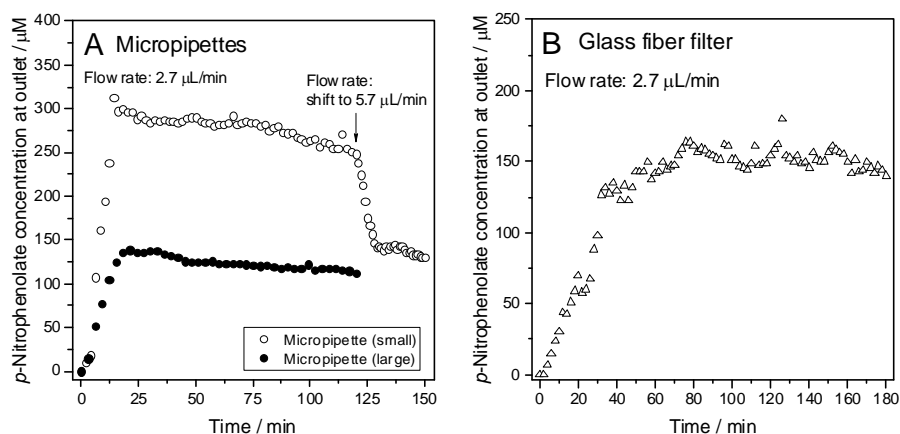


Fig.2 (A) *de*-PG2-BAH-BCA が固定化されたマイクロピペットによる流通式反応操作(基質溶液 1.0 mM *p*-NA) (B) *de*-PG2-BAH-BCA を固定化したガラス繊維フィルターを装着した反応器による流通式反応操作((A), (B)いずれの場合も BCA が固定化されていない各反応器を通過させたときの生成物濃度を差し引いた値を示している。)

(3) BCA-リポソーム複合体の特性

精製した BCA-リポソーム複合体の平均粒子径は 149 nm であった。脂質分子親水部が脂質膜上で占める平均面積を 0.66 nm^2 、脂質二分子膜の厚みを 3.7 nm と仮定すると、リポソーム 1 個を構成する脂質分子数は 2.04×10^5 と見積もることができる。これと酵素活性に基づいて計算したリポソーム 1 個当たりの BCA 分子数は 550 であり、BCA を直径 4 nm の球状分子と仮定すると、リポソーム外表面の約 10% が活性をもつ BCA で占められていることがわかった。一方、BCA のトリプトファン蛍光強度に基づいて見積もった BCA 分子数は活性基準の分子数より大きいことがわかった。すなわち、本研究において適用した BCA-リポソーム複合体の調製条件下では、リポソームへの固定化に伴い BCA 活性が低下することがわかった。BCA-リポソーム複合体の概念図を Fig.3A に示す。

(4) BCA-リポソーム複合体による二酸化炭素ガスの吸収・固定化反応操作

BCA-リポソーム複合体・塩化カルシウムの混合溶液と二酸化炭素含有溶液を種々の温度で混合して、混合液の濁度(600 nm における吸光度)の経時変化を 1800 s 追跡した。濁度は炭酸カルシウム粒子が生成・蓄積すると増大する。一例として 30 の静止液系において得られた結果を Fig.3B に示す。比較として、酵素を固定化していないリポソームの共存下で得られた結果も示している。酵素が存在しない系では、初期に濁度変化が小さい時間があり、その後濁度が増加している。一方、BCA-リポソーム複合体の共存下では、二酸化炭素溶液を混合した直後から濁度が急激に増大している。このことより、リポソーム表面の BCA が二酸化炭素の水和反応を触媒して、炭酸カルシウムの生成速度を著しく増大させることがわかる。なお、反応後期の濁度の低下は、生成粒子が沈殿していることに対応すると考えられる。リポソームのゼータ電位と塩化カルシウム濃度の関係を Fig.3C に示す。リポソームの表面は負に帯電しており、

共存カルシウムイオン濃度の増加に伴いリポソームのゼータ電位はゼロに近づき、高濃度のカルシウムイオン共存下ではリポソームが僅かに正に帯電した。この結果より、カルシウムイオンが脂質膜に吸着していることがわかる。また、高濃度のカルシウムイオンを含む BCA-リポソーム複合体の懸濁液を外部循環式エアリフト型気泡塔に仕込み、10%の二酸化炭素を含有する窒素ガスを通気したところ、反応器内のカルシウムイオン濃度は初期の6%まで低下していた。すなわち、反応器内で炭酸カルシウム粒子が生成したことがわかる。静止液系と気泡塔で得られた炭酸カルシウム粒子を乾燥させ SEM 観察したところ、両者に著しい形状の相違がみられた(発表論文 参照)。気泡塔では、気液二相流の影響により粒子の合一が促進され、静止液系に比べて生成粒子の形状・サイズが不均一になる傾向が認められた。

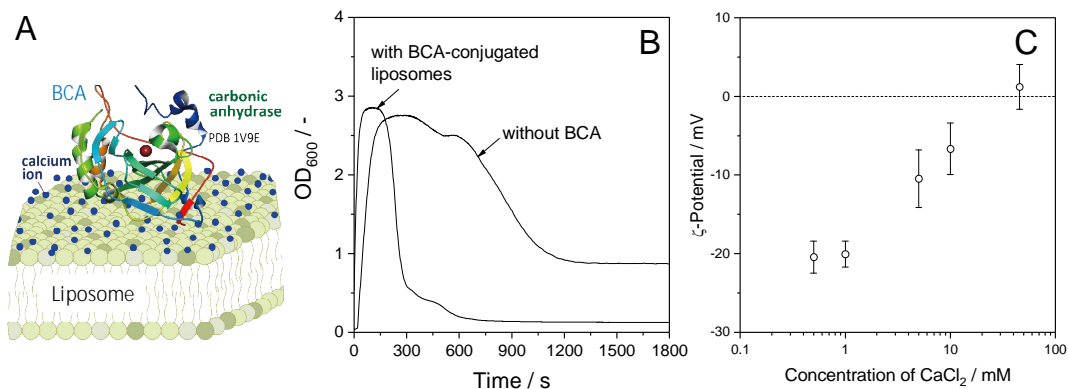


Fig.3 (A) BCA-リポソーム複合体の概念図 (B) 30 において CaCl₂ (46 mM) を溶解させた BCA-リポソーム複合体懸濁液 (Tris 溶液に懸濁) を二酸化炭素飽和水と混合した際の濁度 (OD₆₀₀) の経時変化 (C) BCA-リポソーム複合体のゼータ電位と塩化カルシウムイオン濃度の関係

以上、本研究では、活性をもつ炭酸脱水酵素(BCA)を樹状高分子(デンドリマー)とリポソームに共有結合を介して複合化する手法及び得られた触媒の特性を明らかにした。BCA-樹状高分子複合体(*de*-PG2-BAH-BCA)は反応器を構成する担体へ吸着固定化させて、流通式反応操作へ応用した。BCA-樹状高分子複合体はガラス表面に簡便かつ安定に固定化でき、BCA 反応に関わる各種分析等に有用と考えられる。また、BCA-リポソーム複合体は静止液系及び外部循環式エアリフト型気泡塔を用いた二酸化炭素ガスの吸収と炭酸カルシウム粒子の生成反応操作に応用できることを示した。今後、多様な実用反応器において二酸化炭素ガスを効率的に水相に吸収させて粒子へ固定化するプロセスへの応用が期待できる。

<引用文献>

- 1) A. Küchler, J. Adamcik, R. Mezzenga, A. D. Schlüter and P. Walde, Enzyme immobilization on silica glass through simple adsorption of dendronized polymer-enzyme conjugates for localized enzymatic cascade reactions. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 44530-44544.
- 2) A. Küchler, J. N. Bleich, B. Sebastian, P. S. Dittrich, P. Walde, Stable and simple immobilization of proteinase K inside glass tubes and microfluidic channels. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, *7*, 25970-25980.

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計6件)

- Naoyuki Nagatomo and Makoto Yoshimoto^{*}, High permeability of polyunsaturated lipid bilayers as applied to attoliter enzyme reactors. *ACS Appl. Bio Mater.*, accepted, DOI: 10.1021/acsabm.9b00165
- Makoto Yoshimoto, Thomas Schweizer, Marco Rathlef, Tazio Pleij and Peter Walde^{*}, Immobilization of carbonic anhydrase in glass micropipettes and glass fiber filters for flow-through reactor applications. *ACS Omega*, **2018**, *3*, 10391-10405.
- Makoto Yoshimoto^{*} and Peter Walde, Immobilized carbonic anhydrase: preparation, characteristics and biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2018**, *34*, no.151 (14 pages)
- 中野佑典, 吉本誠^{*}, リポソームの膜透過性に基づく気泡塔内流動特性の評価, *分析化学*, **2018**, *67*, 711-717.

Keisuke Maeshima and Makoto Yoshimoto*, Preparation and characterization of carbonic anhydrase-conjugated liposomes for catalytic synthesis of calcium carbonate particles. *Enzyme Microb. Technol.*, **2017**, *105*, 9-17.

Takeshi Ohtsu, Saki Shigenari, Makoto Yoshimoto* and Hiroshi Umakoshi, Reactive bienzyme systems fabricated through immobilization of biotinylated glucose oxidase and peroxidase molecules onto neutralized avidin-conjugated liposomes. *Biochem. Eng. J.*, **2017**, *125*, 81-87.

〔学会発表〕(計 14 件)

○Nicolas Ghéczy, Makoto Yoshimoto and Peter Walde, Enzyme immobilization on different solid silicate surfaces with the help of a dendronized polymer (denpol). *Swiss Chemical Society (SCS) Fall Meeting 2018* (Lausanne, Switzerland, 2018.9.7)

○Makoto Yoshimoto, Jun Yamada, Kenji Mizoguchi and Peter Walde, Increased heat stability of α -chymotrypsin through its confinement in liposomes. *Swiss Chemical Society (SCS) Fall Meeting 2017* (Bern, Switzerland, 2017.8.21).

○Makoto Yoshimoto, Jun Yamada, Kenji Mizoguchi and Peter Walde, Single monomeric enzyme molecules confinement in liposomes results in increased enzyme heat stability. *1st International Conference on Molecular Systems Engineering (ICMSE2017)* (Basel, Switzerland, 2017.8.27-29).

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ペーター バルデ 教授

ローマ字氏名： Professor Peter Walde

所属研究機関名：スイス連邦工科大学チューリッヒ校 (ETH-Zürich)

部局名：Department of Materials

職名：Professor

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。