

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710153

研究課題名（和文） 酵素固定化マイクロリアクターを用いる高分子の精密合成技術

研究課題名（英文） Synthetic Technique of Polymers using Enzyme-immobilized Microreactors

研究代表者

山口 浩（YAMAGUCHI HIROSHI）

東海大学・阿蘇教養教育センター・講師

研究者番号：00466236

研究成果の概要（和文）：本研究では、酵素とポリリジンの複合体を分子間架橋することで、ラッカーゼ酵素固定化マイクロリアクターを開発した。この固定化ラッカーゼは酵素活性を保ったまま、繰り返し再利用が可能であった。また、得られたラッカーゼ固定化マイクロリアクターは酵素反応を利用した高分子合成の技術開発に応用した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we developed laccase-immobilized microreactor by using cross-linking of complex of enzyme and poly-lysine. The immobilized laccase maintained its catalytic activity after used several times. We also applied this laccase-immobilized microreactor to develop the polymer synthesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：酵素固定化、マイクロリアクター、高分子合成

### 1. 研究開始当初の背景

生体内では様々な生理活性物質が酵素反応により効率よく合成されている。近年、環境調和という観点から、有機化合物合成における反応触媒として酵素の利用が考えられている。しかしながら、酵素はタンパク質であるため、その構造安定性に問題があり、酵素の触媒活性を損なわずに長時間もしくは再利用が可能な酵素の技術開発が望まれている。

マイクロリアクターは微小な空間において化学反応を効率よく行えるため、次世代型の反応デバイスとして期待されている。近年、酵素触媒反応のマイクロリアクターへの適用に関する研究は広く行われている。酵素をマイクロリアクター内に固定化する方法では、①高濃度の酵素を反応場に提供できる事、②反応生成物と酵素の単離が容易である事、などの特徴を生かせるため、合成化学や分析

化学の分野でその技術開発が進められている。しかしながら、安定な一部の酵素を除いて、一般的に固定化の際の化学修飾による酵素分子の立体構造変化がもたらす、触媒活性の低下・機能喪失が大きな問題となる。

研究代表者はこれまで、酵素分子間を多価の架橋剤で架橋して凝集させる技術に応用し、マイクロチャネル表面に触媒機能を低下することなく、酵素を固定化する技術開発を行ってきた。また、この方法に応用し、ポリリジンを共存させることにより種々の酵素をマイクロチャネル表面へ固定することを可能とした。加えて、異なる酵素を固定化したマイクロリアクターを連結することで、これまでの酵素溶液反応では不可能と考えられる多段階の酵素反応システムの開発を行い、これらの酵素固定化技術とそれを利用したマイクロリアクターの有用性を示した。

一方、合成高分子は現代の我々の生活には

なくてはならない物の一つと考えられる。ポリペプチドやポリアミノ酸などは、生物分解性や生物適応性等の面で優れており、学術的・産業的に注目されている。また、ポリアクリル類は現代生活には必須の合成高分子の一つであり、年間数千トンが生産されている。工業的には有機過酸化化合物やジアゾ化合物を利用した有機合成により行われているが、環境調和という観点では環境への安全性の改善が望まれている。

近年、酸化酵素であるラッカーゼを有機合成の触媒とした応用研究が行われている。ラッカーゼによる基質の酸化反応は2段階で行われる。ラッカーゼは酸素を用いて、フェノール類を酸化しラジカル分子を生成する。このラジカル分子が基質分子と反応する。この反応では副生成物として水のみが生成される。その為、環境にやさしい合成反応と考えられる。ラッカーゼを利用した高分子合成への取り組みが行われている。この場合、ラジカル分子は高分子の主鎖にまた、基質分子は側鎖に対応する(図1)。しかしながら、ラッカーゼ酵素溶液を用いた反応では他の酵素と同様にその構造安定性が低い為、長時間・繰り返し利用が難しい事、モノマー分子がラッカーゼの触媒活性を阻害するなどの問題点があり、実用化には至っていなかった。

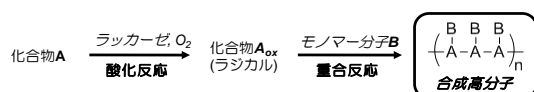


図1: ラッカーゼによる高分子合成

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が行ってきた分子架橋技術を発展させ、酵素をマイクロチャネル表面へ固定化することで、長時間・繰り返し再利用が可能なラッカーゼ酵素固定化マイクロリアクターを開発する。また、このラッカーゼ固定化マイクロリアクターを利用して、高効率な高分子合成の技術開発(図2)を目的として研究を行った。

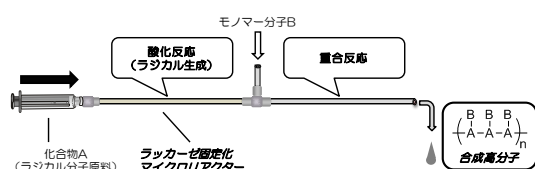


図2: ラッカーゼ固定化マイクロリアクターを用いた高分子合成システム

## 3. 研究の方法

### (1) ラッカーゼ固定化マイクロリアクターの作製

ラッカーゼの触媒活性を保持した高効率な固定化条件の確立するため、酵素の固定化条件を検討した。ここではポリリジンのサイズ及び、架橋剤であるホルムアルデヒド(PA)とパラホルムアルデヒド(GA)の使用濃度を検討し、その結果をもとにマイクロリアクターを作製した。各検討実験において、ラッカーゼ酵素の活性評価にはABTS(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))を基質として用い、その吸光度変化を96穴タイタープレートリーダーにより評価した。

この結果をふまえて、マイクロリアクターの作製を行った。操作にはこれまで開発・利用している二重管構造のデバイスを用いた。

### (2) ラッカーゼ固定化マイクロリアクターによるポリアクリルアミド合成

高分子合成では、固定化ラッカーゼにより調製したラジカル分子とモノマー分子の重合反応を混合速度および、温度等で調節することで目的の高分子の分子量の作り分けを行い、酵素固定化マイクロリアクターによるポリアクリルアミドの合成を検討した。ラジカル分子はアセチルアセトン(ACP)を基質として調製した。モノマー分子にはアクリルアミド(AA)を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 平成23年度

初年度は、ラッカーゼ酵素の固定化条件を確立した。酵素の等電点(pI)は一般的にpI=4~6であり、効率のよい酵素の固定化にはポリリジンを必要とする。固定化条件を最適化するため、異なるサイズのポリリジン2種を用い、固定化率および触媒活性を比較した。加えて、架橋剤の濃度が高い場合は固定化率が高いが活性低下が起りやすい、一方、低い架橋剤濃度では活性は保持されるが固定化率は低くなることから考えられるため、固定化反応の架橋剤濃度の最適化も合わせて行った。これらの実験はサンプルチューブ内で行い、迅速に比較・検討した。また固定化されたラッカーゼの触媒活性評価には合成基質を用い、その吸光度変化を96穴タイタープレートリーダーにより評価した。

分子量が70,000のポリリジンを用いた場合、ラッカーゼ酵素とポリリジンの複合体形成が迅速に起こった。このことはマイクロリアクター作製時に、内径が500マイクロメートルのテフロンチューブ内壁への均一な固定化が不可能であると予想された。改善策として、分子量が4,000のポリリジンを使用し、

複合体形成速度を遅くした。加えて、高濃度の架橋剤濃度はラッカーゼ酵素活性に影響することを確認した (図3)。

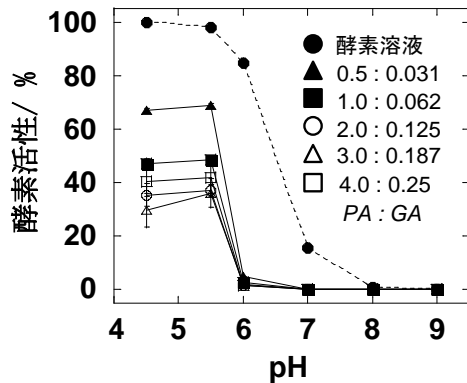


図3: 架橋条件の異なる固定化ラッカーゼの安定性

これらの結果をもとに、ラッカーゼ固定化マイクロリアクター作製に最適な固定化条件を決定し、マイクロリアクターの作製を行った。操作にはこれまで開発・利用している二重管構造のデバイスを用いた (図4)。ラッカーゼ固定化マイクロリアクターの触媒活性は ABTS を用いて評価し、サンプルチューブ内での固定化酵素と同様に触媒活性を保持していることを確認した。

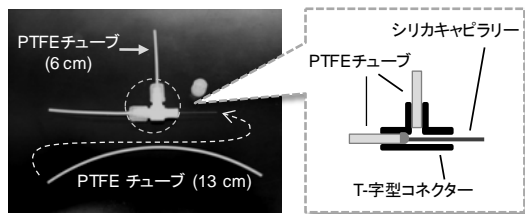


図4: 酵素固定化用二重管構造デバイス

(2) 平成 24 年度

最終年度は、初年度に作製したラッカーゼ固定化マイクロリアクターを用いた高分子合成を行った。合成高分子の数平均分子量および分子量分布は、反応温度に依存すると考えられたため、まず、マイクロリアクターの熱安定性を評価した。しかしながら、溶液状態の酵素よりも熱安定性が低下した。これは、酵素固定化時に用いた還元反応がラッカーゼの活性中心に存在する銅イオンへ影響したためと考えられた。そこで、還元反応を行わない条件で再度ラッカーゼ固定化マイクロリアクターを再度作製した。その結果、ラッカーゼ固定化マイクロリアクターは架橋

反応による失活は見られず、酵素活性を保持していた。また、溶液状態の酵素よりも優れた熱安定性を示した。

このマイクロリアクターをポリアクリルアミドの合成へ利用した。ラジカル分子はアセチルアセトンを経験して調製し、モノマー分子にはアクリルアミドを用いた (図5)。

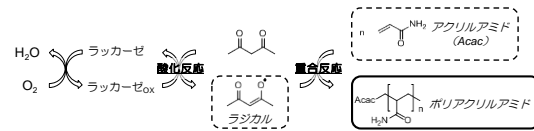


図5: ラッカーゼによるポリアクリルアミドの合成スキーム

モノマー分子であるアクリルアミドはラッカーゼによるラジカル分子生成後、T字型のコネクタを用いて、リアクター内に流入させた (図6)。この方法を用いることにより、①ラッカーゼの触媒作用を阻害するモノマー分子を酵素と隔離できる、②重合反応は高温で行うが、酵素の熱変性の可能性が低いなどの利点があった。加えて、重合反応では溶存酸素がその反応効率を低下させる可能性があったため、モノマー分子溶液を脱気することで、酸素濃度を低く抑え、反応効率を向上させた。

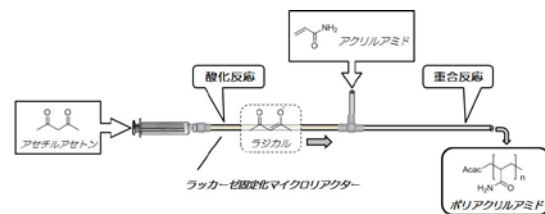


図6: ラッカーゼ固定化マイクロリアクターによるポリアクリルアミド合成

このラッカーゼ固定化マイクロリアクターを用いた合成システムを用いて、目的物であるポリアクリルアミドの生成を確認した。また、モノマー分子の流入速度、反応温度、重合反応部のチューブの長さおよび内径を調節することにより、合成高分子の数平均分子量および分子量分布が制御可能であることを見出した。

## 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5件)

- ① H. Yamaguchi, M. Miyazaki,  
“Enzyme-immobilized reactors for  
rapid and efficient sample preparation  
in MS-based proteomic studies”、  
*Proteomics*、査読有、13巻、2013年、  
457-466
- ② Y. Asanomi, Y. Koga, H. Yamaguchi, M.  
Miyazaki, T. Nose, H. Kodama, and H.  
Maeda, “Protease-immobilized  
microreactor for rapid and  
site-specific affinity Tag  
cleavage”、*Peptide Science 2011*、査  
読有、2012年、395-396
- ③ H. Yamaguchi, M. Miyazaki, and H. Maeda,  
“Simple and rapid proteomic analysis  
by protease-immobilized  
microreactors”、*Integrative  
Proteomics* (Leung E. ed)、査読有、2012  
年、93-110
- ④ Y. Asanomi, H. Yamaguchi, M. Miyazaki,  
and H. Maeda, “Enzyme-immobilized  
microfluidic process reactors”、  
*Molecules*、査読有、2011年、16巻、  
6041-6059
- ⑤ H. Yamaguchi, M. Miyazaki, Y. Asanomi,  
and H. Maeda, “Poly-lysine supported  
cross-linked enzyme aggregates with  
efficient enzymatic activity and high  
operational stability”、*Catal. Sci.  
Technol.*、査読有、2011年、1巻、  
1256-1261

[学会発表] (計3件)

- ① 山口 浩ほか、マイクロ化学デバイスを用いた効率的アフィニティータグ切断法の開発、平成24年度 日本生化学会九州支部例会、2012年5月26日、福岡市
- ② 山口 浩ほか、Laccase-immobilized microreactors for the removal of estrogenic compounds、第25回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2012年5月17日、熊本市
- ③ 山口 浩ほか、酵素架橋凝集体の触媒能と安定性解析、第48回 化学関連支部合同九州大会、2011年7月9日、北九州市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 浩 (HIROSHI YAMAGUCHI)  
東海大学・阿蘇教養養育センター・講師  
研究者番号：0466236