

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760642

研究課題名(和文) 気液流動特性を活性制御因子とするリポソーム内封入酸化酵素反応システムの構築

研究課題名(英文) Development of enzymatic oxidation system in liposomes using gas-liquid flow for controlling the enzyme activity

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(和文): 脂質二分子膜小胞(リポソーム)の低分子量物質に対する膜透過性が、高温・液体せん断場において増大することを明らかにした。グルコース酸化酵素を内包させ、副生過酸化水素を分解する酵素カタラーゼを固定化させたリポソームを調製して、外部循環式エアリフト型気泡塔内の気液流動が誘起する液体せん断場においてグルコースに対するリポソーム膜透過性を増大させ、高活性で安定な酸化反応触媒システムを構築した。

研究成果の概要(英文): The permeabilization of phospholipid bilayer membrane of liposomes to a low molecular mass compound was induced by the liquid shear stress at high temperatures. The catalase-bound liposome encapsulating glucose oxidase was prepared and its permeabilization with respect to glucose and oxygen was induced by the liquid shear stress generated by the gas-liquid flow in an external loop airlift bubble column. The liposomal enzyme system prepared functioned as a reactive and stable catalyst for the oxidation of glucose with decomposition of hydrogen peroxide produced in the bubble column.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物反応工学

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，生体機能利用，ナノバイオ，化学工学

1. 研究開始当初の背景

酸化酵素反応は、医薬・食品工業において有用な光学活性化合物などを常温常圧下で選択的に与える。安定な酸化酵素反応系を構築するためには、酵素の多量体構造を維持して補酵素との結合を促進する必要がある。一方、脂質二分子膜小胞(リポソーム)は、酵

素と補酵素を安定に可溶化することができない微小水相と酵素の高次構造を安定化する脂質膜から形成される。脂質膜は基質分子に対して透過抵抗を示すため、リポソーム内封入酵素の反応性が遊離酵素に比べて低下する。脂質膜透過性の制御法として、膜組成の改変や膜タンパク質の再構成が報告されて

いるが、生物化学的修飾を施したリポソームが安定に存在する条件は限定され、大量調製が困難などの問題がある。気液流動に伴い誘起されるせん断力によりリポソーム膜の微細構造を変化させることができれば、一定膜組成のリポソームを用いて透過性の可逆的制御が可能になると考えられる。液体せん断場におけるリポソームの安定性と膜透過性を定量的に明らかにすることにより、バイオリアクターにおいて安定かつ高活性なリポソーム系酸化酵素反応システムの開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、外部循環式エアリフト型気泡塔バイオリアクター内の気液流動場においてリポソームの膜透過性が増大する現象に基づき、リポソーム系酸化酵素反応を制御する新規な酵素反応プロセスを構築することを目的とする。まず、静止液系において、リポソーム内封入酸化酵素の安定性と反応性を明らかにする。モデル酵素としてアミノ酸酸化酵素、グルコース酸化酵素及び脱水素酵素を用いる。次いで、コーン・プレート型粘度計を用いて定義された液体せん断場を形成させ、せん断場における脂質膜の透過性変化を明らかにする。さらに、酸化酵素封入リポソームを懸濁させた気泡塔において、液体せん断力を活性制御因子とする酸化酵素反応操作を行う。

3. 研究の方法

(1)せん断場における脂質膜透過性の測定 不飽和リン脂質 POPC

(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) の乾燥膜を、蛍光色素 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) 0.1 M を溶解した Tris 緩衝液 (pH7.4) で水和・凍結融解 (7 回) 後、押出し法により CF 封入リポソーム (CFL) を調製した。遊離色素はゲルろ過クロマトグラフィー (担体: Sepharose 4B) で分離除去した。コーン・プレート型粘度計 (Brookfield, DV-II + Pro, スピンドル CPE-40) に CFL 懸濁液 ([POPC] = 1.0 mM) 0.5 mL を仕込み、200 rpm まで回転数を段階的に増加させた。60 min 後の CFL 懸濁液を粘度計から回収して、粒子径分布と内包色素の液本体への透過量を蛍光強度 I ($\lambda_{ex} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 517 \text{ nm}$) に基づき測定した。比較のため、試験管内の静止液系において CFL からの CF の透過量を追跡した。CFL からの CF 漏出率 R_{CF} は、 $(I - I_0)/(I_m - I_0)$ (I_m : CFL 溶解時の蛍光強度, I_0 : 初期蛍光強度) から算出した。また、CF の非定常物質収支を解析して得られる $\ln(I_m \cdot t) = \ln(I_m \cdot I_0) - P_{CF} a t$ (P_{CF} : CF の膜透過係数, a : リポソーム比表面積) に基づき、 $\ln(I_m \cdot t)$ vs. t の直線

プロットの傾きから P_{CF} を得た。

(2) 酸化酵素複合化リポソームの調製

① リポソーム内封入酸化酵素の調製

グルコースオキシダーゼ(GO), D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) またはホルムアルデヒド脱水素酵素 (FaDH) を可溶化した Tris-HCl 緩衝液で乾燥 POPC 膜を水和・凍結融解後、押出し法によりリポソームを調製した。リポソーム内に未封入の酸化酵素分子はゲル濾過により分離除去した。

② 酸化酵素を内包したカタラーゼ複合化リポソーム(CAB-GOL)の調製

POPC, カルボキシル基をもつ脂質 NGPE 15 mol%, Cholesterol 30 mol% からなるリポソームを、1.3 g/L GO を溶解した MES 緩衝液 (pH 5.5) を用いて押出し法により調製した。GO 封入リポソーム膜中の NGPE 末端のカルボキシル基を活性化後、1.0 g/L カタラーゼ (CA) 溶液を混合、25 °C で 3 h 静置して共有結合させ、CAB-GOL を得た。各遊離酵素はゲル濾過により分離除去した。

(3) 酸化酵素活性の測定

GO と DAAO の各触媒活性は、10 mM グルコースと 10 mM D-アミノ酸をそれぞれ基質として Peroxidase 触媒下、生成 H_2O_2 による σ -Dianisidine の酸化速度に基づき決定した。FaDH 活性は、1.5 mM NAD^+ 共存下、50 mM ホルムアルデヒドの酸化による $NADH$ の生成速度を A_{340} で追跡して決定した。CA 活性は、CA による 10 mM H_2O_2 の初期分解過程を追跡して決定した。全ての活性測定は 25 °C で行った。

(4) リポソームの粒子径分布の測定

調製した各リポソームの平均粒子径 D_p [nm], 粒子径分布及び多分散指数 PI は動的光散乱法により測定した。

(5) 気泡塔における酸化酵素反応操作

外部循環式エアリフト型気泡塔のライザー内径は 8 mm, ダウンカマー内径は 4.8 mm である。エアリフトに CAB-GOL 懸濁液 ([Lipid] = 0.5 mM) 8.0 mL を仕込んだ。40 °C において初濃度 10 mM のグルコースを添加後のグルコースと H_2O_2 各濃度を酵素法で追跡した。通気ガスとして、加湿した 79% N_2 +21% O_2 を用いた。ガス空塔速度 U_G は 1.0-3.0 cm/s とした。比較のため、同一濃度の CAB-GOL 懸濁液(2.0 mL)を用いた静止液系で酸化反応を行った。気泡塔に懸濁させたリポソーム内封入 FaDH の安定性は、 CO_2 ガスを $U_G = 2.0 \text{ cm/s}$ で通気して検討した。

4. 研究成果

(1) 脂質膜透過性に及ぼすせん断場の影響
① せん断場におけるリポソームの安定性

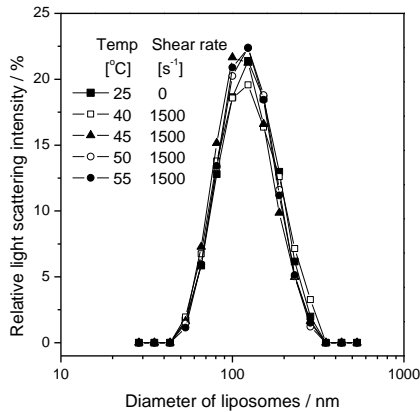


Fig. 1 コーン・プレート型粘度計内の液体せん断場と温度が CFL の粒子径分布に及ぼす影響 (せん断場負荷時間: 1 h)

コーン・プレート型粘度計内のせん断場に種々の粒子径の CFL を懸濁して、リポソーム膜の物理的安定性を粒子径・粒子径分布に基づき調べた。Fig. 1 に 25 °C において、 $D_p = 117.1 \text{ nm}$, $PI = 0.104$ のリポソーム懸濁液を種々の温度に保たれたせん断速度 1500 s^{-1} の粘度計内で 60 min 処理したときの粒子径分布を示す。Fig. 1 より、粘度計内のせん断場により、55 °C までの各温度で、顕著な粒子径分布の変化は認められない。直径 200 nm 以下のリポソームは同様にせん断場で安定であった。一方、平均径が 400 nm 程度のリポソームを 25 °C において 60 min, 1500 s^{-1} の粘度計処理を行ったところ、粒子径分布が変化した (データ省略)。これは、粒子径が比較的大きいリポソームはせん断場で崩壊・融合することを示唆している。

② せん断場における脂質膜透過性

$D_p = 171 \text{ nm}$ の CFL を用いて脂質膜透過性に及ぼすせん断場の影響を検討した。CFL を 25~55 °C において粘度計内に懸濁して、 1500 s^{-1} で 60 min せん断力を負荷したときの液本体への CF 漏出率 R_{CF} (CF released) を Fig. 2 に示す。比較のため、試験管内静止液において得られた結果を示す。Fig. 2 において、静止液系では、45 °C までは R_{CF} 値は 10% 以下である。一方、粘度計内せん断場では、温度の増大とともに R_{CF} 値が増大して、45 °C では $R_{CF} = 30\%$ となった。55 °C の R_{CF} 値は、静止液系 20.9%, せん断場 70.8% であった。せん断場で得られた R_{CF} 値は各温度で静止液系に比べて大きく、その差異は高温域において顕著である。これらの結果より、せん断場により脂質膜透過性が増大することがわかる。60 min の R_{CF} 値を用いて、40 °C のせん断場における CF の膜透過係数 P_{CF} を

算出したところ、 $P_{CF} = 1.5 \times 10^{-10} \text{ cm/s}$ であった。以上より、CFL 懸濁液に高温条件とせん断力を複合的に負荷することにより、脂質膜透過性が顕著に増大することがわかった。

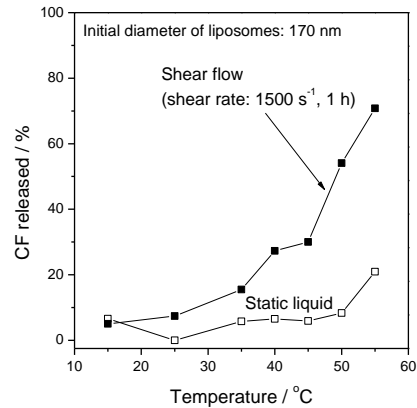


Fig. 2 静止液系及びせん断場における CFL からの CF 漏出量の温度依存性 (各温度で 60 min 処理)

(2) 静止液系における酸化酵素封入リポソームの特性

① アミノ酸酸化酵素(DAAO)封入リポソーム

リポソーム内封入 DAAO の 4 °C における保存安定性及び見かけの基質選択性を検討した。リポソーム内 DAAO は、保存 3 d で D-alanine を基質としたときの残存活性が 50% 程度となり、不安定であった。遊離 DAAO も同程度不安定であった (データ省略)。リポソーム内封入 DAAO のアミノ酸酸化活性を D-alanine, D-methionine 及び D-serine を基質として検討した。リポソーム膜を界面活性剤 Triton X-100 で溶解したときの DAAO 活性を 100% としたときのリポソーム内封入 DAAO の活性 (活性利用率 E) を Table 1 に示す。 E 値は 18-21% である。これは、各アミノ酸の脂質膜透過抵抗に起因している。基質の分子種により E 値が異なることから、基質の膜透過性に基づき DAAO の見かけの基質選択性を制御できることが示唆される。リポソーム内封入 DAAO を反応操作へ適用するためには、酵素活性の安定性を向上させる必要がある。DAAO の失活の要因として、酵素 2 量体構造の解離が考えられる。多量体形成には補酵素 FAD の安定な結合が重要と考えられる。DAAO を脂質膜に共有結合させるとともに、FAD を過剰量添加することによりリポソーム系において DAAO の安定化が期待できる。

② リポソーム内封入 FaDH の特性

リポソームに FaDH と共に補酵素 NADH

Table 1 リポソーム内封入 DAAO の活性

Substrate	Activity / $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$		$E / \%$
	Liposomal system	Free system	
Ala	0.58	3.3	18
Met	1.5	7.2	21
Ser	n.d.	0.047	-

n.d.: not detected.

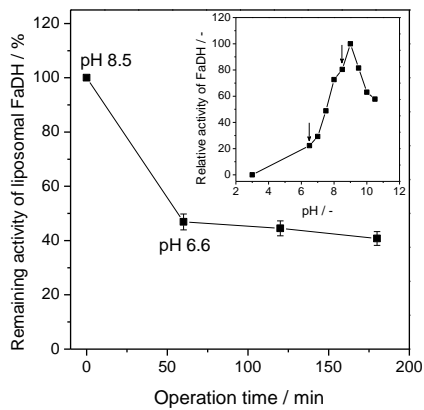


Fig. 3 エアリフト型気泡塔に懸濁させたリポソーム内封入ホルムアルデヒド脱水素酵素 (FaDH) の安定性 (Inset: 遊離 FaDH 活性の pH 依存性)

を封入することにより、遊離系に比べて酵素活性が著しく安定化された (データ省略)。CO₂を通気したエアリフト型気泡塔内の気液流動場にリポソーム内封入 FaDH を懸濁したところ、CO₂通気に伴う pH の低下により初期に活性の低下が見られるが (Fig. 3), 懸濁時間 1-3 h では酵素活性が安定に維持されている。これは、気液界面と FaDH 分子間の相互作用が脂質膜により抑制されるためである。遊離 FaDH を気泡塔に溶解すると、酵

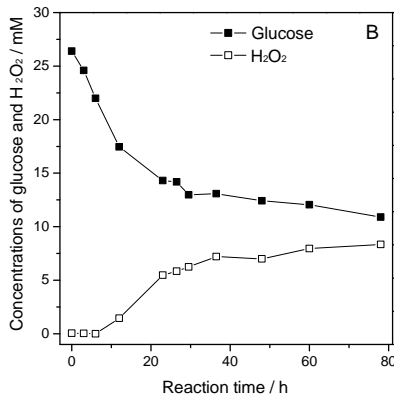
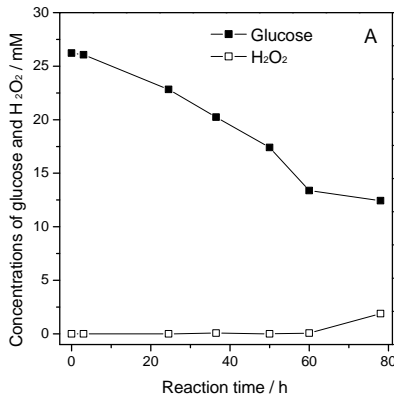


Fig. 4 試験管内静止液系における CAB-GOL (A, [lipid] = 0.2 mM) と遊離 GO/CA (B) によるグルコース酸化反応

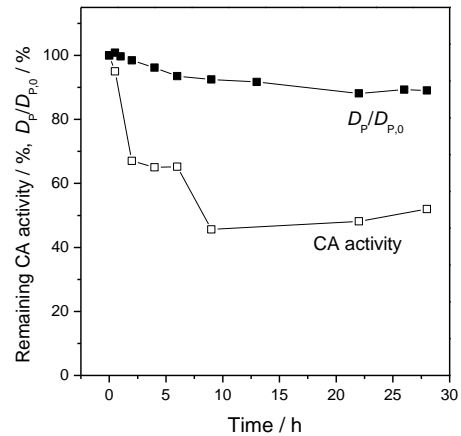


Fig. 5 エアリフト型気泡塔における CAB-GOL 粒子径変化 (初期粒子径 $D_{p,0}$ = 169.0 nm) と残存カタラーゼ (CA) 活性の変化 ($U_G = 1.0$ cm/s, 40 °C)

素が気泡を安定化して泡沫層が著しく発達した。

③ グルコース酸化酵素を内包したカタラーゼ複合化リポソーム (CAB-GOL)

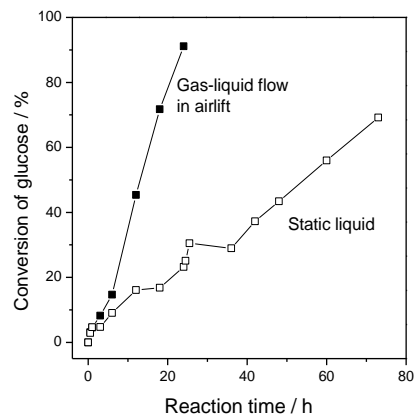
Fig. 4A に静止液系における CAB-GOL 触媒下グルコース酸化反応の経時変化を示す。60 h の反応で H₂O₂ の蓄積はなく、一定の酸化速度が維持されている。これは、グルコースの脂質膜透過抵抗により酸化速度が低下して、生成 H₂O₂ による CA 活性の阻害が抑制されたためである。本反応では CA による H₂O₂ の分解により生成した O₂ が酸化に再利用される。一方、遊離 GO/CA 系では、反応初期に H₂O₂ が蓄積して酸化速度が著しく低下している (Fig. 4B)。

(3) エアリフト型気泡塔によるリポソーム系酸化反応操作

① リポソームに複合化させた CA の安定性に及ぼす気液流動の影響

Fig. 6 CAB-GOL のグルコース酸化活性に及ぼすエアリフト内気液流動の影響

Fig. 5 に CAB-GOL の平均粒子径と CA 活性に及ぼす気液流動の影響を示す。粒子径は僅か



に低下しているが著しい変化は認められない。残存 CA 活性は初期に大きく低下しているが、26 h で約 50%の活性が認められる。リポソームから GO が液本体に漏出する可能性があるが、漏出した低濃度の GO は気液二相流で不安定であり、酸化反応への寄与は小さいと推定される。

② リポソーム系酸化酵素の活性に及ぼす気液流動の影響

Fig. 6 にエアリフト型気泡塔内 ($U_G = 3.0$ cm/s) 及び試験管内の静止液系における CAB-GOL 触媒下のグルコース酸化反応経過を示す。気液流動場では、静止液系に比べてグルコース酸化速度が著しく大きい。気液流動場でグルコース酸化速度が増大した要因として、気液二相流により脂質膜にグルコース / O_2 透過チャンネルが形成され、これら基質分子の膜透過が促進されたことが考えられる。

以上の結果は、気泡塔バイオリクター内の CAB-GOL 活性の制御因子として気液流動が有効であることを示している。

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 6 件)

- ① M. Yoshimoto, T. Yamashita and S. Kinoshita, Thermal stabilization of formaldehyde dehydrogenase with nicotinamide adenine dinucleotide, *Enzyme Microb. Technol.*, in press. (2011) 査読有
- ② M. Yoshimoto, T. Yamashita and T. Yamashiro, Stability and reactivity of liposome-encapsulated formate dehydrogenase and cofactor system in carbon dioxide gas-liquid flow. *Biotechnol. Prog.*, **26**, 1047-1053 (2010). 査読有
- ③ M. Yoshimoto, C. Iida, A. Kariya, N. Takaki and M. Nakayama, A biosensor composed of glucose oxidase-containing liposomes and MnO_2 -based layered nanocomposite. *Electroanalysis*, **22**, 653-659 (2010). 査読有
- ④ M. Yoshimoto, N. Takaki and M. Yamasaki, Catalase-conjugated liposomes encapsulating glucose oxidase for controlled oxidation of glucose with decomposition of hydrogen peroxide produced. *Coll. Sur. B*, **79**, 403-408 (2010). 査読有
- ⑤ M. Yoshimoto, R. Yamasaki, M. Nakao

and T. Yamashita, Stabilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through liposome-assisted complexation with cofactors. *Enzyme Microb. Technol.*, **46**, 588-593 (2010). 査読有

- ⑥ M. Yoshimoto, T. Natsume, N. Matsumoto and H. Sakamoto, Gas-liquid flow-induced permeabilization of phospholipid bilayer membranes for regulating catalytic performance of liposome-encapsulated bovine liver catalase. *Coll. Surf. A*, **360**, 63-68 (2010). 査読有

[学会発表] (計 21 件)

- ① 吉本 誠, 山下孝幸, 山城卓哉, リポソーム内水相における高い熱安定性を示す蟻酸脱水素酵素-補酵素複合体の形成, 化学工学 3 支部合同徳島大会, 2010.10.23, 徳島, 徳島大学.
- ② 山崎 未来, 高木規行, 吉本 誠, カタラーゼ複合化リポソーム膜を利用するグルコースオキシダーゼ反応速度の制御, 化学工学会第 42 回秋季大会, 2010.9.6, 京都, 同志社大学.
- ③ 吉本 誠, 夏目友誉, 気液二相流中における脂質膜の透過性変化に基づくリポソーム系酵素反応速度の制御, 分離技術会年会 2010, 2010.6.3, 東京, 明治大学.
- ④ 吉本 誠, 山下孝幸, 山城卓哉, エアリフトに懸濁させた蟻酸脱水素酵素封入リポソームの活性に及ぼす炭酸ガス通気の影響, 化学工学会第 75 年会, 2010.3.19, 鹿児島, 鹿児島大学.
- ⑤ M. Yoshimoto, N. Takaki, Preparation and catalytic properties of glucose oxidase encapsulated in catalase-conjugated liposomes for effective oxidation of glucose. *Asia Pacific Biochemical Engineering Conference*, 2009.11.25, 神戸 神戸国際会議場

[図書] (計 1 件)

- ① M. Yoshimoto, Stabilization of enzymes through encapsulation in liposomes (Chapter 2). *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, (S. D. Minter ed.), vol. 679, 9-18 (2011).

[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・大学院医学系研究科・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