

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410107

研究課題名(和文) 光駆動型有機・無機ハイブリッドナノ空間を用いたバイオリアクターの創製

研究課題名(英文) Construction of Bioreactors Based on Light-Driven Organic/Inorganic Hybrid Nanospaces

研究代表者

亀田 直弘 (Kameta, Naohiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能化学研究部門・主任研究員

研究者番号：20517297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：光応答性ユニットとしてアゾベンゼンを有する脂質分子の単層単分子膜構造から成るナノチューブに酵素を安定に貯蔵することが出来た。ナノチューブの両端を磁性ナノ粒子でキャッピングすることで、酵素の流出防止だけでなく、酵素触媒反応後のナノチューブの磁気分離回収が可能であった。紫外光照射によるアゾベンゼンユニットのトランス→シス構造異性化は、ヘリカルナノコイルへの形態変化を誘起し、基質の取り込みを促進、触媒反応をONとした。続く可視光照射によるアゾベンゼンユニットのシス→トランス構造異性化は、ナノチューブへと形態が戻り、触媒反応がOFFとなった。光刺激により制御可能な酵素リアクターの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Monolayer nanotubes, which are formed by self-assembly of synthetic lipids having an azobenzene as a photoresponsive unit, were able to stably store enzymes in the nanochannels. The both end capping of the nanotubes with magnetic nanoparticles enabled us to not only prevent the release of the encapsulated enzymes but also magnetically recover the nanotubes from the reaction solutions. Such bioreactors composed of the organic/inorganic hybrid nanotubes and enzymes were controllable by an external light stimulus. The trans-to-cis isomerization of the azobenzene unit via UV irradiation led to start the enzymatic reaction based on the morphological transformation from the hybrid nanotubes to helical nanocoils with gaps for connecting of the nanochannels to the bulk solutions including substrates. The cis-to-trans reversal isomerization via VIS irradiation quenched the enzymatic reaction as the result of the morphological transformation from the helical nanocoils to the hybrid nanotubes.

研究分野：ナノ構造化学

キーワード：バイオリアクター 酵素 自己組織化 ナノチューブ ナノ粒子 有機・無機ハイブリッド 光駆動 アゾベンゼン

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の化学反応を特異的かつ高収率・高選択に進行させる酵素が、化学工業分野における省エネルギー・環境低負荷型の触媒として、グリーンイノベーションの観点から大きな注目を集めている。実際、酵素をマイクロ流路、高分子ゲル、マイクロカプセル、セラミックス、多孔質、不織布などの担体へ固定化した種々のバイオリクターが開発されている。固定化には、I：酵素と担体を共有結合、イオン結合、物理吸着によって結合させる、II：架橋剤によって酵素同士を架橋させる、III：カプセル内の空間、ゲル内のファイバー同士が形成する空隙に酵素を包接させる、などの方法がある。しかしながら、IとIIの方法では化学構造変化、及び立体構造変化に起因する酵素の変性が懸念されている。また、IIIの方法によって作製されたリアクターでは、担体内の空間に固定化された酵素への基質の拡散が遅いため、反応速度が減少するなどの問題があった。

一方申請代表者はこれまでに、デザインした両親媒性分子を液相中で自己組織化させることで形成する有機ナノチューブの開発を独創的に展開してきた。その結果、有機ナノチューブの口径サイズ制御、内外表面の選択的機能化などを世界に先駆けて達成した。これにより、有機ナノチューブのナノチャンネルへの薬剤等の低分子、タンパク質・酵素やDNA等の生体高分子、ナノ粒子の効率的且つ選択的包接化に成功するだけでなく、それら包接化物質を pH や温度、光などの外部刺激を利用してナノチャンネルから放出させることにも成功している。タンパク質・酵素は、高温、高圧、強酸性、強アルカリ性などの条件下、塩酸グアニジンや尿素などの変性剤共存下、そして有機溶媒中では、変性によって容易に触媒活性を失う。これに対して、タンパク質・酵素を包接化により有機ナノチューブのナノチャンネルに強く拘束することで、熱変性や化学変性を著しく抑制し、活性を安定化できるという注目すべき現象も見出している。さらにナノチャンネルが、変性したタンパク質・酵素を正常な状態へと回復(リフォールディング)させる場として機能をすることも明らかにしている。なお、有機ナノチューブ自身の耐熱性・耐圧性・耐 pH 性は、両親媒性分子の分子デザインで制御可能である。これらの結果は、バイオリクター創製において、有機ナノチューブが酵素固定化用担体として有用であることを示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

両親媒性分子の自己組織化により形成可能な有機ナノチューブに対し、酵素の包接化、磁性ナノ粒子(酵素の流出防止、反応終了後の有機ナノチューブと目的生成物の磁気分離回収が目的)によるエンドキャップ処理を施したバイオリクターの創製を試みる。包

接化による酵素の安定化、変性抑制の利点を活かすべく、得られた有機・無機ハイブリッドナノチューブ型バイオリクターに光刺激形態可変機能を付与する。即ち、両親媒性分子にあらかじめ光構造異性化部位などを組み込んでおく。光刺激 1 によるチューブからコイルへの形態変化⇒ナノチャンネルへの基質の取り込み促進⇒触媒反応 ON、逆に光刺激 2 によるコイルからチューブへの形態変化⇒ナノチャンネルへの基質の取り込み抑制⇒触媒反応 OFF といった光制御システムの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

## (1) 光駆動性有機ナノチューブライブラリの構築

エチレンジアミンの両端にそれぞれ光応答性ユニットとしてアゾベンゼンカルボン酸、水素結合ユニットとしてジグリシンまたはトリグリシンを導入した両親媒性分子 **1(n)** を設計・合成した。得られた **1(n)** を pH 5~10 に調整した水中にて加熱分散後、室温まで徐冷し、自己組織化を行った。

光応答性ユニットである 4-アミノ-4'-カルボキシル-アゾベンゼンの両端にそれぞれ水素結合ユニットとしてオリゴグリシン、水素結合ユニット及び疎水性相互作用ユニットとして末端にアミノ基を有する糖脂質をアミド結合により導入した両親媒性分子 **2(m, n)** を設計・合成した。得られた **2(m, n)** を pH 5~10 に調整した水中へ加熱分散後、室温まで徐冷し、自己組織化を行った。

自己組織化体の形態観察は、走査型電子顕微鏡(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて行った。自己組織化体の分子パッキング解析は、粉末 X 線回折(XRD)、赤外分光(IR)を用いて行った。

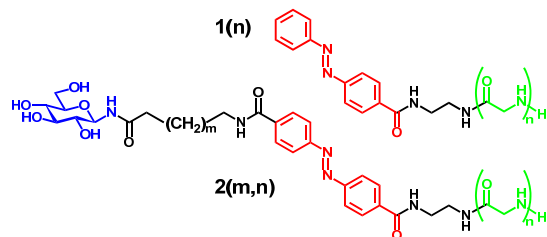


図 1 光応答性ユニットであるアゾベンゼンを含む両親媒性分子の化学構造式

## (2) 光駆動性有機・無機ハイブリッドナノチューブのバイオリクターへの展開

光駆動性有機ナノチューブのナノチャンネルへ酵素を包接するため、凍結乾燥処理を施した光駆動性有機ナノチューブの粉末に酵素の水溶液を添加し、一晚室温で放置した。その後、酵素を包接した光駆動性有機ナノチューブの両端をエンドキャップするため、親水基と疎水基を表面に有する磁性ナノ粒子の分散液と混合し、一晚室温で放置した。200 nm ポアサイズのメンブランフィルターを用いて、包接されなかった酵素及び磁性ナノ粒

子を除去した。

酵素を包接、磁性ナノ粒子でエンドキャップした光駆動性有機・無機ハイブリッドナノチューブの分散水溶液に反応基質を加え、任意の時間、紫外光照射を行い、酵素触媒反応を行った。その後、任意の時間、可視光照射を行い、酵素触媒反応を停止した。磁石を用いて、光駆動性有機・無機ハイブリッドナノチューブを回収し、酵素触媒反応を繰り返した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 光駆動性有機ナノチューブライブラリの構築

両親媒性分子 **1(n)** は、中性 pH 付近で二分子膜構造を基本とする有機ナノチューブを形成した。**1(2)** から成る有機ナノチューブに紫外光を照射したところ、アゾベンゼンユニットのトランス→シス構造異性化に伴い、径サイズが不均一なトロイド状ナノ構造体へと変化した。続く可視光照射によるアゾベンゼンユニットのシス→トランス構造異性化では、トロイド状ナノ構造体は径サイズが均一なナノリング、そしてそれが積層したナノチューブへと変化した。一方、**1(3)** から成る有機ナノチューブは、光構造異性化による形態変化を全く示さなかった。光構造異性化によるナノ構造体の形態変化が、グリシンユニットの分子間水素結合の強さに大きく依存することが明らかとなった。

両親媒性分子 **2(m, n)** は、中性 pH 付近で単層単分子膜構造を基本とする内径約 10 nm、膜厚約 3 nm の有機ナノチューブを形成した。**2(9, 2)** から成る有機ナノチューブに紫外光を照射したところ、アゾベンゼンユニットのトランス→シス構造異性化に伴い、内径サイズと膜厚を維持しつつ、ヘリカルナノコイルへと形態変化した。続く可視光照射によるアゾベンゼンユニットのシス→トランス構造異性化では、ヘリカルナノコイルは元のナノチューブへと戻った。光刺激を駆動力として、ナノ構造の形態を可逆的に制御することが可能となった。

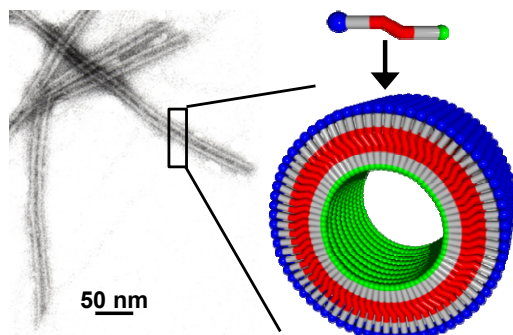


図 2 両親媒性分子 **2(9, 2)** が形成する単層単分子膜有機ナノチューブの透過型電子顕微鏡像とその分子パッキング様式

##### (2) 光駆動性有機・無機ハイブリッドナノチューブのバイオリアクターへの展開

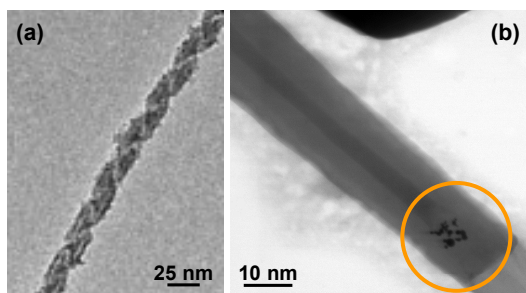


図 3 (a) 紫外光照射により有機ナノチューブから形態変化したヘリカルナノコイルと (b) 磁性ナノ粒子でエンドキャッピングした有機ナノチューブの透過型電子顕微鏡像

凍結乾燥した **2(9, 2)** から成る有機ナノチューブに酵素を添加したところ、毛細管力により、有機ナノチューブのナノチャンネルに酵素が効率的に包接された。バルク水溶液中のフリーの酵素と比較し、触媒反応速度が著しく減少した。ナノチャンネルへの基質の拡散が遅いためだと解釈できる。

酵素を包接した有機ナノチューブの分散水溶液と表面に親水基と疎水基を併せ持つ磁性ナノ粒子の分散水溶液を混合した結果、有機ナノチューブの両端を磁性ナノ粒子でキャッピングすることに成功した。

得られた有機・無機ハイブリッドナノチューブは、酵素や磁性ナノ粒子を包接する前と同様に、紫外光照射によりヘリカルナノコイルへと形態変化した。これにより、酵素が包接されたヘリカルナノコイルへの反応基質の取り込みが可能となり、酵素触媒反応が ON となった。一方、続く可視光照射によるナノチューブへの形態変化は、酵素触媒反応を OFF にした。磁石を用いて、反応溶液中から有機・無機ハイブリッドナノチューブを簡単に回収できた。

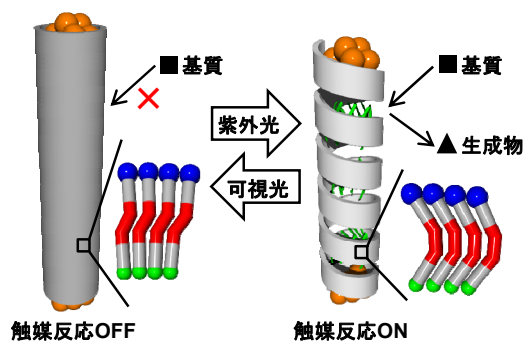


図 4 光駆動性有機・無機ハイブリッドナノチューブをベースにした酵素リアクターの模式図

可逆的な形態変化後もナノチューブやヘリカルナノコイルの内空間から、酵素と磁性ナノ粒子の放出が起こらないことを確認した。バルク水溶液中のフリーの酵素は、時間の経過や反応の繰り返し操作により、次第に触媒活性が失われていったが、本システムでは同条件下も高い触媒活性を維持できることが明らかとなった。

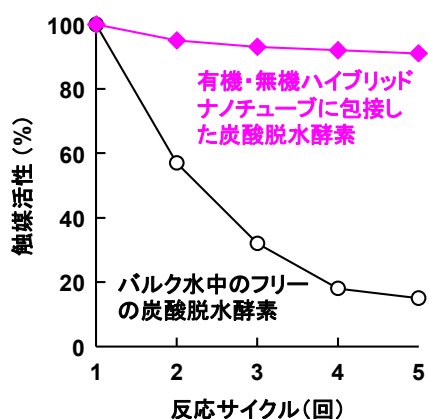


図5 光駆動性有機・無機ハイブリッドナノチューブの酵素安定化効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- ① Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Two-Step Naked-Eye Detection of a Lectin by Hierarchical Organization of Soft Nanotubes into Liquid Crystal and Gel Phase”, *Chemical Communications*, vol. 51, pp. 6816–6819 (2015). (査読有り)  
DOI: 10.1039/c5cc01464f
- ② Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Photoinduced Morphological Transformations of Soft Nanotubes”, *Chemistry-A European Journal*, vol. 21, pp. 8832–8839 (2015). (査読有り)  
DOI: 10.1002/chem.201500430
- ③ Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Qualitative/Chiral Sensing of Amino Acids by Naked-Eye Fluorescence Change Based on Morphological Transformation and Hierarchizing in Supramolecular Assemblies of Pyrene-Conjugated Glycolipids”, *Chemical Communications*, vol. 51, pp. 11104–11107 (2015). (査読有り)  
DOI: 10.1039/c5cc03843j
- ④ Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Soft Nanotubes Acting as a Confinement Effector and a Chirality Inducer for Achiral Polythiophenes”, *Chemical Communications*, vol. 52, pp. 1346–1349 (2016). (査読有り、バックカバー掲載)  
DOI: 10.1039/c5cc08035e
- ⑤ Naohiro Kameta, Tomohiko Matsuzawa, Katsuro Yaoui, Mitsutoshi Masuda, “Short Polyethylene Glycol Chains Densely Bound to Soft Nanotube Channels for Inhibition of Protein Aggregation”, *RSC Advances*, vol. 6, pp. 36744–36750 (2016). (査読有り)  
DOI: 10.1039/c6ra06793j

- ⑥ Naohiro Kameta, Haruhisa Akiyama, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Effect of Photoinduced Size Changes on Protein-Refolding and Transport Abilities of Soft Nanotubes”, *Chemistry-A European Journal*, vol. 22, pp. 7198–7205 (2016). (査読有り)  
DOI: 10.1002/chem.201504613
- ⑦ Naohiro Kameta, Tomohiko Matsuzawa, Katsuro Yaoui, Mitsutoshi Masuda, “Glycolipid-based Nanostructures with Thermal-Phase Transition Behavior Function as Solubilizers and Refolding Accelerators for Protein Aggregates”, *Soft Matter*, vol. 13, pp. 3084–3090 (2017). (査読有り、バックカバー掲載)  
DOI: 10.1039/c7sm00310b

〔学会発表〕(計27件)

- ① 亀田直弘, 増田光俊, 清水敏美, “二分子膜有機ナノチューブの内外表面非対称化と金ナノ粒子複合化による光形態可変機能付与”, 第12回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 2014年5月31日, 東京.
- ② 亀田直弘, 丁武孝, 増田光俊, 清水敏美, “空孔のサイズ及び表面官能基を精密に制御した有機ナノチューブ材料の開発とナノバイオ応用”, 第23回ポリマー材料フォーラム, 2014年11月6日, 奈良.
- ③ Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Supramolecular Nanotubes Functioning as Artificial Chaperones and Drug Containers”, The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2014), 2014年12月5日, つくば.
- ④ Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Supramolecular Nanotubes with Light-Driven Morphological-Transformation Abilities”, RACI National Congress, 2014年12月8日, オーストラリア.
- ⑤ 亀田直弘, “バイオミメティクスを利用したテーラーメイド型有機ナノチューブ材料の開発”, 第7回産総研ナノシステム連携促進フォーラム, 2015年1月9日, 東京.
- ⑥ 亀田直弘, 増田光俊, “バイオインスパイアードマテリアル “高機能性有機ナノチューブ””, 第14回産総研・産技連LS-BT合同発表会, 2015年2月3日, つくば.
- ⑦ 亀田直弘, “ナノバイオ応用に向けた有機ナノチューブ材料の開発”, 東大新領域-KEK-産総研連携教育シンポジウム, 2015年2月20日, つくば.
- ⑧ 亀田直弘, 増田光俊, 清水敏美, “アゾベンゼン結合脂質が形成する有機ナノチューブの光応答性形態可変機能とその機構解明”, 日本化学会第95春季年会, 2015

- 年3月27日, 千葉.
- ⑨ 亀田直弘, 南川博之, 増田光俊, 清水敏美, “熱変性タンパク質に対する有機ナノチューブのシャペロン機能”, 日本化学会第95春季年会, 2015年3月27日, 千葉.
  - ⑩ 亀田直弘, 増田光俊, 清水敏美, “単分子膜有機ナノチューブの高効率合成: ボロン酸ポリマーとの会合・解離を利用した糖脂質分子の結晶多形制御と自己集合形態制御”, 第64回高分子学会年次大会, 2015年5月29日, 札幌.
  - ⑪ 亀田直弘, 増田光俊, 清水敏美, “アゾベンゼン型両親媒性分子が形成するソフトナノチューブ ~光刺激による形態可変とサイズ制御~, ” 第66回コロイドおよび界面化学討論会, 2015年9月10日, 鹿児島.
  - ⑫ 亀田直弘, 増田光俊, 清水敏美, “有機ナノチューブの相転移と階層化を利用したナノバイオ応用”, 第64回高分子討論会, 2015年9月15日, 仙台.
  - ⑬ Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Soft Nanotubes for Encapsulation, Release, and Stabilization of Proteins ”, Pacificchem2015, 2015年12月17日, ハワイホノルル.
  - ⑭ 亀田直弘, “脂質単分子膜ナノファイバーによるタンパク質のフォールディング制御”, 産総研中国センターシンポジウム, 2016年1月21日, 広島.
  - ⑮ 亀田直弘, 増田光俊, “脂質単分子膜ナノファイバーによるタンパク質のフォールディング制御”, 産総研材料・化学シンポジウム, 2016年2月5日, つくば.
  - ⑯ 亀田直弘, 秋山陽久, 増田光俊, 清水敏美, “光刺激によって内径が収縮する有機ナノチューブのタンパク質リフォールディング機能”, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月24日, 京都.
  - ⑰ 亀田直弘, 増田光俊, 清水敏美, “シングルナノメートルスケールの内径を有する単分子膜有機ナノチューブの創製”, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月25日, 京都.
  - ⑱ 亀田直弘, 南川博之, 増田光俊, 清水敏美, “単分子膜有機ナノチューブのタンパク質リフォールディング促進機能に対する内径サイズ効果と熱相転移効果”, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月25日, 京都.
  - ⑲ 亀田直弘, “細胞膜やウイルス構造に学ぶナノカプセル材料の開発”, 第5回 R&D マッチング, 2016年5月20日, 東京.
  - ⑳ 亀田直弘, 秋山陽久, 南川博之, 増田光俊, 清水敏美, “タンパク質のリフォールディングに及ぼす光刺激収縮性ソフトナノ空間の押し出し効果”, 第65回高分子学会年次大会, 2016年5月25日, 神戸.
  - ㉑ 亀田直弘, 増田光俊, “ピレン修飾糖脂

- 質の自己集合系を利用したアミノ酸の定性・キラルセンシング”, 第65回高分子学会年次大会, 2016年5月25日, 神戸.
- ㉒ Naohiro Kameta, “ Soft Nanotube Materials: Conformation Control and Aggregation Inhibition of Polymers”, CEMS Topical Meeting on Nanoparticles / Nanotubes / Nanosheets, 2016年9月8日, 埼玉.
  - ㉓ 亀田直弘, 青柳将, 増田光俊, “1次元ソフトナノ空間を利用したポリチオフェン誘導体の形態・会合・キラリティー制御”, 第65回高分子討論会, 2016年9月14日, 横浜.
  - ㉔ 亀田直弘, 増田光俊, 清水敏美, “微量アミノ酸の添加による糖脂質ボロン酸エステルの自己集合形態及び光機能の精密制御”, 第67回コロイドおよび界面化学討論会, 2016年9月22日, 旭川.
  - ㉕ 亀田直弘, “刺激応答型界面材料による物質の捕捉・徐放制御”, 新化学技術推進協会先端化学・材料技術部会新素材分科会産総研技術セミナー, 2016年12月5日, 東京.
  - ㉖ 亀田直弘, 増田光俊, “内と外の表面が異なるチューブ状ナノカプセルの開発”, 平成28年度産総研材料・化学シンポジウム, 2017年2月10日, つくば.
  - ㉗ 亀田直弘, 増田光俊, “内と外の表面が異なるチューブ状ナノカプセルの開発ー中分子から高分子を安定に貯蔵可能な包装剤への応用にー”, 平成28年度第3回産総研中国センターシンポジウム, 2017年3月7日, 広島.
- [図書] (計4件)
- ① 亀田直弘, “有機ナノチューブゲルのナノバイオ機能 -タンパク質に対するカプセル機能・シャペロン機能-”, ゲルテクノロジーハンドブック, pp. 667-673 (2014), (株)エヌ・ティー・エス.
  - ② 亀田直弘, “有機ナノチューブ材料の開発とカプセル化機能開拓”, マイクロ/ナノカプセルの調製、徐放性制御と応用事例, pp. 92-100 (2014), (株)技術情報協会.
  - ③ 亀田直弘, “分子の自己組織化を利用したソフトナノチューブ材料の開発”, 化学工業, vol. 66, pp. 16-21 (2015), (株)化学工業社.
  - ④ 亀田直弘, “ナノチューブゲルのバイオ応用”, 低分子ゲルの開発と応用, pp. 173-180 (2014), (株)シーエムシー出版.
- [産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.aist.go.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

亀田直弘 (KAMETA NAOHIRO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能

化学研究部門・主任研究員

研究者番号：20517297

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )