

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05141

研究課題名(和文)糖ナノ粒子を犠牲母材に用いた酵素内包シリカナノカプセルの新規調製法と機能評価

研究課題名(英文) Novel preparation of enzyme-entrapped silica nanocapsule using sugar nanoparticle as sacrifice matrix

研究代表者

松根 英樹 (Matsune, Hideki)

宮崎大学・工学部・准教授

研究者番号：10380586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自の手法として糖のナノ粒子を過渡的な鋳型に利用することで、酵素を全く変性や失活させずに、酵素が内包したシリカナノカプセルの調製に成功した。酵素を閉じ込めたシリカカプセルは工学や医療の分野で幅広い応用が期待されていたが、酵素の機能を失わずにカプセル化することは、これまで非常に困難であった。本研究はそれを解決する手段であり、かつ全く新しい方法論である。特別な装置や道具を必要としないことから、今後工学的に幅広く応用され、普及するものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中空粒子を調製するために通常、鋳型が必要である。本研究でも鋳型を用いているが、鋳型となる材料に糖のナノ粒子を用いている点が新しい。糖のナノ粒子はこれまでに報告がなく、独自に開発した。水を加えると直ちに溶解して消失するため、中空構造の過渡的な鋳型に利用できる。その結果、あらかじめ酵素を糖ナノ粒子内に埋め込んで、その後、シリカで被覆すれば、水洗浄という極めて温和な条件で鋳型を除去でき、内部に酵素を保持した中空シリカナノカプセルを調製できる。カプセル内の酵素は本来の活性を維持しており、これをドラッグデリバリーシステムへ応用することで、バイオ工学分野の発展が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)： In this study, we have prepared enzyme-encapsulated silica nanoparticles (E@SiO₂) through the use of sugar-nanoparticles as templates. The enzymes in the prepared E@SiO₂ showed a high activity, comparable to bare one.

Although E@SiO₂ have been required in the field of the engineering, it has been hard to achieve to form E@SiO₂ without the denaturization of enzyme during the process of preparation. Our simple method will be applied for the wide variety of engineering, especially for drug delivery system.

研究分野：反応工学

キーワード：ナノカプセル ドラッグデリバリーシステム シリカ 酵素 糖 犠牲鋳型

1. 研究開始当初の背景

シリカからなるナノサイズの中空粒子に酵素を内包させたナノカプセルはドラッグデリバリーシステム(DDS)や触媒工学などの分野で注目されている。カプセル壁のシリカ膜は細孔構造を有するため低分子は容易に透過する。そのため反応物である基質がカプセル内外を往来でき、酵素をカプセルの内側に閉じ込めたままでも酵素反応を利用することができる。その結果、内包酵素を生体中での代謝機構やバクテリアや外部酵素による分解などから保護しつつ、持続して酵素反応を利用できるようになる。

中空シリカナノ粒子は、主に鋳型法を利用して調製される。既存の調製法では高分子や金属のナノ粒子表面をシリカで被覆して焼成や酸処理で鋳型を除去することでシリカのみを残存させて、中空シリカナノ粒子を得ている。こうして得た中空シリカナノ粒子に酵素を入れて酵素内包ナノカプセルを得ることが提案されているが、いざ酵素を内包させようとした場合、困難をとまなうことがしばしばある。まず、酵素などの巨大分子はシリカ膜の平均細孔径(数 nm)より大きなものが多く、細孔を透過できない。そのため、酵素を外部からカプセル内に導入することは極めて困難であろう。また、鋳型とともにあらかじめ酵素を内側に導入していたとしても、鋳型除去の過程で操作条件が、一般的にデリケートな酵素にとっては非常に厳しいものであり、酵素は直ちに変性や消失してしまう。高分子ゲルの粒子を鋳型に用いた場合は洗浄のみで鋳型の除去ができるが、シリカ細孔を閉塞させてしまう例がしばしばみられる。これを解決するために、中空粒子を構築するための温和な条件で鋳型除去法を用いた全く新しい調製および酵素内包法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、酵素を変性や失活させずに、ナノサイズの酵素内包シリカカプセル(Enzyme@SiO₂)を調製するための全く新しい方法論を構築することである。具体的には、糖分子が集合したナノ粒子を鋳型に中空粒子をつくるという、申請者独自の方法論を開発および確立することである。

3. 研究の方法

下記の手順で Enzyme@SiO₂ を調製した。

- (1) 酵素を溶解させた糖の水溶液を糖が不要な有機溶媒に加えることで糖を析出/粒子化させ、同時に酵素を共析させて酵素内包ナノ粒子の分散液を調製
- (2) 上記で得たナノ粒子を鋳型にゾル-ゲル法によって均一なシリカ被膜を形成
- (3) 水洗浄により糖のみを除去

糖分子はシリカ細孔よりもはるかに小さいため、容易にカプセル内から溶出する。一方で、酵素はサイズが大きいので、カプセルから漏れ出さず、内側に残存する。

以上のようにして、糖の集積ナノ粒子を一時的なマトリックスに用いて、水洗浄という極めて温和な鋳型除去法を用いて酵素が封入されたシリカカプセルを得た。図1に具体的な操作例として、酵素にGOおよび糖にトレハロース(Tre)を用いてGO@SiO₂を調製したときの概略図を示す。

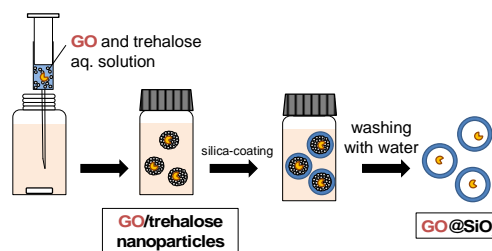


図1 GO@SiO₂の調製方法の概略図

4. 研究成果

(1) GO封入Treナノ粒子の調製

GO含有のTre水溶液を10°Cで激しく攪拌した2-PrOHに加えると、均一な分散液が得られた。静置しても沈殿は全く観察されず、コロイド溶液となった。GOおよびTreはともに2-PrOHに全く溶解しないため、2-PrOHに加えて析出したTre集合体にGOが複合化していることが予想される。得られたGO/Tre複合ナノ粒子を回収し、酵素反応に用いることでGOが含有されているかを見積もった。すると、GOは有意な活性を示した。比較として、Treを用いずにGOを2-PrOHに加えて活性測定を行うと、ほぼ完全に失活していた。これはTreで保護しない場合、GOが2-PrOHにさらされて変性したためと考えられる。

図2に、調製時に用いるTreの濃度とGOの残存活性の関係を示す。濃度が10wt%以上でGOの残存活性は急激に上昇した。この濃度はTreが2-PrOH中で集合体を形成し、ナノ粒子化する濃度と一致しており、ナノ粒子化が酵素活性の維持に必要であることを示している。最終的に、Treの含有率が41%以上で本来の活性の80%の反応活性を示した。Treナノ粒子内にGOが封入/保護され、失活しないことを示している。以上のようにして、GO/Tre複合ナノ粒子が得られた。

(2) GO@SiO₂の調製

さらに、GO/Tre 複合ナノ粒子の分散液中にシリカ源を加えてシリカ膜を形成させた。遠心分離で回収後、水で洗浄してシリカ膜内の Tre 分子を溶出させて、GO@SiO₂を得た。図3にその透過型電子顕微鏡 (TEM) 像を示す。サイズが50-200nm の中空粒子が観察された。膜厚10 nm 以下の被膜を有していた。Tre の集合ナノ粒子を鋳型にシリカが成長して、さらに水洗浄で Tre が除去できたことを示している。水洗浄という、従来と比べて極めて温和な条件で鋳型を除去して中空のナノ粒子が得られたことを示している。

(3) GO@SiO₂の酵素活性

GO@SiO₂を用いて酵素活性を測定した。図4に酵素反応時の反応物の吸光度の時間変化を示す。GO@SiO₂は有意な活性を示すことがわかった。比較として、遠心分離時の上澄みを用いてもほとんど活性を示さなかった。よって、GO@SiO₂内にGOが完全に閉じ込められているが活性を示し、かつカプセル外からの基質は容易に膜を透過してGOと反応していることがわかった。反応速度から酵素の活性を見積もると、カプセル化前のGOと同等であり、カプセル化後もGOが活性を維持していることを示しており、本法によるカプセル化がGOに対して非侵襲的であることを確認した。

以上から、Tre 集合体を一時的な母材に用いると酵素活性を維持したまま、中空粒子に閉じ込めることができることがわかった。

(4) その他の Enzyme@SiO₂の酵素活性

同様の手法により、グルコシダーゼ(GA)およびアルカリフォスファターゼ(ALP)を内包したシリカナノカプセル (GO@SiO₂ および ALP@SiO₂) を調製し、ほぼ失活しないことを確認した。この手法が一般的であり、多様な酵素に適用できることを確認した。

以上のように、酵素をより温和な条件で中空粒子を構築するための全く新しい内包法を独自に開発することができた。Enzyme@SiO₂をワンポットで容易に酵素活性を失わずに調製することができる。Tre 自身はほとんどの酵素に対して非侵襲的であるため多様な酵素に広く適用できると考えられる。今後、DDS など工学的および医学的な応用へと発展することが大いに期待される。

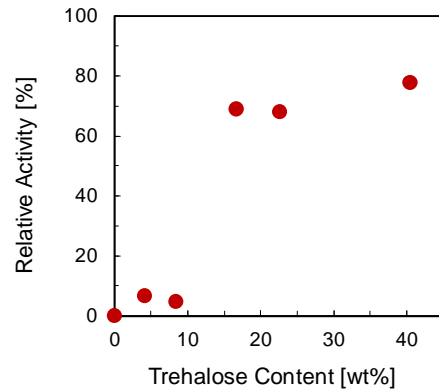


図2 Tre 濃度と GO の残存活性との関係

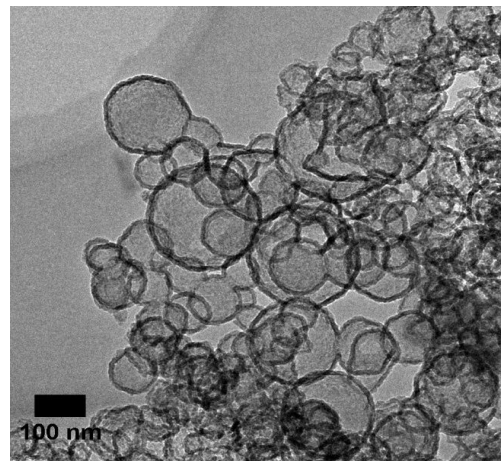


図3 シリカナノカプセルの TEM 像

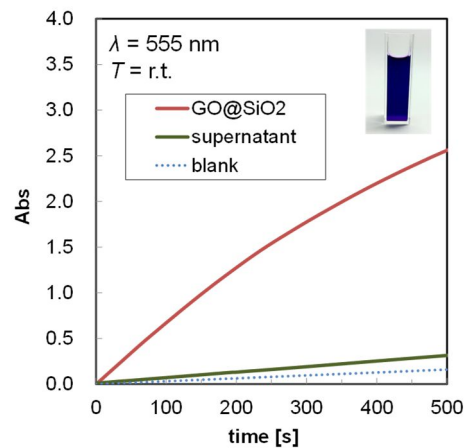


図4 GO@SiO₂ の酵素反応時の吸光度変化(生成物 = 555 nm)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsune Hideki, Ono Tomoya, Yoshida Ryoya, Yamamoto Tsuyoshi, Kishida Masahiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Glutathione-responsive Nanoparticle Consisting of an Amino-functionalized Silsesquioxane Network Cross-linked by Zinc Ions for a Promising Drug Carrier	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.190353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松根英樹, 塩盛弘一郎, 山本剛, 岸田昌浩
2. 発表標題 トレハロース集合体を保護剤に用いて調製した酵素内包カプセル
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideki Matsune, Tomoya Ono, Ryoya Yoshida, Tsuyoshi Yamamoto, Masahiro Kishida
2. 発表標題 Functionalized Silsesquioxane Network Cross-Linked by Zinc Ions for a Promising Drug Carrier
3. 学会等名 2019 Japan-Taiwan-Korea Chemical Engineering Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------