

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19760553  
 研究課題名（和文） 気泡塔に懸濁させたリポソーム内の光誘起電子移動反応による連続的二酸化炭素還元操作  
 研究課題名（英文） Carbon dioxide reduction process using liposomal photochemical reaction system suspended in a bubble column  
 研究代表者  
 吉本 誠 (YOSHIMOTO MAKOTO)  
 山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：80322246

研究成果の概要：酵素反応を用いて二酸化炭素を循環利用するために、脂質膜小胞（リポソーム）により酵素を安定化するとともに、連続反応のための脂質膜内光誘起電子移動反応系を構築する。リポソーム内酵素は高次構造が著しく安定化され、ガス通気を伴う反応器内で安定であった。また、クロロフィル複合化リポソームを調製して脂質膜系光化学反応の特徴を明らかにした。以上より二酸化炭素還元プロセス構築のための各要素に関する重要な知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオリアクター、酵素反応、ナノバイオ、生体機能利用、化学工学

## 1. 研究開始当初の背景

複合脱水素酵素反応系は還元型補酵素の共存下、二酸化炭素を逐次的に還元してメタノールを生成する。本反応は二酸化炭素循環利用の観点から有用であるが、逐次酵素反応と補酵素の酸化還元状態の制御が困難となる。連続的二酸化炭素還元プロセスを構築するためには、二酸化炭素の気液間物質移動、逐次脱水素酵素反応及び補酵素再生反応が効率よく進行する反応場をバイオリアクターの条件下において構築する必要がある。申請者は、脂質二分子膜小胞（リポソーム）の微小内水相において酵素の多量体構造が安

定化されることを明らかにした。また、気泡塔内気液流動場において基質に対する脂質膜透過性が増大して高いリポソーム系酵素反応速度が得られることを示した。これらより、リポソーム系に複合脱水素酵素反応系を封入して補酵素再生のための光誘起電子移動反応系を構築できれば、実用反応器内連続的二酸化炭素還元には有用な触媒が得られると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、アルコール脱水素酵素 (ADH)、蟻酸脱水素酵素 (FDH) 及びクロロフィル a

(Chla)等の二酸化炭素還元に必要な分子種のリポソーム内への安定な封入及び可視光照射下でリポソーム系電子移動反応効率を増大させるための Chla 励起種の長寿命化を検討して、気泡塔において連続的二酸化炭素還元反応系を構築することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 脱水素酵素内包リポソームの調製 リポソームを構成する脂質として、POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) を用いた。乾燥脂質膜を、5.0 g/L Yeast ADH or 1.1 g/L FDH (from *Candida boidinii*) を溶解した 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で水和・凍結融解し、Extrusion 法で直径約 100 nm の酵素内包リポソームを調製した。水和時に 10 mM 補酵素を共存させて酵素/補酵素系を内包したリポソームを調製した。遊離酵素はゲル濾過(GPC)で分離した。リポソーム内の酵素、 $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADH}$  各濃度はコール酸で脂質膜を溶解後、酵素活性、 $A_{260}$ 、 $A_{340}$  でそれぞれ測定した。

(2) 酵素活性の測定 ADH 活性は、2.5 mM  $\text{NAD}^+$  の共存下、150 mM Ethanol の初期酸化速度を生成  $\text{NADH}$  量 ( $A_{340}$ ) に基づき決定した。FDH 活性は、0.3 M 蟻酸を基質として、1.5 mM  $\text{NAD}^+$  を添加したときの  $\text{NADH}$  の初期生成過程を  $A_{340}$  で追跡して決定した。

(3) リポソーム内封入脱水素酵素の熱安定性 各リポソーム系脱水素酵素 ([POPC] = 2.8-13 mM) 及び遊離酵素/補酵素系 ([Enzyme] = 0.1-5 g/L, [Cofactor] = 3.0~6.0 mM) の 55, 60 °C における活性の安定性を 1 h 追跡した。

(4) 気泡塔におけるリポソーム内封入 FDH の安定性 ライザー径 15 mm, ダウンカマー径 9 mm の外部循環式エアリフト型気泡塔に 30 mL の各リポソーム型触媒懸濁液または遊離 FDH, 遊離 FDH/補酵素溶液を仕込んだ。フィルター, 加湿器を通過させた窒素ガスをガス空塔速度  $U_G = 0$  (静止液), 2.0, 3.0 cm/s, 45 °C で通気し, 触媒活性を 3 h 追跡した。

(5) Chla 複合化脂質膜の調製と電子移動反応

① Chla 複合化リポソームの調製 POPC, POPC の Choline 基が Glycerol 基に変化した POPG, Cholesterol (Cho) と Chla からなる乾燥膜を 100 mM EDTA を溶解した 50 mM Tris-HCl/0.1 M NaCl 緩衝液 (pH 7.4) で水和し, 凍結融解後, Extrusion 法によりリポソーム径を約 100 nm とした。リポソーム外水相の Chla を GPC で分離して Chla 複合化リポソームを調製した。リポソーム懸濁液の脂質濃度  $C_L$  は酵素法で測定した。リポソームをコール酸で溶解後,  $A_{420}$  を測定して Chla 濃度  $C_{Chla}$  を決定した。脂質膜への Chla 複合化収率  $Y$  は GPC 前後の  $C_{Chla}/C_L$  比として算出した。

② 脂質膜内 Chla-電子メディエータ間相互作用の評価 Chla 複合化リポソーム ([Lipid] =

9.0  $\mu\text{M}$ ) に種々の濃度の Methylviologen (MV) を添加し, 10 min 室温で遮光静置した後, 25 °C において 421 nm で励起したときの最大蛍光強度  $I$  を測定した。MV 非共存下の強度  $I_0$  との比  $I/I_0$  を MV 濃度に対して Stern-Volmer プロットした傾き  $K_{SV}$  を Chla-MV 親和性の指標とした。

③ Chla 複合化リポソームによる MV 光還元反応 石英セル中に仕込んだ Chla 含有リポソームと  $\text{MV}^{2+}$  の混合液 ([Lipid] = 9.0  $\mu\text{M}$ , 3 mL) に光源 (ハロゲン or 421 nm の単波長光) をセルから 3 cm の距離で照射した。60 min 後の生成還元型 MV 濃度を  $A_{605}$  から決定した。Cholate で可溶化した Chla 系を比較に用いた。

### 4. 研究成果

(1) リポソーム内封入脱水素酵素の特性と熱安定性

① 脱水素酵素内包リポソームの特性 表 1 にリポソーム内水相の各脱水素酵素・補酵素濃度を示す。酵素に比べて著しく分子量が小さい補酵素分子がリポソーム内に安定に封入されていることがわかる。リポソーム内酵素は 4 °C の保存時において, 少なくとも 14 d は失活せず安定であった。

表 1 リポソーム内水相酵素・補酵素濃度

リポソーム内触媒系	酵素濃度 [g/L]	補酵素濃度 [mM]
ADH	3.3	-
ADH/ $\text{NAD}^+$	2.3	3.9
FDH	0.91	-
FDH/ $\text{NAD}^+$	0.77	4.4
FDH/ $\text{NADH}$	0.77	6.8

② 遊離脱水素酵素の熱安定性 図 1 に濃度が異なる遊離 FDH の 55 °C における FDH 活性の安定性を示す。遊離 FDH の安定性は酵素濃度が高いほど促進されている。これは, 低酵素濃度条件下では FDH の多量体構造が Subunit へ解離して失活するためと考えられる。遊離 ADH(45°C)でも同様の傾向が見られた。遊離 FDH/補酵素系は, 同一酵素濃度の遊離 FDH と比べて高い熱安定性を示した(データ省略)。これより FDH と補酵素が熱安定性の高い複合体を形成することがわかった。FDH/ $\text{NADH}$  は FDH/ $\text{NAD}^+$  に比べて高い熱安定性を示した。図 2 に遊離 ADH/ $\text{NAD}^+$  及び遊離 ADH の 50 °C における ADH 活性の熱安定性を示す。どの遊離 ADH も失活は促進されているが, 酵素濃度と  $\text{NAD}^+$  共存の有無に無関係にほぼ同程度に失活している。各熱処理時の ADH の構造変化を調べるために, 50 °C における遊離 ADH (2.3 mg/mL) 溶液の濁度 ( $A_{450}$ ) の経時変化を測定したところ, 著しい濁度の増大が見られた (データ省略)。

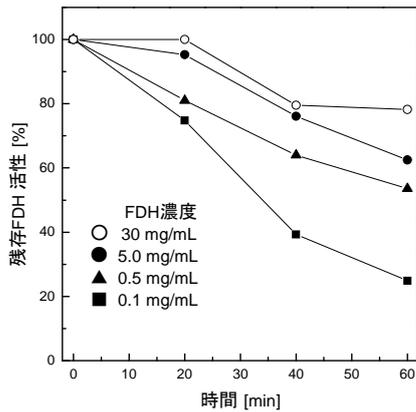


図1 各濃度の遊離 FDH の安定性 (55°C)

これは、酵素の3次構造変化が顕著となり、酵素分子表面に露出した疎水部位同士が結合して凝集体を形成したためと考えられる。NAD<sup>+</sup>はADHを構成する4つの各サブユニット内の活性部位近傍に結合すると考えられる。3次構造が著しく変化する50°Cにおける遊離ADH分子内では、NAD<sup>+</sup>の結合部位の構造が崩壊し、安定なADH-NAD<sup>+</sup>複合体を形成できないことを示している。また、50°Cでは、酵素の3次構造変化が主たる酵素失活の要因となるため、酵素濃度にほぼ無関係に失活が促進されたものと考えられる。

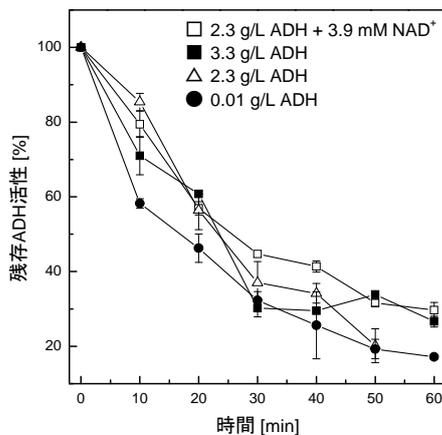


図2 50°Cにおける遊離ADH、遊離ADH/NAD<sup>+</sup>の安定性

③ リポソーム内封入脱水素酵素の熱安定性  
 図3にリポソーム内に封入されたADH/NAD<sup>+</sup>とADHの50°CにおけるADH活性の熱安定性を示す。リポソーム系のADH活性は遊離系(図2)に比べて著しく高い安定性を示している。これより、脂質膜がADHの3次構造変化を効果的に抑制することが確認できる。また、図3において、ADH/NAD<sup>+</sup>内のADH活性はADH系に比べて著しく高い安定性を示している。これは、リポソーム内水相においては、ADHの3次構造が安定化される結果、ADHがNAD<sup>+</sup>と熱安定性の高い複合体を

生成し易いためと考えられる。一方、リポソーム内に封入されたFDH/NAD, FDH/NADH, FDHは60°Cにおいて高い熱安定性を示した(データ省略)。これは、リポソーム系において、補酵素によるFDH活性の安定化効果が発現することを示している。

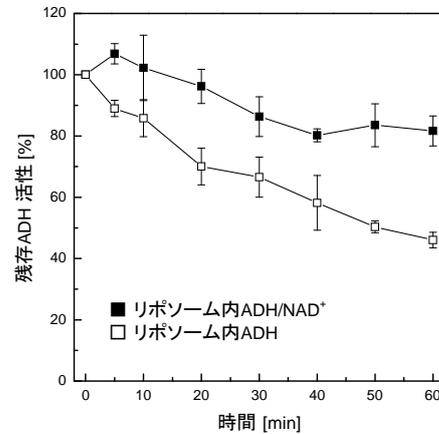


図3 リポソーム内ADH, ADH/NAD<sup>+</sup>系の安定性 (50°C, [POPC] = 2.8 mM)

(2) 気泡塔におけるリポソーム内封入FDHの安定性

① 気泡塔における遊離FDH, FDH/補酵素の安定性  
 45°Cの静止液に遊離FDH, 遊離FDH/補酵素系を3h保存したところ、各触媒の失活は認められなかった(データ省略)。図4に $U_G = 2.0$  cm/sのエアリフトにおける各遊離酵素系の安定性を示す。初期FDH活性を100%としている。3h経過後の活性は、FDH/NADH > FDH > FDH/NAD<sup>+</sup>系の順に高くなっている。 $U_G = 3.0$  cm/sでも同様の傾向が見られたが、3h経過時の各触媒の失活は、 $U_G = 2.0$  cm/sの場合に比べて促進された。これらの結果より、エアリフト内における遊離FDHの失活は、気液界面における酵素の構造変化が原因であり、高 $U_G$ では、気泡群と酵素間の接触頻度が増大するため、酵素の失活が顕著となったと考えられる。遊離FDH/NADH系では、各 $U_G$ において、他の触媒系に比べてライザー上部の泡沫層が発達する傾向が認められた。このことは、NADH分子が気液界面を安定化することを示している。NADHによる遊離FDHの安定化は、NADHが吸着した気液界面ではFDHの失活が抑制されることを示している。一方、NADHに比べ親水性が高いNAD<sup>+</sup>は液本体及び気泡周囲の液境膜内に可溶化され、気液界面の性質に及ぼす影響が小さいと考えられる。遊離FDH/NAD<sup>+</sup>系が最も不安定であることから、pH 8.5で負に帯電したFDH分子( $pI = 5.4$ )とNAD<sup>+</sup>間の静電相互作用によりFDH分子表面が疎水化され、FDH-気液界面間相互作用が促進されることが示唆される。以上より、エアリフトにおける遊離FDHの安定性は $U_G$ 依存

的に低下し、共存補酵素の性質に影響を受けることがわかった。

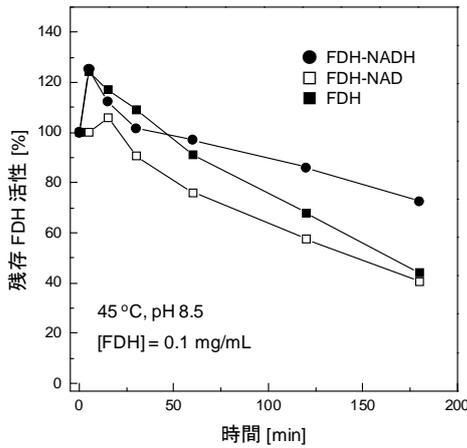


図4 エアリフト型気泡塔における遊離FDH, FDH/補酵素系の安定性

② 気泡塔におけるリポソーム内封入FDHの安定性 図5にリポソーム内FDH, FDH/補酵素各触媒を45°C,  $U_G = 3.0$  cm/sのエアリフトに3h懸濁時の残存FDH活性の経時変化を示す。各触媒系で25°Cの初期活性に比べて45°Cの高い活性が維持されている。これらの結果は、エアリフトの気液流動場において、リポソームの脂質二分子膜構造が安定であり、リポソーム内封入FDHと気泡群間の相互作用が生じないことを示している。

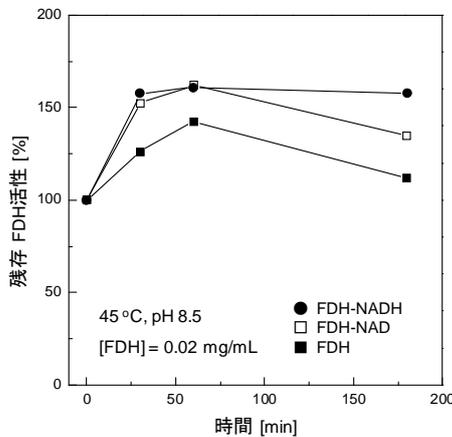


図5 エアリフト型気泡塔におけるリポソーム内封入FDH, FDH/補酵素系の安定性

(3) Chla 複合化リポソーム系の光誘起電子移動反応特性

① Chla 複合化リポソームの特性 表2に各脂質二分子膜に複合化されたChla含有量とY値を示す。Y値は、0.85以上である。すなわち、リポソーム調製時に仕込んだChlaのうち85%以上がリポソーム膜に複合化された。したがって、安定なコロイド分散系を形成する

リポソーム膜へのChla複合化により、Chlaを水溶液中に高濃度に分散させることができる。

表2 Chla 複合化リポソームの特性

脂質組成 (モル比)	Chla 含有量 [mol%]	複合化収率 Y [-]
1. POPC	8.3	1.0
2. POPC:Cho (5:1)	5.3	0.85
3. POPC:POPG:Cho (4:2:1)	4.7	0.86

② 脂質二分子膜内 Chla-MV 間相互作用 Chla 複合化リポソーム懸濁液に種々の濃度(0-0.8 mM)のMVを添加した。POPC/Cho膜のリポソーム系で得られた蛍光スペクトル変化を図6に示す。MV共存により蛍光強度が低下している。これは、リポソーム膜内で励起されたChlaに液本体中のMVが衝突して、励起エネルギーが熱エネルギーに変換され、蛍光が消光したためである。この消光は高MV条件下ほど顕著となっている。種々の二分子膜に複合化された相対Chla蛍光 $I/I_0$ とMV濃度の関係(Stern-Volmerプロット)を図6に示す。各直線の傾き $K_{SV}$ 値はPOPC/POPG/Cho膜 < POPC膜 < POPC/Cho膜の順に大きくなっている。これより、脂質膜内Chlaと液本体中MVの相互作用は、POPC/Cho膜において促進されることがわかる。また、脂質膜中に負に帯電したPOPGが共存するとChla-MV間相互作用が他の脂質膜系に比べて阻害されることがわかる。

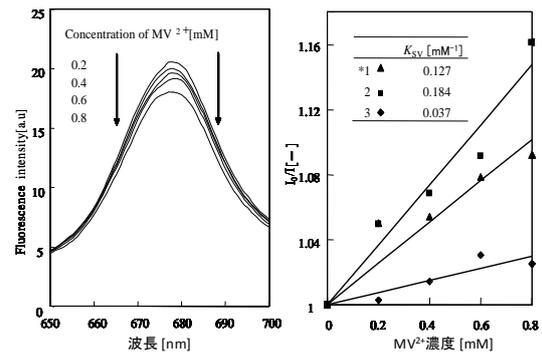


図6 Chla 蛍光(左図)と Stern-Volmer プロット(右図、番号は表2と対応する)

③ Chla 複合化リポソーム系の光誘起電子移動特性 ハロゲン光源を用いた場合、POPC/Cho膜のリポソーム、Cholate ミセルいずれの系においても60min光照射後の $A_{605}$ は低下した。これは、Chla分子の分解に起因するものと考えられる。421nmの単波長光を用いた場合、リポソーム系においてのみ低レ

ベル(60 min 間で MV 還元率 0.7%)の光誘起電子移動反応の進行が認められた。

以上、得られた成果のうち、リポソーム内における脱水素酵素-補酵素複合体形成による酵素活性の著しい安定化については、本研究ではじめて明らかにされた現象であり、酵素反応プロセスの構築において重要である。リポソーム/補酵素共存系による酵素安定化機構の解明が必要である。気泡塔内気液流動場におけるリポソーム内封入酵素の高い安定性は、本触媒系の高い実用性を実証するものである。気液流動場におけるリポソーム内封入脱水素酵素の二酸化炭素還元活性について、現在詳細な検討を行っている。リポソーム系に構築された *Chla* 光誘起電子移動反応系で得られた電子移動効率、脂質膜組成、粒子径、照射方式に基づきさらに増大させる必要がある。上述のように、気泡塔内における二酸化炭素還元プロセスのための主要な要素に関する重要な知見が得られた。今後は、これらの複合化による連続的反応プロセスの構築と操作安定性の評価を行う。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① M. Yoshimoto, H. Sakamoto, H. Shirakami, Covalent conjugation of tetrameric bovine liver catalase to liposome membranes for stabilization of the enzyme tertiary and quaternary structures. *Colloids and Surfaces B*, **69**(2), 281-287 (2009). 査読有
- ② M. Yoshimoto, M. Sato, N. Yoshimoto, K. Nakao, Liposomal encapsulation of yeast alcohol dehydrogenase with cofactor for stabilization of the enzyme structure and activity. *Biotechnology Progress*, **24**(3), 576-582 (2008). 査読有
- ③ M. Yoshimoto, M. Monden, Z. Jiang and K. Nakao, Permeabilization of phospholipid bilayer membranes induced by gas-liquid flow in an airlift bubble column. *Biotechnology Progress*, **23**(6), 1321-1326 (2007). 査読有
- ④ M. Yoshimoto, Y. Miyazaki, A. Umemoto, P. Walde, R. Kuboi and K. Nakao, Phosphatidylcholine vesicle-mediated decomposition of hydrogen peroxide. *Langmuir*, **23**(18), 9416-9422 (2007). 査読有
- ⑤ M. Yoshimoto, H. Sakamoto, N. Yoshimoto, R. Kuboi and K. Nakao, Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver catalase through encapsulation in liposomes. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**(6-7), 849-858 (2007). 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- ① 吉本誠ら, エアリフト型気泡塔内蟻酸脱水素酵素の安定性に及ぼすリポソーム内封入と補酵素の影響, 化学工学会第 74 年会, 2009.3.18, 横浜
- ② 佐藤真巳ら, リポソーム内封入アルコール脱水素酵素の熱安定性に及ぼす荷電脂質の影響, 化学工学会姫路大会, 2008.11.18, 姫路
- ③ 吉本誠ら, 気泡塔内気液流動を利用する酵素封入リポソームの選択的膜透過性と反応性の制御, 化学工学会第 40 回秋季大会, 2008.9.24, 仙台
- ④ 山崎亮ら, 蟻酸脱水素酵素の活性と安定性に及ぼすリポソーム内封入と補酵素の影響, 化学工学会第 40 回秋季大会, 2008.9.24, 仙台
- ⑤ M. Yoshimoto et al., Highly stable formate dehydrogenase/cofactor reaction system encapsulated in phospholipid vesicles, American Chemical Society, 236th National Meeting & Exposition, 2008.8.20, Philadelphia, USA.
- ⑥ 佐藤真巳ら, リポソーム内に封入されたアルコール脱水素酵素の反応性に及ぼす脂質膜特性の影響, 化学工学会第 73 年会, 2008.3.17, 浜松
- ⑦ 吉本誠ら, アルコール脱水素酵素の多量体構造と活性に及ぼすリポソーム内封入と脂質膜の影響, 膜シンポジウム 2007, 2007.11.15, 宇部
- ⑧ M. Yoshimoto et al., Preparation and characterization of alcohol dehydrogenase containing liposomes for improving its quaternary structure, American Chemical Society, 234th National Meeting & Exposition, 2007.8.22, Boston, USA.

[図書] (計 1 件)

- ① P. Walde, S. Ichikawa, M. Yoshimoto, American Scientific Publishers, Chapter 7 The fabrication and application of enzyme-containing vesicles. In Bottom-Up Nanofabrication; Ariga, K. and Nalwa, H. S.; Ed., Vol. 2, pp 199-221 (2009)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 誠 (YOSHIMOTO MAKOTO)

山口大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80322246

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし