

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18296

研究課題名(和文)エコ炭素循環に向けた酵素潜在能力を最大限に活かす太陽光応答型酵素活性化デザイン

研究課題名(英文)An artificial enzyme for improvement of enzymatic activity by irradiation of sunlight.

研究代表者

中澤 光(Nakazawa, Hikaru)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：40584991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：地球上に最も豊富に存在する炭素源である難分解性なセルロースを、ボイラーによる加熱なしに効率的反応できるエコ炭素循環システムを構築した。海底火山由来の耐熱性セルロース分解酵素をモジュール単位に分割し、星形金ナノ粒子の表面に3次元的に再編成することで星形金ナノ粒子の太陽光を熱に変換する性質による粒子表面局所における反応温度の向上と粒子表面へのクラスター化による飛躍的な酵素活性の向上を組み合わせることで最終的に5倍の糖化活性向上に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：無機材料表面と生体分子であるタンパク質(セルラーゼ)の界面設計制御に最も学術的意義がある。通常金属表面への固定化はほとんどの場合タンパク質を変性させたり、粒子に固定化することで、固液反応となり効率は低下する。ナノ粒子を100nm以下に設計し、安定な耐熱酵素を表面に密に配置することで可溶化させつつ酵素の失活を防ぐことで構築に成功した。この成果は他のタンパク質-無機材料界面の設計の知見となる。

社会的意義：試験管内ではあるが、ボイラーを使わずに酵素反応ができ、酵素の長寿命化もできたため、安価な酵素反応プラントへ応用できる。また、太陽光で活性化できる安価なバイオセンサーの構築もできる。

研究成果の概要(英文)：Non-edible biomass expected and its convert to energy and chemicals. In case of use of rigid cellulose. It is necessary to degrade for long period. Enzymatic activity should be enhanced naturally without heat source like boiler. Here, we constructed novel enzyme design for eco-carbon cycles by use of star shape gold nanoparticles with conversion of sun light to heat. Consequently, clustering effect of cellulase module on the surface of nanoparticle and enhanced reaction activity in nanoparticle surface by Light-heat effect of Gold nanostar result in 5 times increase in saccharification activity of cellulase module.

研究分野：Protein engineering

キーワード：Enzyme Nanoparticles Assembly Activation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、化石資源から代替資源へ転換が急務となっている。難分解かつ難溶解性固形物であるセルロース系バイオマスを用いる場合、分解酵素コストが高いため、最終的には時間をかけて、自然のエネルギーを利用して安価にかつ効率よく行うことが理想であり、酵素反応にボイラー熱源を使わない酵素反応環境が求められる。太陽光という無限に降り注ぐエネルギーを効率的に有効利用することを考えた。

2. 研究の目的

太陽光（自然光）を熱に変換する性質を持つ星形金ナノ粒子へ、この酵素クラスター化設計を反映させ、太陽光応答的に局所反応温度向上させることによる酵素活性化を利用したボイラーを必要としないエコ炭素循環システム指向酵素デザインを提案する。

3. 研究の方法

HEPES buffer と金イオンを混ぜ合わせ静置することで星形金ナノ粒子を合成し、そこに遺伝子工学的に金属結合タグを融合発現させたセルラーゼを金粒子表面に3D表示させる。さらにその粒子に太陽光を照射することで金属表面、すなわち、酵素近傍のみを高温にすることで酵素反応が促進するかを検証する。

4. 研究成果

(1) 太陽光-熱変換星型金ナノ粒子の合成

近年、報告された光-熱変換星型金ナノ粒子を HEPES buffer と金イオンを混ぜ合わせ静置するだけで、安価に合成する方法を参考に HEPES 濃度と金イオン濃度および反応時間を検討することによって、様々な色を示す粒子を合成できた。このなかで、赤、緑、黒の粒子を選択し、電子顕微鏡観察したところ、黒色の粒子で突起の成長した金ナノ粒子（星形金ナノ粒子）の作成に成功していた（図1）。

この粒子のプラズモン吸収を調べたところ、800nm の近赤外の領域の光を吸収することが明らかとなった（図2）。

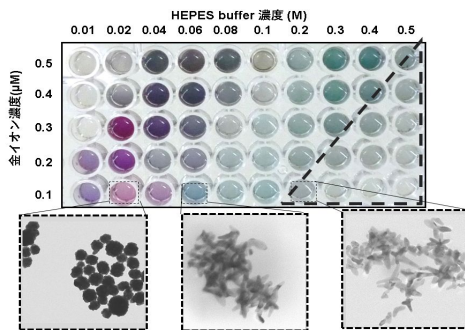


図1 星形ナノ粒子の合成

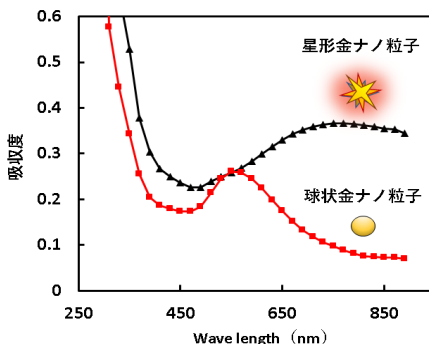


図2 星形ナノ粒子のプラズモン吸収

そこで、近赤外光をレーザー照射し、その温度変化を調べたところ、通常のコロイドナノ粒子に比較してより効率よく水温の上昇を達成した（図3）。

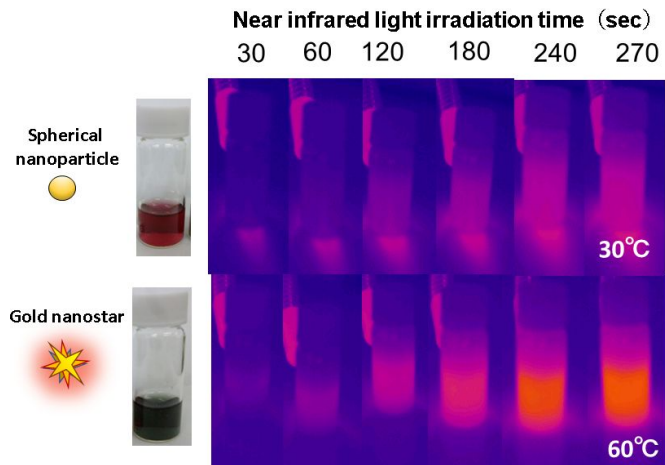


図3 星形ナノ粒子への近赤外照射による温度応答

(2) ポリ His タグを用いた金ナノ粒子への酵素クラスター化

本研究では自身の既往技術である無機粒子への酵素提示技術をさらに進化させ、まずは球状金ナノ粒子を用いてコストのかかるストレプトアビジンの除去を達成しつつ 6 × His タグのナノ粒子への結合親和性を利用して酵素を金ナノ粒子表面へ高密度結合する設計を行った。酵素には 100 でも失活しない海底火山から単離された耐熱酵素である *P. horikosii* 由来の EGPH を選び、タグを遺伝子工学的に融合した(図 4)。

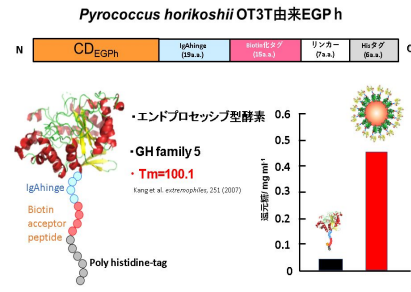


図 4 金属結合タグ融合耐熱酵素の作

(3) 太陽光-熱変換星型金ナノ粒子を用いた酵素クラスター化

1. および 2. の結果を踏まえて、実際に光応答星型金ナノ粒子へセルラーゼ提示状態で近赤外光照射によってナノ粒子表面が温められて温度が上昇していること、および、それに伴って酵素活性が向上していることをセルロース分解における還元糖生産量の計測により証明した(図 5)。面白いことに、各温度の恒温水槽にて温めた場合と比較すると、光照射した場合、酵素の活性の高さの割には、水温は低かった。このことは、粒子表面のみが効率的に加温されていることを示しており、無駄の少ないシステムであることが示された。さらに、最終目標条件である自然光という光線量の薄い条件下での酵素活性化を試み(図 6, 7) クラスター化なしの場合と比較して約 7 倍、球状金ナノ粒子と比較して約 2 倍の酵素活性化を達成した。難易度が高い項目を初年度に充てていたにもかかわらず、当初予定していた計画のすべてを達成し、それぞれで、過去の性質を大きく上回ったことから順調に計画が進み、論文の執筆ができるまでに進展した。具体的に照らし合わせると、太陽光-熱変換星型金ナノ粒子の合成では過去の報告の達成にくわえて、HEPES 濃度を変化させることによって自在にとげの長さを制御できることを確認し、その結果 800nm のプラズモン吸収を安定して達成する粒子を作成でき光応答を容易にできるようになった。またコストのかかるストレプトアビジンを除去できたため、コストの大幅な低下を達成し容易な太陽光-熱変換星型金ナノ粒子の合成と合わせると実用化へ向けた開発も可能ではないかと期待させる。最後に心配していたセルラーゼ機能も加温の効果と粒子表面へのクラスター化の効果の両方を発揮できることが明確に示された、これですべての計画を達成し、かつ、それらを超える成果が出ていることが証明された。過程で一時粒子上へクラスター化することで活性向上しなくなったが、条件検討の結果、粒子の形状によって酵素と粒子の界面の表面積が変化することにより影響されることを明らかにし、ブロッキング剤として BSA を加えることで安定した。現在学術論文を執筆中である。

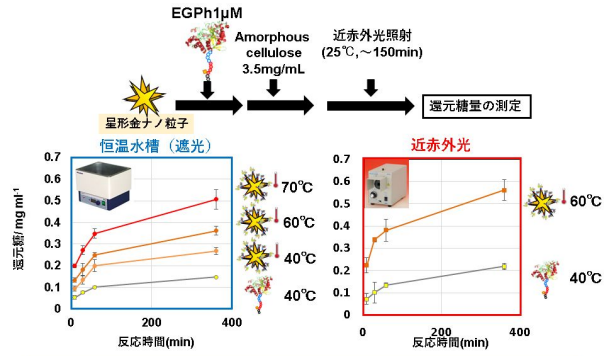


図 5 近赤外照射によるクラスター化酵素の活性向上

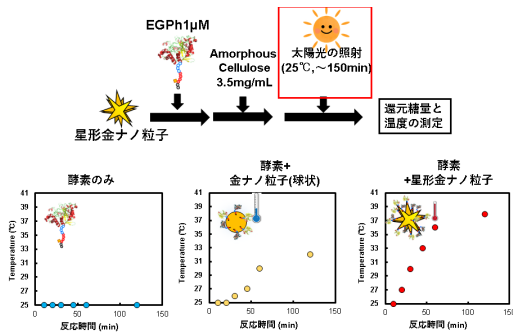


図 6 太陽光照射によるクラスター化酵素の温度上昇

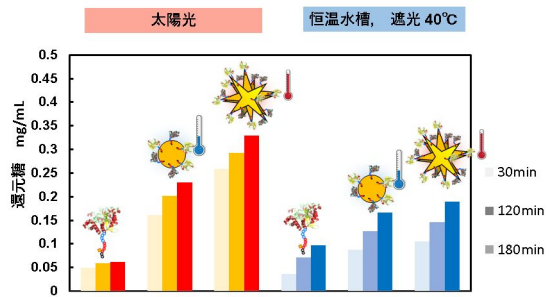


図 7 太陽光照射によるクラスター化酵素の活性

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Tepei Niide, Noriyoshi Manabe, **Hikaru Nakazawa**, Kazuto Akagi, Takamitsu Hattori, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu (2019) Complementary Design for Pairing between Two Types of Nanoparticles Mediated by a Bispecific Antibody: Bottom-Up Formation of Porous Materials from Nanoparticles. Langmuir, 査読あり, 35, 3067-3076.

Hikaru Nakazawa, Yasuko Seta, Tatsuya Hirose, Yoshitake Masuda, Mitsuo Umetsu (2018) Use of a Phage-Display Method to Identify Peptides That Bind to a Tin Oxide Nanosheets . Protein and peptide letter, 査読あり, 25, 68-75

Aruto Sugiyama, Mitsuo Umetsu, **Hikaru Nakazawa**, Tepei Niide, Tomoko Onodera, Katsuhiro Hosokawa, Shuhei Hattori, Ryutarō Asano, Izumi Kumagai (2017) A semi high-throughput method for screening small bispecific antibodies with high cytotoxicity Scientific Reports, 査読あり, 7, 03101

〔学会発表〕(計3件)

Hikaru Nakazawa, Tepei Niide, Mitsuo Umetsu A photo-responsible enzyme activation design with photothermal conversion device (化学工学会, 2018年3月6日, 東京)

Hikaru Nakazawa, Yuri Ishigaki, Tepei Niide, Mitsuo Umetsu. A natural sunlight induced enzyme activation design with photothermal conversion device(YABEC, 2017年12月19日, 中国)

Keisuke Murakami, **Hikaru Nakazawa**, Yuri Ishigaki, Eiko Kobayashi, Mitsuo Umetsu Artificial cellulosome designed from cellobiohydrolase module library (YABEC, 2017年10月18日, 中国)

〔図書〕(計1件)

二井手哲平, **中澤 光**, 梅津光央(2017)ケミカルエンジニアリング(担当部分)特集 親和性ペプチド分子による有機結晶の構造制御と生体分子-半導体有機結晶ハイブリッド材料作製プロセスの開発 化学工業社, 208-215, 7.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: プラスミド一周PCR法を用いたランダム遺伝子プラスミドライブラリー作成方法、それを用いた形質転換体作成方法、および、その方法に使用するキット

発明者: 柳沢美貴, **中澤 光**, 二井手哲平
, 服部峰充, 梅津光央

権利者: 柳沢美貴, **中澤 光**, 二井手哲平

, 服部峰充, 梅津光央

種類: 特許

番号: 特願 2018-190330

出願年月日: 2018年10月5日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~prn/>

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。