

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20360350

研究課題名(和文)

ジャンクペプチド再機能化によるストレス応答型 LIPOzyme リアクターの設計開発

研究課題名(英文)

Design and Development of Stress Responsive LIPOzyme Reactor Based on Re-functionalization of Junk Peptides

研究代表者 馬越 大 (UMAKOSHI HIROSHI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号：20311772

研究成果の概要(和文)：モデル生体膜であるリポソーム膜上に触媒活性点を構築することで、酵素様機能である LIPOzyme(Liposome + Enzyme)機能が誘導できることを示した。この機能は、(1)電子移動反応、(2)プロトン移動反応、(3)求核/求電子置換反応、の3項目で整理できることが分かった。これらの反応機構を実現するように、ジャンクペプチドやリガンド、ならびにそれらの金属錯体をリポソーム膜上に配位させ、秩序構造を誘導すればよい事を見出した。LIPOzyme を担体に安定に固定化する手法を検討し、透析膜モジュールへの大容量の固定化に成功した。今後の反応・分離モジュールとしての本格的な展開の糸口を得る事ができた。さらに、ジャンクペプチドの疎水性、電荷密度、水素結合安定性のマッピングを進め、脂質組成の条件も明らかにし、LIPOzyme 設計のためのデータベースを整備した。

研究成果の概要(英文)：It is demonstrated that the function of LIPOzyme (Liposome + Enzyme) could be induced by the construction of catalytic sites on the liposome membrane as a model biomembrane. The LIPOzyme function could be classified by three categories: (i) electron transfer; (ii) proton transfer; (iii) nucleophilic / electrophilic reaction. The LIPOzyme function could be, herewith, controlled by the tuning of junk peptides, ligands or their metal complexes to achieve the desired function. Furthermore, the immobilization of LIPOzyme into the module was presented to develop the novel membrane module. This technique is a promising method to develop the reactor / separator based on the LIPOzyme function. Besides, the mapping of the physicochemical properties of junk peptides and the lipid composition could be performed to clarify the optimal condition for the desired functions of LIPOzyme, resulting in developing their database.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：プロセス工学

科研費の分科・細目：化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：メンブレン・ストレスバイオテクノロジー、LIPOzyme、生体膜、バイオリアクター、人工酵素、ペプチド、リフォールディング、ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は1つのマイクロ化学工場である。ゲノム情報(設計図)に基づく転写・翻訳を経て、タンパク質・酵素を始めとする各種の機能性分子が生産され、与えられた環境条件で生存するための各種機能を誘導する。近年、細胞のストレス応答機能が着目されている。細胞は晒されたストレス環境で生存するために、分子シャペロンを始めとする各種のタンパク質を生産して応答する事が知られている。Genome/Proteomeのスタンスでは、細胞の全ての応答は、予め遺伝子という設計図に描かれた物質発現とその機能により賄われているというものである。しかし、本当にそれだけで説明できるのであるか？

最近、その反証が報告されている。例えば、リン脂質二重層から成るリポソームは、タンパク質が保持する各種の機能を誘導する事が報告されている。(i) タンパク質の変性中間体を認識(相互作用)して、Nativeな構造に巻戻す、(ii) 膜在性要素物質(Acyl化ポルフィリン, Acyl化His, Acyl化キレート材)の集合構造を制御して、高度な分子認識能・酵素様活性を誘導する。(iii) 遺伝子発現プロセスの要素物質と相互作用してその発現量を調節している、(iv) 断片化・失活したペプチドを構造変化させ、再度、天然酵素と同レベルの活性を誘導するなどである。一例を右図に示す。抗酸化酵素の一つであるSODという酵素は自ら生産する $H_2O_2$ が蓄積した場合、構造が破壊され、ひいては、断片化してしまう。しかしリポソームを添加した場合、特定のフラグメントのみを認識し、構造形成する事により、元のSODと同レベルの活性を誘導するのである。

上記の知見は、細胞のストレス応答の本質は、Genome/Proteome情報、ならびに、それをベースとした各種-ome情報では説明できない事を示唆している。即ち、ストレス環境でMembraneそのものがダイナミックに誘導する機能の情報総体Membranome情報が重要なのである。この様な、LIPOzyme機能をコアにした科学技術の創成により、これまで進化してきた生体系の進化戦略を解明し、同時に、(生体)環境に調和した次世代型プロセス/材料の設計が可能となる。

## 2. 研究の目的

目標は、工業プロセス・生体プロセスで

発生するジャンクペプチドを資源として、LIPOzyme機能をコア技術とした、新規なストレス応答型バイオリクターを設計開発することである。

## 3. 研究の方法

本研究の遂行のためには、(1)LIPOzyme機能の体系化、(2)高密度LIPOzyme固定化担体の開発、(3)上記の知見に基づく工学的・医工学的ケーススタディの提示の、3つの項目について検討する必要がある。各々に相当する3つの班で研究を進め、基礎から応用までの目的を達成する。そのため、以下の3班で研究を遂行した。

LIPOzyme機能を体系化するため、ストレス負荷により断片化したペプチドのリポソーム膜表層への提示技術について検討した(A班)。次に、メンブレンチップ解析により、リポソーム表層に提示されるペプチド断片の特性解析を行った(B班)。

さらに、ジャンクペプチドライブラリーの整備を行った(C班)。

これらの研究班の連携を取りながら、LIPOzyme機能を総括し、その機能化に資する新規な膜モジュールの調製法を提案する。最後に、LIPOzyme機能のデータベースを整備する。

## 4. 研究成果

各班で得られた知見に基づき、以下の研究成果を得た。その概要を示す。

### (1)LIPOzyme機能の検討

必要最小限のペプチド断片、金属イオン、コレステロール、リガンドなどを付与する事により、酵素と同等の機能(LIPOzyme機能)が誘導可能である。この様なLIPOzyme設計のために、(i) Build-Up型ならびに(ii) Break-Down型の2つの方法論がある(Fig.1)。特に後者は、酵素に強いストレス条件を負荷して構造を破壊・断片化し、酵素がその構造内部に秘めた潜在機能をリポソーム膜表層に提示する新しい手法である。例えば、2mM  $H_2O_2$ 処理によりSOD (Superoxide Dismutase)という酵素は断片化するが、POPCリポソームによる(i)特定のSOD断片の認識、(ii)構造変化、(iii)活性化の3つのプロセスを経て、SOD様活性ならびにCatalase (CAT)様活性を誘導する事が示された。特に、交差的なストレス負荷したリポソームは、(i)疎水性相互作用、(ii)静電的相互作用(SOD: 負電荷, リポソーム: 正電荷)、(iii)膜界面での水素結合の安定化など、複合的な相互作用により、SOD断

片を認識している事がわかった。リポソーム膜の状態を適切にデザインする事により、SOD/CAT の複数の活性が表層提示された One-Pot 触媒の設計開発も可能であった。

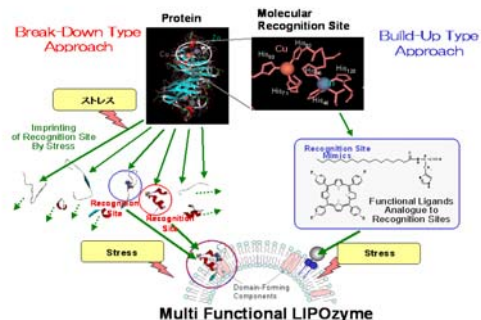


Fig.1 LIPOzyme の設計戦略

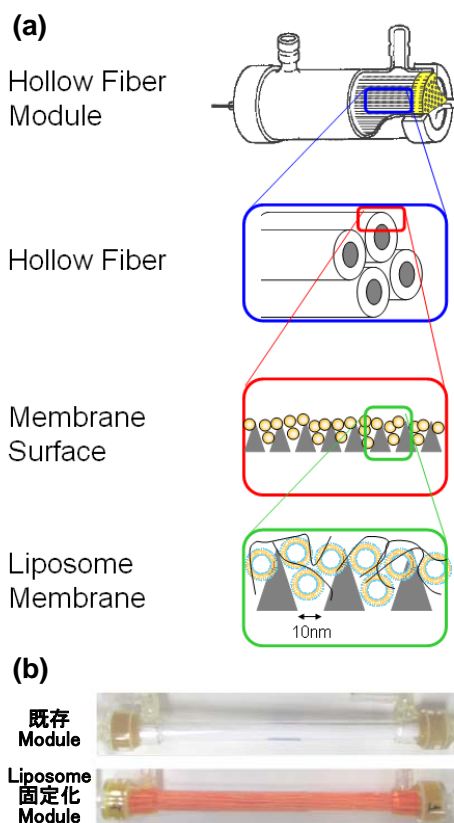
上記の知見を下に、酵素機能の大分類に従い、既報の LIPOzyme の分類を試みた。主に、①電子移動反応、②プロトン移動反応、③求核/求電子置換反応、の3項目で整理できることが分かった。これらの反応機構を実現するように、ジャンクペプチドやリガンド、ならびにそれらの金属錯体をリポソーム膜上に配位させ、秩序構造を誘導すればよい事を見出した。

### (2)LIPOzyme膜モジュールの開発

LIPOzyme 固定化手法を検討し、透析膜モジュールへの大容量の固定化に成功した。

リポソームをマトリックスゲルで内包させることを考案し(Fig.2(a))、天然型の高分子によるゲル調製について検討した。各種マトリックスゲルの特性を解析した結果、天然高分子である Xanthan Gum (XG)を用いることにより、非常に高い含水状態のゲルを作製する事が可能である事がわかった。XG を Polyethyleneimine (PEI)と架橋剤を用いて架橋させたゲルであれば膨潤倍率が50倍(含水率98%)程度の高含水率が可能であることがわかった。また、このゲルでリポソームを膜表層の空隙に内包することも確認した(Fig.2(b))。さらに、人工腎臓用中空糸膜モジュール内部に固定化することにも成功し、このモジュールに内包固定化されたリポソームは最小限2週間程度、安定に存在することを確認した。抗酸化リアクターをケーススタディとして、上記リポソーム固定化膜モジュールを用いて、潜在活性ペプチドを分離認識し、同時に

LIPOzyme 活性を誘導できる事を示した。



リポソーム内部・表層に蛍光マーカー(オレンジ)を修飾している

Fig.2 (a) リポソーム固定化膜モジュールの概念図および(b)調製したモジュール

タンパク質分離を試験的に実施した結果、効果的に低分子量ペプチドの分離に成功し、今後の反応・分離モジュールとしての本格的な展開の糸口を得る事ができた。

### (3)LIPOzyme機能に関するライブラリーの整備

リポソーム固定化技術と電気化学的計測法、水晶振動子法などを組み合わせた新規なメンブレンチップ解析技術を考案した。この手法を駆使して、ジャンクペプチドの疎水性、電荷密度、水素結合安定性のマッピングを進め、LIPOzyme 設計のためのデータベースを整備した。その結果、水素結合の不安定なペプチド領域が脂質膜に提示されやすく、膜上での新たな構造形成が可能であることが示唆された。これは、Fig.1に示したプロセスが妥当であることも示唆している。

一方、メンブレンチップ解析技術を用いて、ペプチドを提示するリポソームの

条件も明らかにした。温度や脂質の混合比によって一義的に決まる相状態と閉鎖系小胞としての系の安定性が複雑に絡み合った非平衡系であり、多くの準安定状態(ローカルミニマム)を有している。リポソームによる機能研究などから、外的環境条件の変動により、準安定状態は一時的に最安定構造(グローバルミニマム)を示すが、すぐに準安定状態に移行し、新たなグローバルミニマムに移行する。つまり、リポソーム系は動的な準安定状態の集合から成るポテンシャル構造を有する。これは active な中間体に相当する秩序状態が脂質膜上で形成され、新しい秩序状態(例えば活性中心)に移行する過程を表している (Fig.3)。LIPOzyme 機能の発現における対象分子の識別・分離プロセスがシンプルであるのは、リポソーム(モデル生体膜)が有する動的機能発現機構を有効に利用しているからであろう。

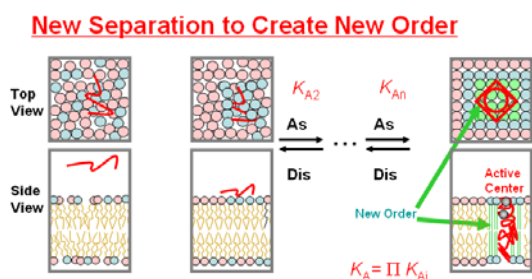


Fig.3 脂質膜上に提示されるペプチドの秩序構造形成過程の模式図

以上の成果を総括し、LIPOzyme の開発指針を確立し、固定化膜モジュールを開発することに成功した。本技術は、LIPOzyme 機能に立脚する新規なバイオ生産・分離プロセスの進展に貢献するものと期待される。

#### 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26件)

- 1) H. Umakoshi, T. Tanabe, K. Suga, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Oxidative Stress can Affect the Gene Silencing Effect of DOTAP liposome in an in vitro Translation System, *Int'l. J. Biolog. Sci.*, 2011
- 2) H.T. Bui, H. Umakoshi, K. Suga, T. Tanabe, K.X. Ngo, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Cationic DOTAP Liposome can Interfere mRNA Translation of GFP in an E. coli Cell-Free Translation System, *Biochem. Eng.*

*J.*, 52, 38-43 (2010)

- 3) K. Suga, H. Umakoshi, H. Tomita, T. Tanabe, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Liposomes destabilize tRNA during heat stress, *Biotechnol. J.*, 5, 526-529 (2010)
- 4) H. Umakoshi, K. Morimoto, N. Yasuda, Y. Ohama, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Development of Liposome-Based Mimics of Superoxide Dismutase and Peroxidase Based on "LIPOzyme" Concept, *J. Biotech.*, 117, 59-63 (2010)
- 5) K.X. Ngo, H. Umakoshi, T. Shimanouchi, H. Sugaya, R. Kuboi, Chitosanase Displayed on Liposome Can Increase Its Activity and Stability, *J. Biotech.*, 146, 105-113 (2010)
- 6) H. gaya, H. Umakoshi, K.B.M.A Fadzil, L.Q. Tuan, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Preparation of superoxide dismutase LIPOzyme in hollow fiber membrane, *Desalination and Water Treatment*, 17, 281-287 (2010)
- 7) Le Quoc Tuan, Hiroshi Umakoshi, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Liposome Can Act as Molecular and Metal Chaperone for Oxidized and Fragmented Superoxide Dismutase, *Enzyme Microb. Tech.*, 44(2), 101-106 (2009)
- 8) 菅谷 博之, 遠武 佑治, 馬越 大, 久保井 亮一, 近藤 科江, 宮田 完二郎, 片岡 一則, バイオインターフェースの医療応用, *表面科学*, 30(4), 236-247 (2009)
- 9) Huong Thi Bui, Hiroshi Umakoshi, Keishi Suga, Tomoyuki Tanabe, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Cationic Liposome Inhibits Gene Expression in *E. coli* Cell-Free Translation System, *Membrane*, 34(3), 146-151 (2009)
- 10) Hiroyuki Sugaya, Hiroshi Umakoshi, Yuji Tohtake, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Characterization of Polymer Hydrophobicity and Immobilized Liposome Membrane in Hollow Fiber Module, *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, 16, 98-104 (2009)
- 11) Hiroshi Umakoshi, Masato Nishida, Keishi Suga, Haruyuki Ishii, Huong Thi Bui, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Characterization of Green Fluorescent Protein Using Aqueous Two-Phase System, *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, 16, 136-141 (2009)
- 12) Huong Thi Bui, Hiroshi Umakoshi, Keishi Suga, Masato Nishida, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Negatively-Charged Liposome is Potent Inhibitor of Protein Folding in Post-Translation Process of in vitro Gene Expression, *Biochem. Eng. J.*, 46(2), 154-160 (2009)
- 13) Toshinori Shimanouchi, Haruyuki Ishii, Noriko Yoshimoto, Hiroshi Umakoshi, Ryoichi Kuboi, Calcein

- Permeation across Phosphatidylcholine Bilayer Membrane: Membrane Fluidity, Liposome Size and Immobilization, *Colloid Surface B*, **73(1)**, 156-160 (2009)
- 14) Hiroshi Umakoshi, Le Quoc Tuan, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Role of Liposome on Recognition and Folding of Oxidized and Fragmented Superoxide Dismutase for Its Re-activation, *Biochem. Eng. J.*, **46(3)**, 313-319 (2009)
- 15) Hiroyuki Sugaya, Hiroshi Umakoshi, Yuji Tohtake, Ena Oyama, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Preparation of Hollow Fiber Immobilized Liposome Membrane, *Membrane*, **34(5)**, 272-280 (2009)
- 16) Hiroshi Umakoshi, Keishi Suga, Huong Thi Bui, Masato Nishida, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Charged Liposome Controls the Translation and Folding Steps in *in vitro* Expression of Green Fluorescent Protein, *J. Biosci. Bioeng.*, **108(5)**, 450-454 (2009)
- 17) Minoru Noda, Toshinori Shimanouchi, Masanori Okuyama, Ryoichi Kuboi: "A Bio-Thermochemical Microbolometer with Immobilized Intact Liposome on Sensor Solid Surface" *Sense* 135(1). 40-45 (2008)
- 18) Kien Xuan Ngo, H. Umakoshi, T. Shimanouchi, R. Kuboi: "Enhanced Release of Chitosanase from *Streptomyces griseus* through Direct Interaction of Liposome with Cell Membrane under Heat Stress" *J. Biosci. Bioeng.* 106(6). 602-605 (2008)
- 19) H. T. Bui, H. Umakoshi, M. Nishida, T. Shimanouchi, R. Kuboi: "Liposome Membrane Itself can Regulate Gene Expression in Cell Free Translation System" *Langmuir* 24(19). 10537-10542 (2008)
- 20) Tuan, L. Q., T. T. T. Huong, T. A. Hong, T. Kawakami, T. Shimanouchi, H. Umakoshi, R. Kuboi: "Arsenic (V) Induces a Fluidization of Algal Cell and Liposome Membranes" *Toxicol. in Vitro* 22. 1632-1638 (2008)
- 21) H. Umakoshi, L. Q. Tuan, K. Morimoto, Y. Ohama, T. Shimanouchi, R. Kuboi: "Superoxide Dismutase-like Activity of Dodecanoyl-His Modified Liposome" *Maku (Membrane)* 33(4). 180-187 (2008)
- 22) L. Q. Tuan, H. Umakoshi, T. Shimanouchi, R. Kuboi: "Characterization of Oxidized and Fragmented Superoxide Dismutase Recruited on Liposome Surface" *Maku (Membrane)* 33(4). 173-179 (2008)
- 23) H. Umakoshi, L. Q. Tuan, K. Morimoto, Y. Ohama, T. Shimanouchi, R. Kuboi: "Superoxide Dismutase-like Activity of Dodecanoyl-His Modified Liposome" *Maku (Membrane)* 33(4). 180-187 (2008)
- 24) H. Umakoshi, N. Yoshimoto, M. Yoshimoto, T. Shimanouchi, R. Kuboi: "Characterization of Surface Properties of Microbial Transglutaminase Using Aqueous Two-Phase Partitioning Method" *Solv. Extr. Res. Dev. Japan* 15. 111-115 (2008)
- 25) H. Umakoshi, K. Morimoto, Y. Ohama, H. Nagami, T. Shimanouchi, R. Kuboi: "Liposome Modified with Mn-Porphyrin Complex can Simultaneously Induce Antioxidative Enzymes-like Activity of Both Superoxide Dismutase and Peroxidase" *Langmuir* 24. 4451-4455 (2008)
- 26) K. X. Ngo, H. Umakoshi, T. Shimanouchi, R. Kuboi: "Variation of Surface Properties of *Streptomyces griseus* Cells after Heat Treatment with Liposome" *Solv. Extr. Res. Dev. Japan* 15. 133-137 (2008)
- [学会発表] (計8件)  
 主な学会発表を列挙した。
- 1) H. Umakoshi, K.X. Ngo, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Preparation and characterization of chitosan-LIPOzyme based on "membranome" strategy, PACIFICHEM 2010, Dec.15-20 (2010) Hawaii, USA
- 2) H. Umakoshi, L.Q. Tuan, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Design and development of LIPOzyme based on membranome, PACIFICHEM 2010, Dec.15-20 (2010) Hawaii, USA
- 3) (招待講演) 馬越大, 生体膜プロセス化学の開拓に向けて~LIPOzymeを切り口に, 化学工学会秋季大会 2010年9月6日, 京都, 同志社大
- 4) (受賞講演) 馬越大, LIPOzyme Process Chemistryの創成に関する基礎工学的研究, 日本膜学会, 2009年5月21-22日, 東京(日本膜学会研究奨励賞)
- 5) (招待講演) L.Q. Tuan, H. Umakoshi, T. Shimanouchi, R. Kuboi, LIPOzyme Design Based on Molecular Recognition Function of Liposome, The 10th General Seminar of JSPS-VAST Core University Program, Nov. 26-28 (2008), Osaka
- 6) H. Umakoshi, T. Shimanouchi, R. Kuboi LIPOzyme: Basic and Its Possible Application, GCOE Int'l Symp on "Frontiers of Environmental and Industrial Biotechnology", Nov. 2-5 (2008) Osaka
- 7) H. Umakoshi, L.Q. Tuan, K. Morimoto, T. Shimanouchi, R. Kuboi, LIPOzyme Design Based on Molecular Recognition Function of Liposome -Biomembrane Process Chemistry and Separation Technology-International Conference on Separation Science and

Technology 08, Nov. 2-5 (2008) Yamanashi,  
Japan

- 8) (招待講演) 馬越大, Le Quoc Tuan, 森本健吾, 島内寿徳, 久保井亮一: “リボソームの分子認識能を利用するLIP0zymeの設計とその応用” 高分子学会第 57 回高分子討論会. 2008 年 9 月 25-26 日, 大阪、大阪市大

[図書] (計 1 件)

- 1) H. Umakoshi, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Pharmaceutical Process Chemistry (Wiley-VCH) 421-442 (2010)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬越 大 (UMAKOSHI HIROSHI)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授  
研究者番号：20311772

### (2) 研究分担者

久保井亮一 (KUBOI RYOICHI)  
大阪大学・名誉教授  
研究者番号：40029567

島内 寿徳 (SHIMANOUCI TOSHINORI)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教  
研究者番号：10335383

塩盛弘一郎 (SHIOMORI KOICHIRO)  
宮崎大学・工学研究科・准教授  
研究者番号：80235506

中村 秀美 (NAKAMURA HIDE MI)  
奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・  
教授  
研究者番号：70198232

森田 誠一 (MORITA SEIICHI)  
和歌山工業高等専門学校・物質工学科・准  
教授  
研究者番号：70332054

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：