

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310074

研究課題名(和文) 酵素の安定性を向上させる固定化技術の開発と
マイクロリアクターへの応用研究課題名(英文) Development of Enzyme Immobilization technique to Improve Stability
and Its Application for Microreactor

研究代表者

宮崎 真佐也 (MIYAZAKI MASAYA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生産計測技術研究センター・主任研究員

研究者番号：70344231

研究成果の概要(和文)：本研究では、酵素とポリリジンなどカチオン性ポリマーの複合体を分子間架橋することによりマイクロチャネル表面に酵素を固定化する我々独自の技術を応用し、様々なポリエチレングリコール(PEG)化ポリマー等と酵素の複合体を形成させ架橋することにより、酵素の活性を損なわずに安定性を高める酵素固定化技術の開発を行うとともに、酵素反応マイクロ化学プロセスの構築に応用した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed novel cross-linking immobilization techniques by using cross-linking of complex of synthetic polymers and enzymes, based on our original immobilization method. By this method, we could immobilize enzymes onto the microchannel wall, with improved stability against denaturing conditions. We also applied this technique to develop the micro enzyme process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ・ナノ化学、酵素反応、マイクロリアクター、固定化触媒、安定化

1. 研究開始当初の背景

生体内では様々な生理活性物質が多段階の酵素反応によりオンデマンドで製造され、機能している。これを生体外で模倣できれば、究極の低環境負荷型プロセスを構築することができる。しかしながら、生体の酵素をそれぞれ単離し、これを混合して反応させても生体内のように効率よく目的物を作ることは困難である。このため多段階の酵素反応を効率よく行う技術の開発が望まれていた。マイクロ化学システムは次世代の反応デバイスとして期待されている反応装置であり、

内外で開発が進められている。マイクロ化学システムは微小な空間で反応を行うことから、生体内の反応場を模倣できる装置として酵素反応を始め様々な生化学反応がマイクロ化学システムを用いて行われている。酵素反応プロセスにマイクロ化学システムの適用を試みる研究は、我々を始め内外の多くの機関で行われている。特に、酵素を固定化したマイクロリアクターは他の触媒反応同様マイクロ化学システムの特長を生かせるため、近年開発が進められており、我々はこの酵素固定化技術およびそれを利用したマイ

クロプロセス技術について先駆的な研究を行ってきた。しかしながら、様々な酵素を固定化できるようになったとはいえ、安定性を向上させた固定化方法としての技術確立が完全にはできておらず、酵素固定化マイクロリアクターの汎用性を確立できていなかった。

2. 研究の目的

本研究提案は、我々の独創的な酵素固定化マイクロリアクター作製技術に立脚し、酵素を内包したハイドロゲルの凝集体を形成させる固定化法を用いて、より酵素を安定に固定化する技術を確立するとともに、実用的なマイクロ酵素反応プロセス創出に供与する事を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

まず、様々なポリエチレングリコール(PEG)化ポリリジン在设计・合成し、これを酵素固定化反応に応用した。架橋反応生成物の尿素などの変性剤やDMSO等有機溶媒など、様々な条件に対する酵素活性を測定した。続いて、プロテアーゼなどを用いた酵素固定化マイクロリアクターを直列に連結し、基質を流して連続反応を行うタンデムリアクターによる連続反応技術のモデル系の構築とともに、ターゲットであるプロスタグランジン合成系構築に必要な酵素の調製とその固定化に要する基盤技術の構築を行った。最終的に、PEG化ポリマーもしくはポリリジンとグルタルアルデヒド・パラホルムアルデヒドを用いた酵素架橋凝集法によりシクロオキシゲナーゼおよび各プロスタグランジン合成酵素を固定化したマイクロリアクターを作製し、これを連結してターゲットであるプロスタグランジン合成のためのタンデム反応技術の確立を行った。

4. 研究成果

(1)平成 20 年度

初年度は様々なポリエチレングリコール(PEG)化ポリリジン在设计・合成し、これを酵素固定化反応に応用した(下図)。

PEG-Substituted poly(Lys)



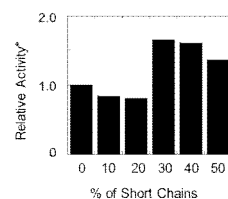
PEG化ポリリジンのみでは、立体障害のためか酵素との分子間架橋反応が進行しにくかったが、短鎖のポリリジンを添加することに

より、架橋することに成功した。(下図)

Precipitation



Enzymatic Conversion



次に、キモトリプシンをモデルとして、架橋反応生成物の様々な条件に対する酵素活性を測定したところ、尿素などの変性剤に対する安定性はポリリジンをPEG化することにより徐々に低下することが解った(下表)。

PEG-substitution level	1/25	1/50	1/100	No PEG	Solution
Activity in 6M urea ^a	48±0.8	50±0.4	52±1.8	55±1.9	27±0.8
Ratios ^a	87	91	95	100	49

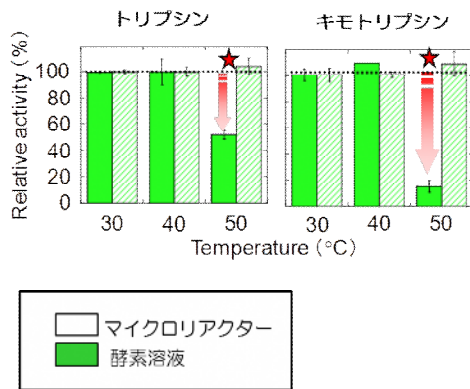
一方、DMSO等有機溶媒に対する安定性はポリリジンのPEG化により向上することが判明した。このことは尿素などによる水素結合切断を介する変性にはPEG化は逆効果だが、有機溶媒による疎水-親水性バランスの変化に対しては、PEG化はむしろ酵素分子を安定させる事が判明した。PEG化ポリリジンと短鎖のポリリジンの比率及び全体のポリリジン量を最適化することにより、PEG化していないものに比べて最大15%程度有機溶媒中での活性が向上した(下表)。

PEG-substitution level	1/10	1/25	1/50	1/100	No PEG
Activity in 50% DMSO ^a	19±0.2	28±0.3	26±0.7	26±0.5	25±0.6
Ratios ^a	76	112	104	104	100

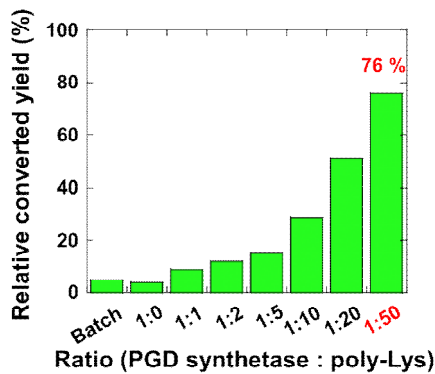
次にこのPEG化ポリリジンを用いた分子間架橋方法を酵素固定化マイクロリアクター作製に用いたところ、PEG化していないポリリジンを用いたとき同様にチャンネル表面に膜状の構造体を形成して酵素を固定化することに成功した。

(2)平成 21 年度

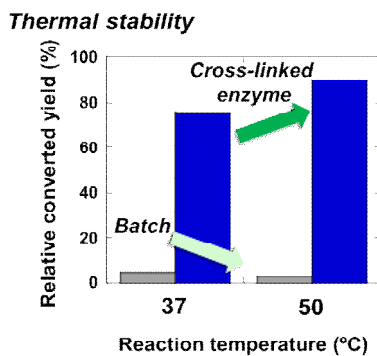
2年目は、プロテアーゼなどを用いたタンデムリアクターによる連続反応技術のモデル系の構築とともに、ターゲットであるプロスタグランジン合成系構築に必要な酵素の調製とその固定化に要する基盤技術の構築を行った。プロテアーゼ固定化マイクロリアクターを用いた高温でのタンデム加水分解処理により、加水分解が効率化されることを見いだした(次図)。



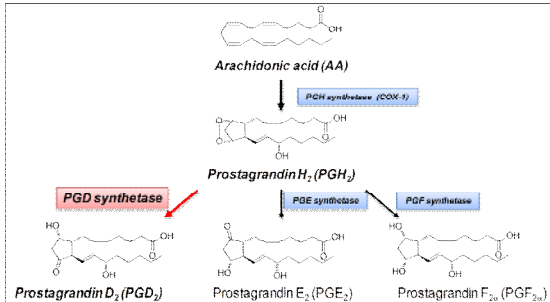
このタンデムマイクロリアクターと質量分析装置を組み合わせることで、タンパク質分子内のリン酸化部位の同定やジスルフィド結合パターンの解析など、タンパク質の翻訳後修飾を効率よく分析する技法を開発した。また、プロスタグランジン合成においては、酵素の発現に成功した。精製した酵素を用いてマイクロリアクターの作製を行った。プロスタグランジン合成酵素も、我々の開発した方法で架橋することができた (下図)。



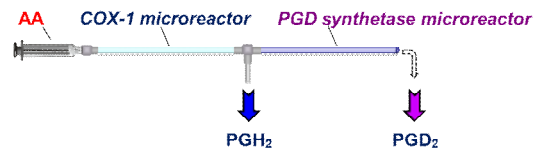
また、分子間架橋することにより、溶液中よりもはるかに熱安定性が向上することを確認し、高温でプロスタグランジン合成反応を行うことで反応収率が飛躍的に向上できることを見いだした (下図)。



最終年度は、酵素固定化マイクロリアクター技術を用いて、ターゲットであるプロスタグランジン合成のためのタンデム反応技術の確立を行った。プロスタグランジンの生合成は次図のように多段階の酵素反応で行われる。



そこで、PEG 化ポリマーもしくはポリリジンとグルタルアルデヒド・パラホルムアルデヒドを用いた酵素架橋凝集法により、一段目の反応を触媒する酵素であるシクロオキシゲナーゼと、2 段階目の反応に用いるプロスタグランジン合成酵素を固定化したマイクロリアクターを作製した (下図)。



各酵素固定化マイクロリアクターは、架橋反応による失活は見られず、酵素活性を保持していた。また、溶液状態の酵素よりも優れた熱安定性を示し、室温での長期間の連続使用が可能であった。これらのマイクロリアクターをタンデムに連結してアラキドン酸の溶液を流通させ、反応を行ったところ、目的物である各種プロスタグランジンの生成を確認した。溶液状態の酵素を用いることによりマクロスケールで反応を行った場合は、2 段階反応が困難であったが、このマイクロリアクターを用いた反応条件のさらなる最適化を進めることにより、目的物を純度よく生成させることに成功した。

以上の研究より、酵素とポリリジンなどカチオン性ポリマーの複合体を分子間架橋することによりマイクロチャンネル表面に酵素を固定化する我々独自の技術を応用し、様々なポリマー等と酵素の複合体を形成させ架橋することにより、酵素の活性を損なわずに安定性を高める酵素固定化技術の開発を行うとともに、タンデムマイクロリアクター技術を確認してタンパク質配列解析やプロスタグランジン合成酵素反応マイクロ化学プロ

セスの構築に応用した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① 山口浩、宮崎真佐也、前田英明、Proteolysis approach without chemical modification for a simple and rapid analysis of disulfide bonds using thermostable protease-immobilized microreactors、Proteomics、10 巻、2010、2942-2949
- ② 山口浩、宮崎真佐也、河津博文、前田英明、Multidigestion in continuous flow tandem protease-immobilized microreactors for proteomic analysis、Analytical Biochemistry、407 巻、2010、12-18
- ③ 宮崎真佐也、前田英明、マイクロ空間を用いる有機合成反応、化学と教育、57 巻、2009、364-367
- ④ 山口浩、宮崎真佐也ほか、Rapid and efficient proteolysis for proteomic analysis by protease-immobilized microreactor、Electrophoresis、30 巻、2009、3257-3264
- ⑤ 宮崎真佐也ほか、Polymer Chemistry in Microfluidic Reactor、Micro and Nanosystem、1 巻、2009、193-204
- ⑥ 宮崎真佐也ほか、Enzymatic processing in microfluidic reactors、Biotechnology and Genetic Engineering Reviews、25 巻、2008、405-428
- ⑦ 宮崎真佐也、前田英明、Biomolecular Synthesis in Microfluid、Encyclopedia of Micro-and Nanofluidics、2008、76-84

[学会発表] (計 22 件)

- ① 宮崎真佐也ほか、Simple and rapid proteolysis by protease-immobilized microfluidic reactor for proteomic analysis、2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010)、2010 年 12 月、Honolulu, HI, U.S.A.
- ② 宮崎真佐也ほか、A simple and rapid analysis of disulfide bonds in proteins using thermostable protease-immobilized microfluidic reactors integrated with MS、The 5th International Peptide Symposium、2010 年 12 月、京都市
- ③ 宮崎真佐也、マイクロ流体デバイスを用いたプロテオミクス解析、九州大学先端物質化学研究所・JST 先端計測合同シンポジウム、2010 年 10 月、福岡市
- ④ 宮崎真佐也ほか、Enzymatic Conversion

in Enzyme-Immobilized Microchannel Reactor with Cross-Linked Enzyme Membrane、11th International Conference on Microreaction Technology (IMRET11)、2010 年 3 月、京都市

- ⑤ 宮崎真佐也、マイクロ空間化学のバイオテクノロジーへの応用、第 4 回ナノバイオデバイスワークショップ、2010 年 1 月、つくば市
- ⑥ 宮崎真佐也ほか、Rapid Post-Translational Modification Analysis by Enzyme-Immobilized Microreactor、International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2009)、2009 年 11 月、金沢市
- ⑦ 宮崎真佐也ほか、Cross-linked Aggregated Hydrogel Membrane Formation as Immobilization Method of Enzyme Onto Microchannel Surface、The IUMRS International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2008)、2008 年 12 月、名古屋市
- ⑧ 宮崎真佐也ほか、Protease-immobilized microreactor for rapid protein digestion、17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008)、2008 年 8 月、札幌市

[図書] (計 1 件)

- ① 山口浩、宮崎真佐也、前田英明、Limited proteolysis in proteomics using protease-immobilized microreactors、Method in Molecular Biology Series-Functional Genomics、2nd ed.、(Kaufmann, M. and Klinger, C. eds)、Humana Press、受理済

[その他]

ホームページ

<http://unit.aist.go.jp/msrc/ci/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 真佐也 (MIYAZAKI MASAYA)

産業技術総合研究所・生産計測技術研究センター・主任研究員

研究者番号：7 0 3 4 4 2 3 1