

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04821

研究課題名(和文) 酵素の高度リサイクルに向けたグラフトリフォールディング手法の開発

研究課題名(英文) Reversible utilization of enzyme by grafting and refolding

研究代表者

大橋 秀伯(Ohashi, Hidenori)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00541179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：従来の固定化酵素は一旦失活してしまうと、その機能を回復させることは困難である。一方、酵素自体はタンパク質であり、可溶化剤によってポリペプチドの一次構造までほどくと、その後可溶化剤を取り除くことで、本来の三次元構造と機能を回復すること(リフォールディング)が可能である。一方で材料表面に方末端を固定化したグラフト鎖は可逆的な振舞いを示す。そこで、本研究においては、酵素をグラフト鎖として材料表面に固定化することで、固定化酵素のリフォールディングを可能とする再生可能型の酵素固定化法の開発を行った。また様々な材料表面を簡便にグラフト鎖で機能化する大気圧プラズマグラフト重合法の詳細を研究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素は高い基質特異性を持ち、副生成物の少ない高選択的な反応を可能とする優れた生体触媒であり、分離操作を必要としない化学プロセスへの応用が見込まれる。一方で、酵素は化成品と比べると高価な上、失活しやすいため、失活を防ぐ目的で酵素の固定化法が開発されてきた。しかし従来の固定化法では一旦失活すると機能回復が極めて困難である。本課題では、失活しても容易に機能回復を可能とする固定化酵素設計により、高価故に見送られてきた機能性酵素を再度実用化に近づけることを可能とする。また、グラフト鎖導入を簡便に行う手法を開発したことで、様々な材料の表面に、種々の高機能を付与することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：Conventional immobilized enzyme is hard to recover its function once denatured. On the other hand, in the case of free enzyme as protein, after unfolded to a linear chain of amino acid sequences with denaturant, it can recover its function by removing denaturant to refold the active 3D structure. In the conventional design, immobilized enzyme is hard to refold, because the structure was stiffly anchored to mitigate the inactivation of protein. In the present study, novel type of immobilized enzyme was designed, which can recover its function reversibly by unfolding/refolding by temporary and subsequent covalent immobilization with terminal groups. The specific functional groups for both fixation were introduced to a model protein and to a material surface respectively, and they were combined in order. Further, atmospheric-pressure plasma graft polymerization technique was thoroughly investigated to facilitate the functionalization of material surface.

研究分野：化学工学

キーワード：固定化酵素 タンパク質 リフォールディング 大気圧プラズマ グラフト重合

1. 研究開始当初の背景

酵素は高い基質特異性を持ち、副生成物の少ない高選択的な反応を可能とする優れた生体触媒であり、分離操作を必要としない化学プロセスへの応用が見込まれる。一方で、酵素は化成品と比べると高価な上、失活しやすいため、安定性を増す目的で様々な酵素固定化手法が開発されてきた。従来の固定化法は、基本的に「酵素の活性な構造」を壊れにくくするという設計に基づいている。しかし、一旦壊れると機能回復が困難である(図1)。酵素の交換にかかるコストを考慮すると、失活しても何度でも容易に機能回復を可能とする機能が望まれる。

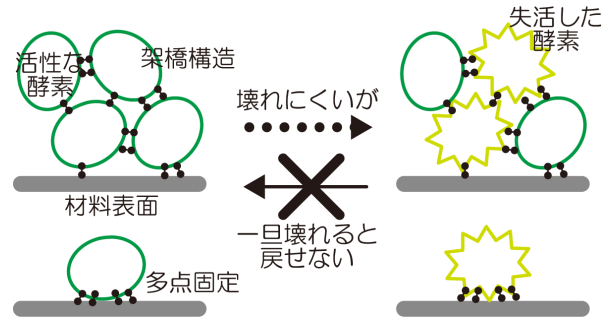


図1. 従来の典型的な酵素固定化法

酵素自体はタンパク質であり、可溶化剤によってポリペプチドの一次構造までほどくと、その後可溶化剤を取り除くことで、本来の三次元構造と機能の回復(リフォールディング)が可能である。しかしながら、従来の固定化法はどれもこの可逆的な変化を活かすのに適した設計ではない。これに対し、酵素の可逆変化をできるかぎり妨げないように固定化することで、酵素本来の可逆的な構造変化が利用可能になり、失活して構造が壊れても、酵素機能の回復が可能である固定化酵素の実現が予想される。

2. 研究の目的

材料表面に方末端を固定化したポリマーであるグラフト鎖は可逆的な振舞いを示すことが知られている。そこで、酵素をグラフト鎖として材料表面に固定化することで可逆性を付与し、酵素が失活してその正しい三次元構造と機能を失っても、可溶化剤の添加/除去によって機能を回復させることのできる再生可能型固定化酵素の実現を目指した。酵素をグラフト鎖として固定化する際に、酵素の可逆的な構造変化を妨げうる要因を取り除く必要がある。すなわち、酵素が末端以外の(酵素内部などの)非特異的な箇所固定されると、リフォールディング時に三次元的に正しい構造を取ることが難しい。酵素末端での確実な固定が必要であり、このため酵素末端に特異的な官能基を配置し、配位結合により末端の仮固定を行った後に、その近傍で共有結合による本固定を行う手法を開発することを目的とした。

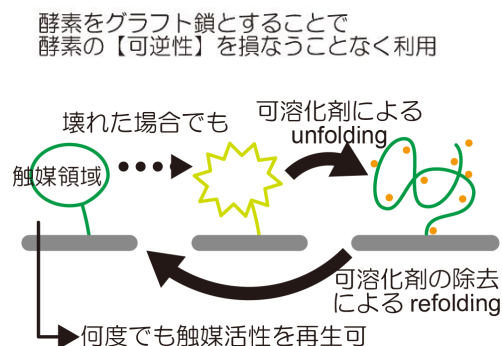


図2. 本研究の活性回復可能な固定化酵素のコンセプト

また酵素固定においては、酵素自身と、酵素を固定化するための材料表面の両方を修飾する必要がある。酵素に関しては遺伝子組換えを用いた修飾法が確立されているが、一方で多様な材料の表面を修飾する方法に関しては、簡便で適切な手法が存在しない状況であった。これに対し大気圧プラズマグラフト重合法は、大気圧で発生可能なプラズマを照射し、その後モノマー溶液に浸漬して機能性ポリマーを材料表面にグラフトする簡便な手法であり、機能性を材料表面に付与することができる比較的新しい手法である。本研究を遂行するにあたって、本手法は適した手法であったが、そのメカニズムを含め詳しいことが調べられていなかった。そこで、大気圧プラズマ重合法のメカニズム、特性を調査し、様々な材料表面への種々の官能基の簡便な修飾手法を実現することを本研究の第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換えによる酵素末端への仮固定・本固定用のアミノ酸配列の導入

および 材料表面への仮固定・本固定用の官能基の導入

酵素と材料表面の仮固定には、histidine 残基が並んだ His-tag と Ni-IDA (iminodiacetic acid)の特異的な配位結合を、また本固定には cysteine 残基のチオール(-SH)と maleimide 基の特異的な共有結合形成反応を用いた。モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein)を採用し、その遺伝子組換えにより酵素末端に His-tag と cysteine のアミノ酸配列を導入した。また、高比表面積の材料(ポリエチレン多孔質膜)の表面に、大気圧プラズマグラフト重合を用いて COOH 基を持つアクリル酸を導入し、これを足掛かりとしてアミド形成反応を用いて、Ni-IDA 基と maleimide 基を導入した。

(2) 大気圧プラズマグラフト重合法のメカニズム解明および汎用性の証明

大気圧プラズマグラフト重合の重合速度に関して、温度や pH、モノマー依存性など様々なパラメータへの依存性を調査し、従来の低圧プラズマ法との比較を行った。これにより従来法の知見が大気圧プラズマ法に適用できるかの知見を収集した。また、生成されるグラフト鎖の性質を調べ、種々のモノマーに対する適用性を調べた。また大気圧でのプラズマ照射が可能なことを利用し、修飾のパターニングを試行した。

(3) 遺伝子組換え GFP と修飾材料表面の反応によるグラフト酵素の作製

(1)で作製した遺伝子組換え GFP と修飾材料表面を用いて、His-tag と Ni-IDA の配位結合により仮固定を行い、その後 cysteine と maleimide の共有結合形成により本固定を行った。固定化の確認を GFP の蛍光観察にて行い、活性を確認した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子組換えによる酵素末端への仮固定・本固定用のアミノ酸配列の導入

および 材料表面への仮固定・本固定用の官能基の導入

His-tag 導入済みの緑色蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein)のプラスミドに対して quick change 法により His-tag の後ろに cysteine が挿入されるように遺伝子組換えを行い、大腸菌を用いて遺伝子組換え GFP を発現させた。アミノ酸配列、蛍光観察により、遺伝子組換え GFP の発現を確認した。

高比表面積の材料(ポリエチレン多孔質膜)の表面に、後述の大気圧プラズマグラフト重合を用いて COOH 基を持つアクリル酸のグラフト鎖を導入し、さらにアミド形成反応を用いて IDA 基と maleimide 基を導入した。FT-IR により各段階の合成に成功したことを確認した(図3)。また、IDA 基への Ni²⁺の定量的な配位を Ni²⁺の吸光度測定により確認した。

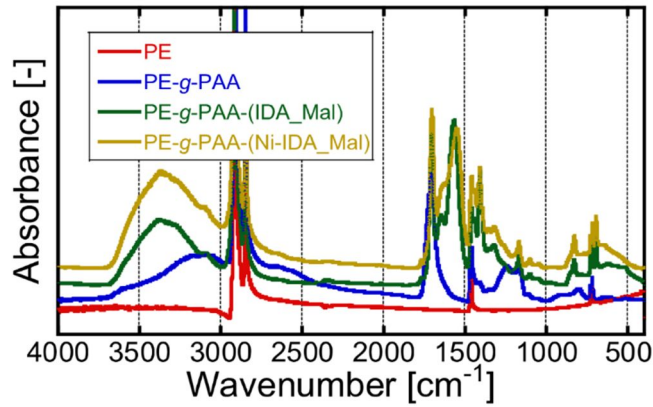


図 3. ポリエチレン多孔質膜へのポリアクリル酸 (PAA) のグラフト修飾、IDA 基、maleimide (Mal) 基の修飾による FT-IR の変化

(2) 大気圧プラズマグラフト重合法のメカニズム解明および汎用性の証明

図 4 には大気圧プラズマ法と低圧プラズマ法のグラフト重合量の pH 依存性を示すが、pH4 付近で極大、pH2 付近で極小を取るという特徴的な依存性が再現されている。その他のパラメータに対する依存性もよく一致することが確かめており、このことから両法のメカニズムが同等のラジカル重合により進行していることが示唆され、低圧プラズマグラフト重合法の知見を大気圧プラズマ法に活かせることが明らかになった。同条件では、プラズマ密度 (気体密度 × 電離度) の高い大気圧プラズマ法の重合量が大きくなることも見出した。また大気圧プラズマの照射パターンにより、図 5 のようにグラフト修飾位置のパターニングが可能であることも見出している。

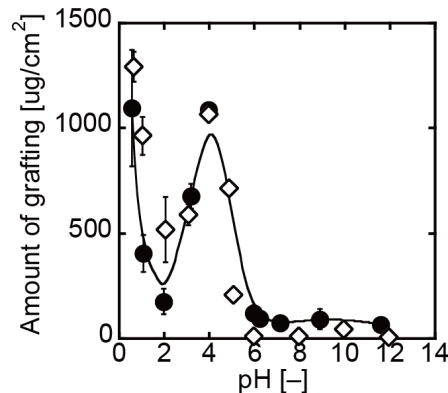


図 4. 大気圧プラズマグラフト重合量の pH 依存性。●は大気圧プラズマ法、◇は従来の低圧プラズマ法。pH 依存性の類似性が共通のメカニズムを示唆

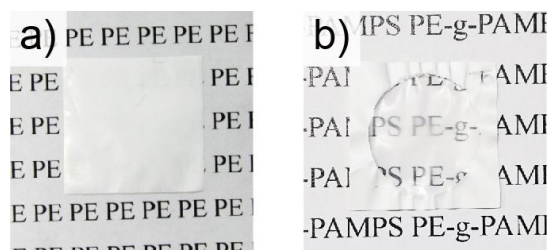


図 5. 大気圧プラズマグラフト重合によるパターニング。a)グラフト重合前、b)グラフト重合後

本研究では、本法が 10 種類以上の種々の性質を持つビニルモノマーに対して適用できることも見出している。また、ポリエチレン以外にも多様な材料表面にグラフト重合が可能であることを見出し、多様な材料表面に、種々の表面改質が可能であることを見出した。また、本法により生成したグラフトポリマーは分子量が数百万にも上る超高分子量グラフトポリマーであることを

明らかにした(図6)。これは数百 nm の大きさを持つ細孔を埋めうる長さであった。

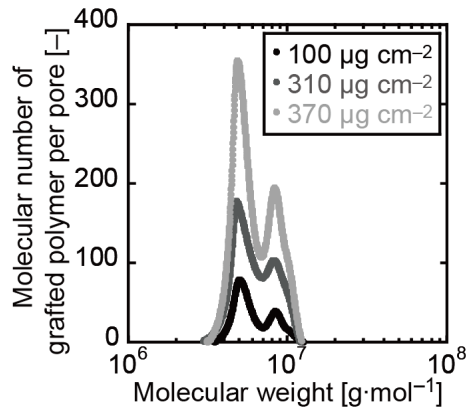


図6. 大気圧プラズマグラフト重合により生成したグラフトポリマーの分子量分布。分子量数百万の超高分子量グラフトポリマーが生成していることが分かる

(3) 遺伝子組換え GFP と修飾材料表面の反応によるグラフト酵素の作製

(1)において、仮固定用の Ni-IDA のみを導入した膜と、それに加えて本固定用の maleimide 基も導入した膜に対して、His-tag と cysteine を末端に持つ遺伝子組換え GFP を反応させた結果を図7に示す。仮固定用の Ni-IDA 基のみを固定した膜(対照系)においては、仮固定後に GFP が脱離していることが見受けられる。一方で、仮固定に加えて本固定用の maleimide 基を固定した膜(実験系)においては、仮固定後と本固定後、また溶出後も蛍光は失われず、またこの間ほぼ同じ蛍光を示したことから、仮固定した GFP が共有結合により固定されていることが示唆された。

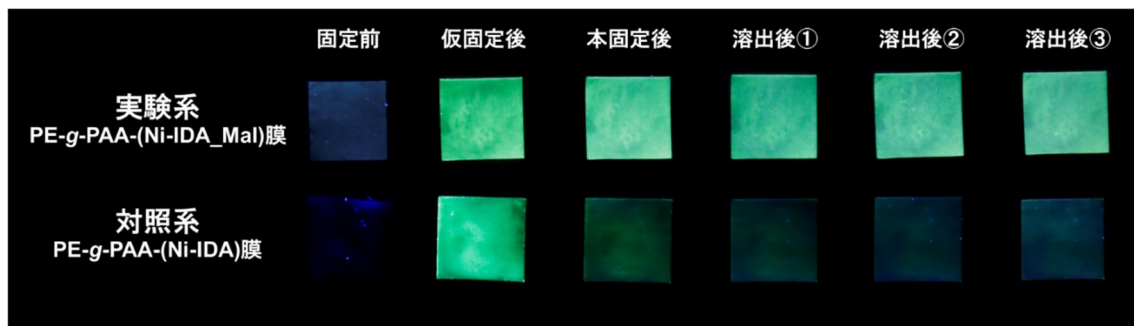


図7. 仮固定・本固定用の官能基を持つ膜(実験系)と仮固定用の官能基のみを持つ膜(対照系)への遺伝子組換え GFP の修飾結果

本系では、酵素と材料表面の両者に、仮固定用と本固定用の官能基を導入する必要がある点がネックであった。特に酵素の遺伝子組換えを各酵素に対して一つずつ行っていくことは、実用を考えると改善が必要である。今後はリフォールディング可能なグラフト酵素というコンセプトを保ちながら、これを少ない労力で合成する実験系の確立が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaya Ogawa, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi	4. 巻 731
2. 論文標題 Proton diffusion facilitated by indirect interactions between proton donors through several hydrogen bonds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 136627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cplett.2019.136627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuuki Sugawara, Toshiki Takei, Hidenori Ohashi, Hidenori Kuroki, Shoji Miyanishi, and Takeo Yamaguchi	4. 巻 52
2. 論文標題 Autonomous shrinking/swelling phenomenon driven by macromolecular interchain cross-linking via -cyclodextrin-triazole complexation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 8551-8562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.9b01627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Qian Bao, Li Xie, Hidenori Ohashi, Masaaki Hosomi, Akihiko Terada	4. 巻 152
2. 論文標題 Inhibition of Agrobacterium tumefaciens biofilm formation by acylase I-immobilized polymer surface grafting of a zwitterionic group-containing polymer brush	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 107372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bej.2019.107372	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wataru Yonamine, Sivasakthivel Thangavel, Hidenori Ohashi, Chihiro Fushimi	4. 巻 174
2. 論文標題 Performance Analysis of a Water-Gas Shift Membrane Reactor for Integrated Coal Gasification Combined Cycle Plant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Energy Conversion and Management	6. 最初と最後の頁 552-564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.enconman.2018.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hidenori Ohashi, Jung Hyangmi, Xueqin Chi, Shoji Miyanishi, Takeo Yamaguchi	4. 巻 47
2. 論文標題 Alkali-resistant Anion Exchange Membranes with Grafted Polyelectrolyte for Fuel Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 857-859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.180321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suenaga Toshikazu, Aoyagi Ryo, Sakamoto Nozomi, Riya Shohei, Ohashi Hidenori, Hosomi Masaaki, Tokuyama Hideaki, Terada Akihiko	4. 巻 126
2. 論文標題 Immobilization of Azospira sp. strain I13 by gel entrapment for mitigation of N ₂ O from biological wastewater treatment plants: Biokinetic characterization and modeling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 213 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.02.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋本颯人, 長澤寛規, 大橋秀伯
2. 発表標題 大気圧プラズマグラフト重合法の基礎的検討とその応用
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 福島悠歩, 清水雄介, 須黒雅博, 野木栄信, 大橋秀伯
2. 発表標題 グラファイトの表面微量酸官能基の定量
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 松井凌我, 大橋秀伯
2. 発表標題 高分子溶液の粘弾性測定を用いた分子拡散性予測
3. 学会等名 膜シンポジウム2020
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 杉浦響也, 大橋秀伯
2. 発表標題 バナジウムレドックスフロー電池用の価数選択型電解質膜の開発
3. 学会等名 膜学会第42年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松井凌我, 大橋秀伯
2. 発表標題 高分子中の分子拡散性予測における自由体積の加成性に関する議論
3. 学会等名 膜学会第42年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 加藤葵, 大橋秀伯
2. 発表標題 マイクロ流路透析を用いた高濃度タンパク質リフォールディング法の開発
3. 学会等名 膜シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤葵、大橋秀伯
2. 発表標題 マイクロ流路型高比表面積圧透析によるタンパク質高速濃縮
3. 学会等名 化学工学会 第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋秀伯・藤井一洋、清水雄介、野木秀信、須黒雅博、張涵
2. 発表標題 グラファイトの気相修飾によるLIBの高温保存性能向上
3. 学会等名 化学工学会 第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋 秀伯
2. 発表標題 移動物性を基盤としたデバイス・システム設計
3. 学会等名 化学工学会 第50回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋 秀伯、加藤 葵
2. 発表標題 マイクロ流路透析による高濃度タンパク質リフォールディング
3. 学会等名 化学工学会 第84年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 リチウム二次電池、及びリチウム二次電池の製造方法	発明者 清水雄介、張涵、野木秀信、須黒雅博、大橋秀伯・藤井一洋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-032227	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Welcome to Ohashi Lab 大橋研究室へようこそ http://web.tuat.ac.jp/~ohashilab

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------