

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21760620

研究課題名（和文） 有機溶媒での高効率利用を目指した次世代型酵素埋包磁性ナノビーズの開発

研究課題名（英文） Fabrication of Enzyme-Nanoparticle Complexes Exhibiting High Enzymatic Activity in Organic Solvents

研究代表者

松根 英樹 (MATSUNE HIDEKI)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：10380586

研究成果の概要（和文）：磁性ナノ粒子やナノワイヤーの表面に有機分子膜を作製し、その膜内に酵素を埋め込むことで、有機溶媒中でも高効率で酵素反応を行うことができる新しい方法を見出した。作製した膜は外側が疎水性、内側が親水性の二層構造を有する。ここで後者の親水膜に酵素を埋め込むことで複合体を有機溶媒中にさらしても酵素周囲は親水的な雰囲気を保つことができる。裸の酵素は有機溶媒にさらすと直ちに変性して失活するのに対し、本研究の方法を用いれば有機溶媒中でも有意な酵素活性を示し、また長期間維持できることもわかった。

研究成果の概要（英文）：I found a new method to promote enzymatic reactions even in organic solvents. Enzyme was embedded in an organic layer that was prepared on nanostructures such as magnetic nanoparticles and nanowires. The organic layer has a bilayer structure consisting of inner hydrophilic and outer hydrophobic properties. The embedded enzyme showed a high activity even after the long-term immersion of the enzyme-nanoparticle complex in organic solvent, because the hydrophilic environment of the organic layer would protect from the deactivation of enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科、細目：プロセス工学，反応工学・プロセスシステム

キーワード：材料合成プロセス，酵素，磁性粒子，酵素反応，有機溶媒

1. 研究開始当初の背景

酵素は穏和な条件下で化学反応を進行させるとともに、反応の基質性選択や位置選択性を有する、非常に優れた触媒である。自然界で酵素は水溶液中で機能しているため、おのずと、酵素の研究や工学的応用の対象も、水溶液中での反応に限られている。しかし、もし有機溶媒中で酵素を機能させることができれば、酵素を活用する場が飛躍的に増大すると予想される。例えば、難水溶性の基質に対しても酵素反応を適用することができる。その結果、酵素を利用した合成法の種類が大幅に増大し、医薬や工学での製品開発に多大な貢献をすると期待される。しかし、酵素は油に加えると直ちに凝集塊となり、変性する。そのため酵素の触媒活性は有機溶媒中で著しく低下してしまう。現在、酵素を有機溶媒中でも高効率で機能させる新しい方法論が必要とされている。

酵素を有機溶媒で利用する学術的な研究例として、逆ミセル法がある。酵素を逆ミセルに埋包し、親水的な環境で安定化しつつ、有機溶媒に均一に分散させる方法である。これによって、酵素を有機溶媒中で反応させることができる。しかし、この手法は酵素の分離・回収が困難であり、反応終了後に生成物を得る段階で酵素や界面活性剤を除去する煩雑な精製操作が必要である。そのため繰り返し利用には向かず、貴重で高価な酵素の利用は一回きりである。また、極性の高い有機溶媒では一般に逆ミセルは形成されないため、非極性の有機溶媒（シクロヘキサンやイソオクタンなど）に利用に限られている。そのため、逆ミセル法の活用範囲は非常に限られている。現在、分離・回収が簡便な方法が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、酵素反応を有機溶媒で高効率に利用する方法論を新たに開拓する。反応後の酵素の分離・精製が容易で、また繰り返し利用を可能にする、新しい担体を開発することが目的である。繰り返し利用と有機溶媒中での長期安定性を有する酵素複合磁性粒子を作製し、次に両親媒性高分子鎖の被覆を経て、回収や繰り返し利用が容易な構造に最適化された担体を開発する。その利用方法を検討する。

3. 研究の方法

図1に示すような構造の磁性粒子やシリカ粒子などのナノ粒子を担体として酵素と複合化させる。すなわち、シリカ被覆磁性ナノ粒子のシリカ層表面から高分子を重合する。この高分子は、内側から順に親水鎖、疎水鎖が並んだ二層構造の有機分子膜である。次に、内部の親水領域に酵素を埋包する。そ

の結果、酵素が親水的な雰囲気中で保護されるため、有機溶媒中でも安定化しつつ、酵素を基質と反応させることができると期待される。図1に示すような構造の酵素複合磁性ナノ粒子を用いることで本目的を達成する。

4. 研究成果

(1) ナノ表面の高分子修飾法と酵素固定化法について検討した。まず高分子被膜を作製するために、磁性シリカナノビーズ、両親媒性の有機分子を修飾した。また、表面に開始剤を固定してから両親媒性の高分子を生長した。磁性シリカナノビーズの表面にあるアミノ基に、 β -グルコノ-1,5-ラクトンを介して、重合開始剤である、2-ブromo-イソブチル基を修飾した。次に、銅のピピリジル錯体を触媒に、親水性モノマーの2-ヒドロキシエチルアクリレート(HEA)を重合し、疎水性モノマーであるメチルメタアクリレート(MMA)を生長して、親水層と疎水層の二層構造からなる高分子被覆層を作製した。隣接高分子同士を架橋し、内部のシリカをHFで溶解することで、高分子カプセルが得られた。このカプセルは有機溶媒に分散し、また、内部に水を取り込むことができることもわかった。以上の結果から、外部が疎水性ならびに内部が親水性の新規の二層構造カプセルを初めて合成できたことを確認した。

(2) 表面に両親媒性の被膜した磁性粒子を乾燥し、酵素(ラッカーゼ)水溶液に浸すことで両親媒性の被膜内部に酵素を埋包した。

(図2) 真空中で乾燥した後、有機溶媒に分散させた。表面を両親媒性化合物で被覆した場合、有機溶媒にも高い分散性を示すことがわか

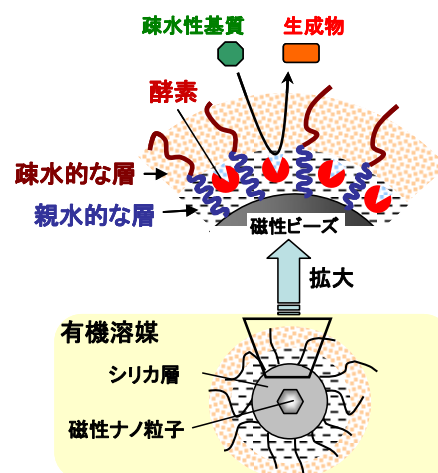


図1 有機二重膜被覆磁性ビーズに酵素を固定化した酵素複合磁性ナノ粒子 (青い波線 ; 親水鎖、赤い波線 ; 疎水鎖)。

った。(図3) 2,6-ジメトキシフェノールを基質に酵素活性を調べると有意な酵素活性を示すことがわかった。様々な鎖長の親水性高分子を作製し、酵素を取り込んだときの酵素の残存活性との関係調べた。その結果、酵素のサイズと同程度の長さのとき、最大の酵素活性を示すことがわかった。本研究は、酵素を有機溶媒中で有効利用するための新しい方法論を提案するものである。本手法は簡便で、様々な酵素に対して適用できると考えられ、大変意義深いものであると考えている。

(3) 親水/疎水の表面被覆層を有する新規な構造の磁性ナノビーズを設計し、実際に作製することに成功した。そこで今年度は、このビーズを利用して研究を進めた。酵素を埋包し、有機溶媒中で高い酵素活性を発現させることを検討し、ナノビーズの最適な構造や酵素固定化法などを様々な条件を検証した。その結果、表面の化学修飾は、酵素が存在できる空間を確保しつつ、適切な密度で表面修飾することが分かった。また、酵素を固定化するには有機溶媒と水溶媒の二相系を用い、酵素を水溶媒に分散させつつ、粒子を有機溶媒に分散させて、酵素を取り込むことが重要であることを見いだした。このようにして作製した酵素複合化ナノビーズを用いて、有機溶媒中での酵素活性を調べた。その結果、クロロホルム中に浸した後も酵素活性を示し、12時間経過後も失活しないことが分かった。(図4) 以上のようにして、有機溶媒でも酵素活性を発現するビーズを作製することに初めて成功した。

(4) 構造設計の最適化を進め、中央が親水性の高分子ゲルからなる粒子も作製し、有機溶媒中での酵素活性を発現させることに成功した。さらに、流通式反応器への適用も検討した。圧力損失を防ぐために担体の形状は、球状の代わりにファイバー状のナノ構造体を利用した。銀などのファイバー状ナノ構造体を合成し、表面を化学修飾することにも成功した。このような担体を用いれば、濾過などで回収が容易であり、また流通式管形反応器への応用も非常に容易になるため、非常に重要である。

以上のように、酵素を有機溶媒中で利用するための新しい方法論を構築した。酵素は人工の触媒と比べて非常に優れた特性を示すものが多く、本研究のようにして、酵素を簡便に有機溶媒中での反応に転用し、容易に回収することができれば、酵素を適用できる反応経路が飛躍的に増大すると予想される。本研究で得られた結果は、学術的に意義深く、また工学的にも非常に重要な知見である。

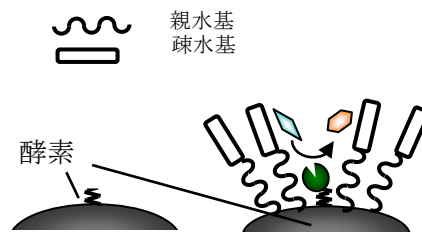


図2 調製した酵素固定化ナノ粒子の表面構造の模式図(左)コントロール、(右)有機分子膜を有する新規ナノ粒子。

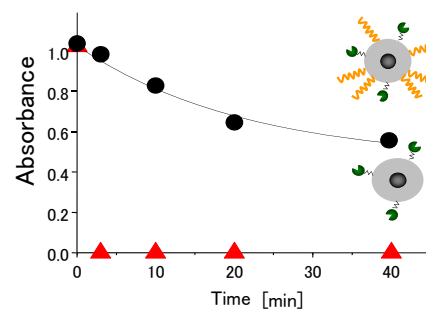


図3 シクロヘキサン中でのナノ粒子の分散性を評価するための吸光度の時間変化。

(●) 有機分子で表面を修飾したナノ粒子、
(▲) 表面を有機分子で修飾していないナノ粒子。

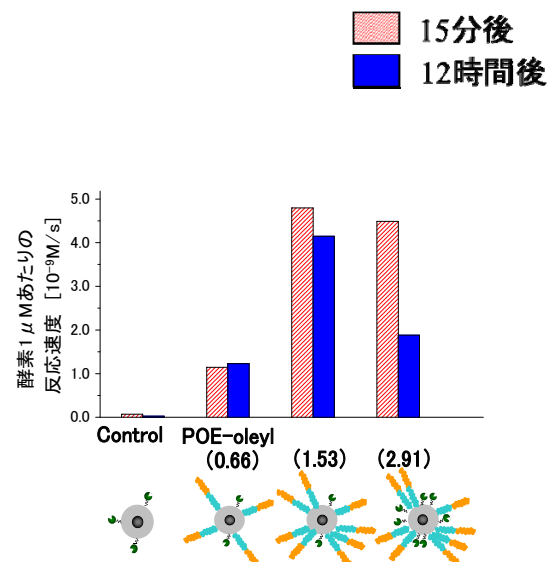


図4 クロロホルムに接触した後の残存活性。()内は修飾分子の密度[個/nm²]。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

① Hideki Matsune, Daisuke Sakurai, Ozora Baba, Sakae Takenaka, Masahiro Kishida, "Synthesis and Properties of Nanocapsule with Shell of Amphiphilic Layer", 査読無, Proceedings of China and Japan Symposium on Chemical Engineering, 2011, *in press*.

② Hideki Matsune, Yudai Kuramitsu, Sakae Takenaka and Masahiro Kishida, Chemical Synthesis of Silver Nanowires using N,N-Dimethyldodecylamine Oxide, 査読有, *Chem. Lett.*, 39 巻, 2010, pp. 717-719.

③ Hideki Matsune, Daisuke Sakurai, Sakae Takenaka, Masahiro Kishida, Synthesis of Hollow Nanospheres Consisting of Amphiphilic Block Copolymers, 査読有, *Chem. Lett.*, 38 巻, 2009, pp. 746-747.

[学会発表] (計 55 件)

① 松根 英樹, 櫻井 大輔, 馬場 大空, 竹中 壮, 岸田 昌浩, 北堀 かずみ, 藤井 優子, 両親媒性分子の架橋による高分子ナノカプセルの合成とその特性, 化学工学会第 76 年会, 2011.

② Yudai Kuramitsu, Hideki Matsune, Takenaka Sakae, Masahiro Kishida, New Synthesis Method for Silver Nanowires Using N,N-dimethyl dodecylamine N-Oxide, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010.

④ Hideki Matsune, Yudai Kuramitsu, Kyoso Masuda, Sakae Takenaka, Masahiro Kishida, Chemical Synthesis of Silver Nanowires Using Tertiary Amine N-Oxides, 9th Korea-Japan Symposium on Materials & Interfaces, 2010.

⑤ 増田 恭三, 倉光雄大, 松根 英樹, 竹中 壮, 岸田 昌浩, ドデシルジメチルアミンオキシドを用いた銀ナノワイヤーの調製, 第 3 回化学工学 3 支部合同徳島大会, 2010.

⑥ 馬場 大空, 櫻井 大輔, 松根 英樹, 竹中 壮, 岸田 昌浩, シリカナノ粒子表面におけるリビングラジカル重合反応と高分子ナノカプセルの合成, 第 3 回化学工学 3 支部合同徳島大会, 2010.

⑦ 馬場 大空, 竹中 壮, 松根 英樹, 岸田 昌浩, 高分子ナノカプセル用原料のリビングラジカル重合, 第 47 回化学関連支部合同九州大会, 2010.

⑧ Yudai Kuramitsu, Hideki Matsune, Takenaka Sakae, Masahiro Kishida, New Route for Synthesis of Silver Nanowires, The 2010 Global COE International Symposium on Future Molecular Systems - Beyond Supramolecular Chemistry, 2010.

⑨ 増田 恭三, 竹中 壮, 松根 英樹, 岸田 昌浩, ドデシルジメチルアミンオキシドを用いた銀ナノ構造体の調製, 第 12 回化学工学会学生発表会(福岡大会)【西日本地区】, 2010.

⑩ 倉光 雄大, 松根 英樹, 竹中 壮, 岸田 昌浩, New synthesis method for silver nanowires by use of alkylamine-N-oxide, 第 21 回化学工学に関する国際シンポジウム, 2009.

⑪ 倉光 雄大, 松根 英樹, 竹中 壮, 岸田 昌浩, アミンオキシドを用いた銀ナノワイヤーの新規合成法の開発, 日本化学会西日本大会 2009, 2009.

⑫ 櫻井 大輔, 松根 英樹, 竹中 壮, 岸田 昌浩, Synthesis and Extraction of Hollow Nanospheres Consisting of Amphiphilic Block Copolymers, The 2009 Global COE International Symposium for Future Molecular Systems, Fukuoka, Japan, 2009.

⑬ 倉光 雄大, 松根 英樹, 竹中 壮, 岸田 昌浩, アルキルアミン N-オキサイドを用いた銀ナノワイヤーの合成, 化学工学会 第 41 回秋季大会, 2009.

⑭ 松根 英樹, 竹中 壮, 岸田 昌浩, 酵素固定化微粒子の開発と有機溶媒中での反応, 化学工学会 第 41 回秋季大会, 2009.09.17.

⑮ 櫻井 大輔, 松根 英樹, 竹中 壮, 岸田 昌浩, Preparation of Nanocapsule with Double Layer for Particle Synthesis Process, 第 5 回日中化工シンポジウム, 2009.

[図書] (計 1 件)

松根英樹, 櫻井大輔, 竹中壮, 岸田昌浩, 化学工学会九州支部若手ケミカルエンジニア連絡会, 「若手研究者の大きな可能性を秘めた研究開発」, 2009, pp.1-5.

[その他]

ホームページ

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002595/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松根 英樹 (Hideki Matsune)

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 10380586