

様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19760559
研究課題名（和文）ベシクルバイオリアクターを利用した効率的タンパク質合成システムの開発
研究課題名（英文）Development of an efficient system for protein synthesis using vesicular bioreactors
研究代表者
黒岩 崇（KUROIWA TAKASHI）
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所・契約研究員
研究者番号：60425551

研究成果の概要：

効率的な無細胞タンパク質合成のためのバイオリアクター開発を目指して、脂質二分子膜からなる閉鎖小胞体であるベシクルを反応場とする新規なバイオリアクターシステムについて検討した。均一径エマルジョンを基材として細胞サイズのベシクルに効率よく酵素や反応成分を封入できるベシクル作製法“脂質被覆水滴水和法”を開発し、従来法では効率的な内包化が困難であった親水性物質の内包効率を飛躍的に高めることができた。さらに、酵素を封入したベシクルを利用して、ベシクル内で選択的な生化学反応系を構築でき、さらにフローサイトメトリーを利用して多量のベシクル内で並列的に進行する反応を迅速に分析する手法を開発できた。以上の成果は、既存法では合成効率の低い種々のタンパク質の効率的な合成システムの実現に大いに寄与すると期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,900,000	0	1,900,000
平成20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：（分科）プロセス工学 （細目）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、バイオテクノロジー、ベシクル、マイクロバイオプロセス

1. 研究開始当初の背景

実用化が期待される生化学反応技術の一つに、細胞からタンパク質合成に関与する成分を取り出し、試験管内で反応を行う「無細胞タンパク質合成」がある。本法には、細胞内に比べて合成速度が速く、多様なタンパク質を比較的大量に合成できるなど、学術面・実用面で注目すべき利点が多い。一方、タンパク質の1つのペプチド結合をつくるためにはATPを4分子も必要とし、エネルギー源であるATPの枯渇が合成収量を制限する因子となりやすいなど、反応系を細胞から取り出すデメリットもある。

近年、細胞に類似した閉鎖膜構造を持つ脂質ベシクル（リポソーム）内で生化学反応を行う”ベシクルバイオリクター（図1）”が注目されている。脂質ベシクルは、微小空間内に親水的反応場（内水相）と、疎水的反応場（脂質二分子膜）を合わせ持つユニークな構造体である。ベシクルをバイオリクターとしてタンパク質合成に用いると、均一水溶液では困難な疎水性タンパク質の合成や、膜を介した物質移動を駆動力としたエネルギー再生系を組込んだ反応系の構築が期待できる。しかし、ベシクル内の閉鎖微小空間に反応系を構築すること自体が難しく、ベシクルに所望の酵素や基質を封入し反応に用いるための汎用的な手法が確立されていないことが大きな問題となっている。

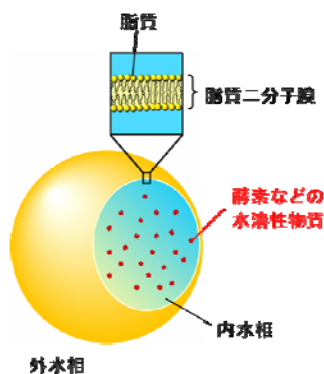


図1. ベシクルバイオリクターの模式図.

研究代表者は、これまでにバイオリクターによる物質生産に関する酵素工学的研究および超微細加工デバイスを利用した機能性微粒子製造技術に関する研究を行ってきた。これらの研究で修得した知識・実験技法を活かして、新規かつ高効率な生化学反応技術としてベシクルバイオリクターを利用するための基盤技術を提供できると考え、本研究を始

めるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質の高効率合成を指向したベシクルバイオリクターを開発し、新規な生化学反応技術として利用するための基礎を確立することである。本研究では、以下の2点について検討した。

(1) 酵素などの反応成分を内包したベシクルの量産技術の開発

これまでの技術では、固体上に形成された脂質薄膜を、酵素や基質を含む水溶液で水和、振盪することでベシクルを調製するのが一般的である。しかし、水溶性物質の封入効率が著しく低い（高い場合で数%程度）ことに加え、得られるベシクルのサイズは不均一である。これに対し、顕微鏡で観察しながらひとつひとつのベシクルに酵素や基質を逐一注入する方法も用いられているが、多数のベシクルに反応成分を封入することは困難で、望むタンパク質の大量合成には適用できない。本研究では、均一な大きさの微細水滴に酵素などの水溶性成分を封入し、これを基材としてベシクルを調製することを試みた。図2に本研究におけるベシクル作製法の概略を示す。多数の微細水滴がそのままベシクルの内水相になるような操作を実現することで、多数のベシクルに同時にかつ高内包率で反応成分を内包できると期待される。

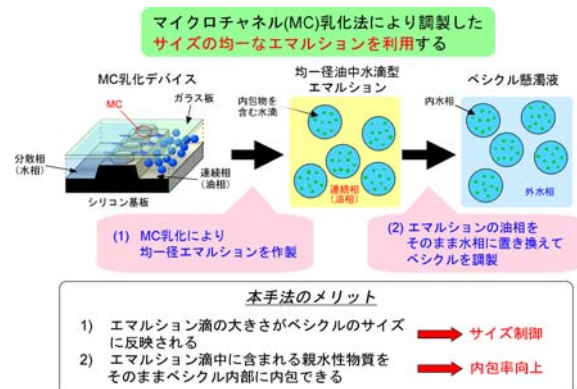


図2. 本ベシクル作製法の概略.

(2) ベシクルバイオリクターを利用した反応・分析評価・分離技術の開発

ベシクルを酵素反応場として利用するためには、ベシクルに内包した酵素や基質が効率よく反応すること、および反応生成物の検出や回収が容易であることが必要である。そのために、脂質二分子膜を介した基質の透過現象を利用してベシクル内部での酵素反応を誘

発する反応システムを構築し、さらに、反応生成物の検出から分離・回収までを一貫した操作で定量的かつ大量に取り扱うことができる技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 酵素などの反応成分を内包したベシクルの作製

本研究では、均一な大きさの微細水滴を作製可能な「マイクロチャネル (MC) 乳化法」を利用して均一径液滴を含む油中水滴型 (W/O) エマルションを作製し、これをベシクルの基材として用いた。このエマルション中の水滴を凍結させた状態で水滴周囲の油相 (乳化剤を含む) を取り除き、代わりにリン脂質やコレステロールなどのベシクル構成脂質を含む油相を添加した。水滴の凍結状態を保ったまま油相を蒸発除去することでベシクル構成脂質を水滴表面に析出させ、脂質層に覆われた水滴すなわち脂質被覆水滴を作製した。これにベシクルの外水相となる水溶液を添加して脂質層を水和し、ベシクルを作製した。

(2) ベシクルバイオリクターを利用した反応・分析評価・分離回収

ベシクル内で生化学反応を構築するにあたり、本研究では酵素として α -キモトリプシン (α -CT) およびカルボキシエステラーゼ (CE) を使用し、図3に示すような反応系を構築した。この反応系では、外水相にベシクルの基質を添加し、基質が膜を透過してベシクル内に入ることで、ベシクル内で酵素反応が誘発される。ベシクル内酵素反応は、分光光度計を用いた反応生成物濃度の経時変化測定およびフローサイトメーター (FCM) を利用したベシクル内の生成物の個別検出により評価した。

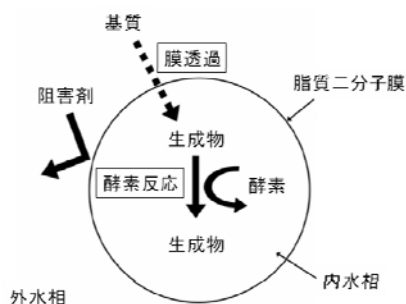


図3. 基質の膜透過を利用したベシクルバイオリクターによる酵素反応システムの概略。

4. 研究の成果

(1) 脂質被覆水滴水和法によるサイズ制御と物質内包を両立できるベシクルの作製

MC乳化法で作製した均一液滴径W/Oエマルションを基材とし、上述の脂質被覆水滴水和法で、蛍光マーカーカルセインを内包したベシクルを作製した。サイズの異なるMC乳化デバイスによりカルセインを含み平均液滴径が数 μm ~数十 μm の範囲で種々異なるW/Oエマルションを作製し (図4左列)、このW/Oエマルションを基材としてベシクルを作製したところ、カルセインを内包したベシクルが得られ、そのサイズは基材としたエマルションの液滴径を反映していた (図4右列)。すなわち、脂質被覆水滴水和法により、液滴径が制御され、かつ水溶性物質を内包したベシクルを作製することができた (特許取得済み)。

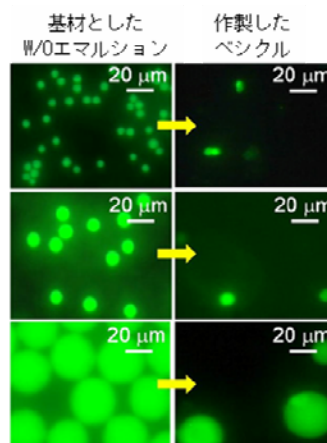


図4. MC乳化法により作製した均一径W/Oエマルション (左列) とこれを基材として脂質被覆水滴水和法により作製したベシクル (右列) の蛍光顕微鏡画像。エマルションの水滴には緑色蛍光マーカーのカルセインを溶解させてあり、作製後のベシクル内水相からもカルセインの緑色蛍光が認められる。

(2) 水溶性物質の内包率の向上

脂質被覆水滴水和法により、水溶性物質のベシクルへの内包化について検討した。水溶性の内包物質としては、蛍光マーカーであるカルセインのほか、生体高分子である牛血清アルブミン (タンパク質) およびデキストラン (多糖類) を使用した。図5に、各物質の内包化において、脂質層の水和操作を (i) 通常の方法 (方法A、青色) と (ii) 疎水化処理を行ったガラス製試験管中で同様の緩衝液にグリセロール、直径65 nmの微小なベシクルを加えたものを用いて行った場合 (方法B、赤色) の内包率を示した。方法Aでは7%~40%程度の内包率が得られた。これらの値は一般的に用いられている脂質薄

膜の水和により得られる内包率より高い。さらに、内包率を高めるために種々の工夫を加えた方法Bでは、20~50%と内包率の向上が認められた。この値は、比較的内包率が高いとされる既存のナノサイズベシクル作製法に匹敵し、特にマイクロメーターサイズのベシクルへの内包率としてはかなり高い水準にある。この結果は、脂質被覆水滴水和法のアプローチの有効性を示すものである。

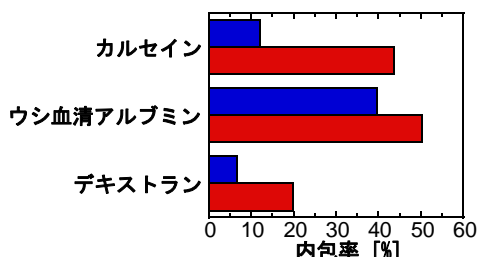


図5. 種々の水溶性物質の内包率. 青色が方法A、赤色が方法Bで作製した場合の内包率を示す. 基材としたエマルションの平均水滴径は約7 μm .

また、内包率のさらなる向上を目指してW/O/W型多相エマルションを基材とした新たなベシクルの作製法を開発した。本法により、親水性の蛍光マーカーであるカルセインに対して、本課題申請時の最終目標であった70%を上回る、80%以上の極めて高い内包率を達成することができた（特許出願中）。

(3) ベシクルバイオリアクター内での酵素反応系の構築と分析評価および分離回収

脂質被覆水滴水和法により、水溶性の酵素を内包したベシクルを作製し、これを微小な反応器、すなわちベシクルバイオリアクターとして利用する検討を行った。まず、酵素 α -CTを内包したベシクルバイオリアクターを作製した。 α -CTを含む平均液滴径約7 μm のエマルション水滴を基材としてベシクルを作製し平均粒径約8 μm のベシクルを得た。ベシクルへの α -CTの内包率は47%と高く、ベシクル調製プロセスを経た α -CTの活性残存率も80%以上と高い値であり、脂質被覆水滴水和法により効率的に酵素を内包したベシクルバイオリアクターを作製できることがわかった。

本調製法でベシクルに内包された α -CTの反応性を調べるため、図3に示すような反応系を構築し、実験を行った。なお、今回の実験条件では、1 mLの反応液におよそ 10^7 個のベシクルバイオリアクターが含まれていると推定される。脂質膜透過性の基質ベンゾイル-L-チロシン-p-ニトロアニリドをベシクル外水相に加え、ベシクル内で加水分解により生

じるp-ニトロアニリンの生成濃度を吸光度により測定した。その際、外水相には α -CTの阻害剤を添加して外水相での酵素反応を阻害した。その結果、p-ニトロアニリンの生成が観測され、その濃度は経時的に増加した(図6、●印)。外水相中の酵素には阻害剤が作用し、外水相中では反応が起こらないと考えられることから、この結果は、脂質膜透過性を有する基質はベシクル内に入り込み酵素によって加水分解されるのに対し、脂質膜を透過できない阻害剤はベシクル内には入らずベシクルに内包された酵素に作用しなかったことを示している。実際、界面活性剤を加えてベシクル脂質膜を破壊して同様の実験を行うと、すべての酵素が阻害され、反応は全く進行しなかった(図6、▲印)。従って、ベシクルを反応場として利用することで、内包成分をベシクル外部の阻害因子から保護しつつ、目的の基質は脂質膜を透過して酵素と反応させることができる、といった選択性を有する酵素反応システムを構築できた。

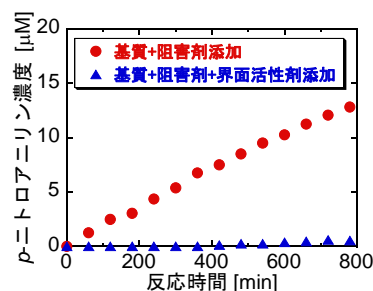


図6. α -CTを内包したベシクルバイオリアクターによる酵素反応.

さらに、酵素CEを内包したベシクルバイオリアクターも作製し、同様に基質の膜透過現象を利用した反応を行った。ベシクル外水相の酵素を膜分離により除去後、外水相に基質フルオレセイン二酢酸を添加したところ、基質添加5分後には図7に示すようにベシクル内部で緑色の蛍光が観察された。この結果は、基質がベシクル脂質膜を透過し、ベシクル内でCEにより加水分解され蛍光物質フルオレセインが生成したことを示す。

続いて、CE内包ベシクルと、CEを内包していないベシクルを等量ずつ混合し、これに基質を添加して酵素反応を行った。基質添加60分後のベシクル懸濁液に対してFCMによる分析を行った結果を図8に示す。図8左側のグラフには、100,000個のベシクルに対して、その粒径を反映する前方散乱光強度とフルオレセイン由来の蛍光強度を測定し、個々のベシ

クルに対する両者の測定値をプロットしてある。グラフ中の赤枠で囲った2つの領域に属するベシクルを回収し、それぞれ顕微鏡観察を行った結果、上側領域には内水相が蛍光を発している（=CEを内包している）ベシクル、下側領域には蛍光を発していない（=CEを内包していない）ベシクルが含まれていた。すなわち、FCMにより酵素内包ベシクルと酵素を内包していないベシクルを分離・回収することができた。この結果は、FCMにより、(1)多数のベシクル内での酵素反応を迅速に個別評価でき、さらに(2)任意の領域から様々な特性を有するベシクルを分取できることを示している。

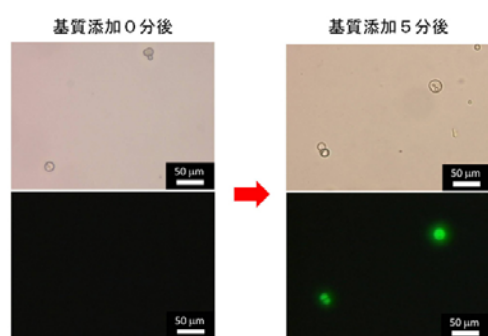


図7. CE内包ベシクルバイオリアクターによる反応の顕微鏡観察。上段は明視野画像、下段は蛍光画像（ただし左右の画像の視野は異なる）。

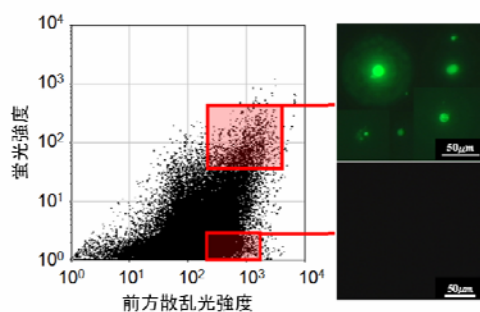


図8. CE内包ベシクルによるベシクル内酵素反応のFCM分析。右の写真はグラフの赤枠内から回収したベシクルの蛍光顕微鏡画像。

(4) 総括

上述のとおり、本研究では、(i) ベシクルバイオリアクターの作製、(ii) ベシクルバイオリアクターを利用した反応、および (iii) 分析評価・生成物回収、に関連する技術について検討した。その結果として、ベシクルバイオリアクターを生化学反応素子として利用するための一連のプロセス技術（作製、利用、評価、生成物取得）の基礎を構築できた。ベシクルを構成する脂質二分子膜には、タンパク質合成反応における遺伝子発現およびフォ

ールディング効率の向上や、ポリペプチド合成時の反応選択性の付与などの機能があることが近年報告され始めている。従って、通常の試験管内では合成が困難なタンパク質であっても、脂質二分子膜の存在下すなわちベシクルバイオリアクター内で反応を行うことで効率よく合成できると期待される。本研究により、効率的タンパク質合成システムの実現に向けた有意義な技術的知見が蓄積できたと考えられる。

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7件）

- ① Takashi Kuroiwa, Hisato Kiuchi, Kazuki Noda, Isao Kobayashi, Mitsutoshi Nakajima, Kunihiko Uemura, Seigo Sato, Sukekuni Mukataka, Sosaku Ichikawa: Controlled preparation of giant vesicles from uniform water droplets obtained by microchannel emulsification with bilayer-forming lipids as emulsifiers. *Microfluid. Nanofluid.*, in press. [査読あり]
- ② Isao Kobayashi, Yoichi Murayama, Takashi Kuroiwa, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima: Production of monodisperse water-in-oil emulsions consisting of highly uniform droplets using asymmetric straight-through microchannel arrays. *Microfluid. Nanofluid.*, in press. [査読あり]
- ③ 市川創作, 黒岩崇: 高い物質内包効率とサイズ制御を実現するリポソームの新規作製法とその利用. *化学装置*, **51** (2), 10-13, 2009. [査読なし]
- ④ 黒岩崇, 市川創作: 物質内包ジャイアントベシクルの効率的作製とこれを利用したベシクル内マイクロバイオリアクションシステムの開発. *Membrane*, **33** (6), 294-299, 2008. [査読あり]
- ⑤ Shinji Sugiura, Takashi Kuroiwa, Tetsuro Kagota, Mitsutoshi Nakajima, Seigo Sato, Sukekuni Mukataka, Peter Walde, Sosaku Ichikawa: Novel method for obtaining homogeneous giant vesicles from a monodisperse water-in-oil emulsion prepared with a microfluidic device. *Langmuir*, **24** (9), 4581-4588, 2008. [査読あり]
- ⑥ 市川創作, 黒岩崇: 単分散エマルジョンを基材とした新規ベシクル調製法によるサイズ制御と内包率の向上.

Yakugaku Zasshi, **128** (5), 681-686, 2008.
[査読あり]

- ⑦ Takashi Kuroiwa, Mitsutoshi Nakajima, Seigo Sato, Sukekuni Mukataka, Sosaku Ichikawa: Preparation of giant vesicles larger than 30 μm that entrap a model hydrophilic substance using a size-controlled water-in-oil emulsion. *Membrane*, **32** (4), 229-233, 2007. [査読あり]

[学会発表] (計 11 件)

- ① 黒岩崇ら: 多相エマルションを基材とした脂質カプセル作製における水相組成の影響, 化学工学会第74年会, 横浜国立大学(横浜市), 2009年3月18-20日.
- ② Takashi Kuroiwa et al.: Efficient preparation of vesicles that encapsulate water-soluble ingredients: the lipid-coated ice droplet hydration method. The 14th World Congress of Food Science and Technology, Shanghai Everbright Convention & Exhibition Center (Shanghai, China), Oct. 20-23, 2008.
- ③ 黒岩崇ら: 多相エマルションからの液中乾燥法による高内包率脂質カプセルの調製, 化学工学会第40回秋季大会, 東北大学(仙台市), 2008年9月24-26日.
- ④ Takashi Kuroiwa et al.: A simultaneous enzymatic microreaction inside giant vesicles: the system construction and its reaction properties. 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science, University of Algarve (Faro, Portugal), Sep.7-10,2008.
- ⑤ 黒岩崇ら: 多相エマルションを利用した脂質カプセルへの親水性物質の高効率内包化, 日本食品工学会第9回年次大会, 東京海洋大学(品川区), 2008年8月5-6日.
- ⑥ Takashi Kuroiwa et al.: A novel preparation method of giant vesicles that are suitable to be utilized as microcompartments - the lipid-coated ice droplet hydration method. 11th Liposome Research Days Conference, Yokohama Symposia (Yokohama, Japan), Jul. 19-22, 2008.
- ⑦ 黒岩崇ら: 脂質被覆水滴水和法による酵素内包ジャイアントベシクルの作製とその反応特性評価, 日本膜学会第30年会, 東京理科大学(新宿区), 2008年5月15-16日.
- ⑧ Takashi Kuroiwa et al.: Improved encapsulation of water-soluble materials into giant vesicles using size-controlled water-in-oil emulsions. The 36th Annual Meeting of U S/Japan Cooperative Program in Natural Resources Food and Agriculture Panel, Epochal Tsukuba (Tsukuba, Japan), Oct. 22, 2007.

- ⑨ 黒岩崇ら: 均一径エマルションを利用したセルサイズベシクルへの生体高分子の内包化, 日本生物工学会平成19年度大会, 広島大学(東広島市), 2007年9月25-27日.
- ⑩ 黒岩崇ら: 均一径エマルションを利用した水溶性物質内包ジャイアントベシクルの粒径制御, 化学工学会第39回秋季大会, 北海道大学(札幌市), 2007年9月13-15日.
- ⑪ 黒岩崇ら: 単分散エマルションからのジャイアントベシクル調製プロセスにおける内包率の向上, 日本膜学会第29年会, 東京理科大学(新宿区), 2007年5月10-11日.

[図書] (計 1 件)

- ① Takashi Kuroiwa, et al.: Chapter 12, Preparation characteristics of giant vesicles with controlled size and high entrapment efficiency using monodisperse water-in-oil emulsions. *Emulsion Science and Technology*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 229-242, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

- ① 「ベシクルの製造方法、この製造方法によって得られるベシクルおよびベシクルを製造するためのW/O/Wエマルション」、(発明者)市川創作、黒岩崇、(権利者)筑波大学、特願2008-135009号, 2008年5月出願(国内)。

○取得状況 (計 1 件)

- ① 「ベシクルの製造方法、この製造方法によって得られるベシクル、ベシクルの製造に用いられる凍結粒子の製造方法」、(発明者)市川創作、黒岩崇、(権利者)筑波大学、特許第4009733号, 2007年9月特許取得(国内)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒岩 崇

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所・契約研究員

研究者番号: 60425551

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし