

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25600062

研究課題名(和文)局在的酵素反応で駆動する自律泳動微粒子の創製

研究課題名(英文)Preparation of Bioactive Janus Particles using Hydrogel Templates

研究代表者

成田 貴行(Narita, Takayuki)

佐賀大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30423560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：基質応答性を有する走化性粒子の調製を行いこの走化性の検証を行った。軌跡からは大きい運動の挙動の違いは確認できなかった。反応物濃度が低い際と高い際にはほとんど差異がみられなかった。角度変化の自己相関プロットからは、反応物濃度及の際、相関係数は生産物濃度が高くなるにつれ大きくなることが分かった。結果、反応物濃度の増加に応じて若干の移動速度増加と指向性の向上が確認できた。強い指向性と活発な泳動を示さなかった理由として、基質応答の速度が小さいため、泳動に十分な表面張力差を生産できていないことが考えられる。また、ブラウン運動に伴う擾乱により方向が乱されたことは水槽温度の違いより明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to prepare bioactive Janus particles with two different bio-active parts via two methods using combination of alginate gel and gelatin gel, which immobile two proteins located in each gels separately. From the two-tone figure of fluorescence micrograph, Janus particles successfully prepared by the one for one emulsion collision methods, because the part of alginate gel particle was only FITC-labeled and yield fluorescence. In the enzyme assay for the immobilized glucose oxidase and catalase, we confirmed in both of particle systems that pH decrease was observed in the glucose solution and oxygen generate in the hydrogen peroxide. The results demonstrate that physical immobilization using polysaccharide and gelatine gel is reasonable to maintain high enzyme activities.

研究分野：コロイド

キーワード：走化性 JANUS状粒子

### 1. 研究開始当初の背景

現在研究、利用されている患部標的型薬剤は、特定部位への物理的沈積利用する技術がほとんどで、一方、好中球に代表される白血球や精子などの鞭毛を持つ単細胞等は、目的物に泳動する能力とターゲットからのシグナルを感知する能力があるため、能動的且つ正確に標的へ目的物質を届けることが可能である。近年、金と白金からなる触媒微粒子が、過酸化水素濃度を感知し、自発的に目標物に到達できる性質（走化性）を持つことが明らかになった。人工的にナノマイクロスケールの物質を目的先に輸送する技術としては、キネシンを利用した輸送システムの構築が有名だが、目標への担体を導くためには予めアクチンレールを敷く必要があり実現的な輸送デバイスではない。この触媒ナノモーターは鞭毛モーターを持つ単細胞のように、分子を認識が可能で、且つレールを使用しないで目標物に確実に到達できる。このため、実現的なナノマイクロレベルでの輸送デバイスとして、将来大きく発展すると予想されている。申請者は、適切な組み合わせを持った酵素を一つの微粒子中に局在化して固定できれば、この触媒ナノモーター同様に、特異的な基質を分泌する細胞にターゲティング能力（走化性）のある粒子を構築できると着想した。

### 2. 研究の目的

酵素を高活性なまま適材適所に配置したマイクロ微粒子を作製する技術の確立。および酵素の基質分子濃度多い領域へ走化する能力を持つ微粒子の構築

### 3. 研究の方法

(1) バイオポリマーを用いた酵素固定化法は、失活の少ない固定化法として知られている。本研究ではバイオポリマーゲルをマトリックスとする酵素固定 JANUS 微粒子の調製法の確立を目的として、アルギン酸カルシウムゲルとゼラチンゲルを微粒子の基材とする酵素固定化 JANUS 粒子の調製を試みた。酵素としてはグルコース酸化酵素であるグルコースオキシターゼと過酸化水素を分解するカタラーゼを各々の基材に含有した JANUS 粒子を調製し、その活性を評価した。

(2) 樟脳船が水面を自律的に泳動できることをヒントに、酵母からによって作られるエタノールを樟脳のように利用できれば、基質を駆動エネルギーとして泳動する微粒子が可能であると着想し、酵母から生産される生成物によって自律的に泳動が可能かどうかを検討するために、発泡スチロール粒子に酵母を附着させ粒子の調製を行い、その泳動性の検証を行った。

### 4. 研究成果

(1) バイオポリマーゲルをマトリックスとする酵素固定 JANUS 微粒子の調製法の確立：アルギン酸カルシウムゲルとゼラチンゲルを

微粒子の基材とする酵素固定化 JANUS 粒子の調製を試みた。酵素はグルコース酸化酵素であるグルコースオキシターゼと過酸化水素を分解するカタラーゼを各々の基材に含有した JANUS 粒子を調製し、その活性を評価した。グルコースオキシターゼを含む FITC 標識アルギン酸ナトリウム水溶液を水相としたシクロヘキサノール W/O エマルジョンと、カタラーゼを含むゼラチンカルシウム水溶液を水相としたクロロホルム W/O エマルジョンを調製、溶媒の比重の違いを利用することで、二つのエマルジョンを界面で接触させる界面衝突法と、ナイロンメッシュをテフロン基板上におき、アルギン酸エマルジョンとゼラチンエマルジョンを接触させるメッシュ固定化法の二つの方法を JANUS 粒子化の方法として粒子を調製した。JANUS 形状の粒子を評価するため、明視野での顕微観察と蛍光での顕微観察を行った。また、酵素の活性を確認するため、二つの方法で調製した粒子を其々に反応させ、0.1 M グルコース溶液中でのグルコン酸の生成に伴う pH の低下と、過酸化水素水中での酸素の生成の確認を行った。図 1 は調製した粒子の明視野観察像および、蛍光観察像を示している。一つの粒子内に明暗が異なる二領域が観察されており、片側の領域のみ蛍光を有することを確認した。

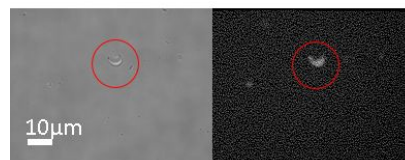


図 1.メッシュ法により調製した JANUS 粒子 (明視野観察像(上)蛍光観察像(下))

蛍光側部分はゼラチンと接触したことでゲル化した FITC 標識アルギン酸ゲルであり、この結果より JANUS 粒子化に至っていることを確認できた。両方法で JANUS 形状の粒子を観察できたが、メッシュ固定法で得た粒子に二領域に局在化した形状の JANUS 粒子を多く観察できた。調製した粒子を 0.1 M グルコース溶液中に添加した際には、pH4 迄低下し、また、過酸化水素水に添加した際には、酸素の発生を確認した。これらの結果は、異なるバイオポリマーゲルを二領域に持つ JANUS 粒子が酵素活性を保った状態で得られたことを示している。調製した JANUS 型粒子の挙動をグルコースの濃度勾配中で観察をしたところ、 $25 \pm 2 \text{ nm}^2/\text{s}$  の速度でグルコース濃度の高い方向へ移動する挙動を観察された。酵素を含まない粒子、もしくはグルコース濃度の勾配の無い場合にはブラウン運動のみ観察された、以上の結果より調製した JANUS 型粒子は酵素反応によりグルコースを感知し自律的に泳動した可能性が示唆された。

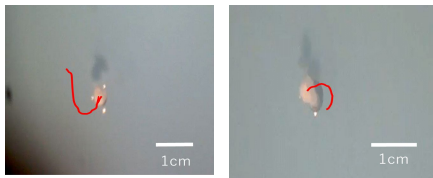


図 2 泳動軌跡(左:基質濃度 3 wt%  
右:30 wt%)

(2)樟脳船が水面を自律的に泳動できることをヒントに、酵母から生成される生成物を樟脳のように利用できれば、糖を駆動エネルギーとして泳動する微粒子が可能であると着想した。本研究では、酵母を含んだ粒子が、自ら生成する生成物によって自走が可能かどうかを検討するために、発泡スチロール粒子に酵母を付着させシステムにより、走化性粒子の調製および走化性の検証を行った。図 2 は調製した粒子の異なる基質溶液中での泳動軌跡(水温 30 )を示している。軌跡からは大きい運動の挙動の違いは確認できなかった。基質濃度 3 wt% のとき、平均速度は 10mm/min であった。基質濃度 30 wt% のとき、平均速度は 11mm/min であった。また、其々の条件における角度変化の自己相関プロットを取ると、基質濃度 3 wt% 及び 30 wt% の際、相関係数  $R^2$  はそれぞれ 0.00 及び 0.14 であった。結果、基質濃度の増加に応じて若干の移動速度増加と指向性の向上が確認できた。樟脳舟のような強い指向性と活発な泳動を示さなかった利用として、酵母の活動速度が小さいため、泳動に十分な表面張力差を生産できていないことが考えられる。また、ブラウン運動に伴う擾乱により方向が乱されたことは水槽温度の違いより明らかになった。

#### 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 1 件)

T. Suga, S. Osada, T.Narita, Y. Oishi, H.Kodama, Promotion of cell adhesion by low-molecular-weight hydrogel by Lys based amphiphile. Materials Science and Engineering C,47, 345-350 (2015)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. A Study of alginate-gelatin Janus particles having enzyme activities; 2015 年 12 月 The 6th Joint Seminar between Saga University and Liaoning University. Tokunaga Shota, Yushi Oishi and Takayuki Narita
2. Preparation of Bioactive Janus Particles Using Biopolymer Templates ; 2015 年 11 月 ACCIS 2015, Shota Tokunaga, Yushi Oishi, Takayuki Narita

3. バイオポリマーをマトリックスとする JANUS 型粒子の調製; 2015 年 01 月; 平成 26 年度 物理化学インターカレッジセミナー; 徳永 翔太・成田 貴行・大石 祐司
4. Design of Biopolymer Particles with the Ability to Induce Chemotaxis; 2014 年 11 月; The 9th Saga University-Daegu University Joint Seminar ( International Seminar); Tokunaga Shota, Ayaka Hashimoto, Takayuki Narita, Yushi Oishi
5. バイオポリマーゲルをマトリックスとした酵素固定型 JANUS 粒子の調製; 2014 年 09 月; 第 63 回高分子討論会; 徳永 翔太・成田 貴行・大石 祐司
6. バイオポリマーゲルからなる JANUS 型粒子の調製; 2014 年 06 月; 第 51 回化学関連支部合同九州大会; 徳永 翔太、成田 貴行、大石 祐司
7. Preparation of alginate-chitosan and alginate-gelatin Janus particles with enzyme activities; 2013 年 11 月; 2013 Kyushu-Seibu/Pusan-Kyeongnam Joint Symposium on High Polymers (16th) and Fibers (14th); Syouta Tokunaga, Ayaka Hashimoto, Takayuki Narita, Yushi Oishi
8. キトサンとアルギン酸ナトリウムゲルからなるヘテロ微粒子の調製; 2013 年 07 月; 第 50 回化学関連支部合同九州大会; 徳永翔太, 橋本彩香, 成田貴行, 大石祐司

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 機能性カプセル

発明者: 成田貴行, 大石祐司, 本田貴浩

権利者: 佐賀大学

種類: 特願

番号: 2015-252632

取得年月日: 2015/12/24

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 成田貴行

(NARITA, takayuki)

佐賀大学 工学系研究科・准教授

研究者番号: 30423560

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号：