

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：33910
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22560771
 研究課題名（和文）酵素の精密制御固定化技術の確立と次世代高機能化バイオリアクターの構築
 研究課題名（英文）Development of Site-Directed Immobilization Method to Construct High-Efficient Bioreactors
 研究代表者
 中西 一弘（NAKANISHI KAZUHIRO）
 中部大学・応用生物学部・教授
 研究者番号：90026584

研究成果の概要（和文）：本研究では、酵素・タンパク質を多孔性担体に固定化する際に問題となる固体表面との接触あるいは化学結合に際して生じる酵素・タンパク質の変性・失活と活性発現に不利な配向を防ぐ方法の開発を目的として研究を行った。具体的には、酵素をシリカやポリスチレンなどの固体表面に特異的親和性を有するペプチドタグを連結することにより、酵素を固体表面にほぼ不可逆的に固定化できるだけでなく、付着状態の構造と配向の制御が可能であることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, a method to immobilize enzymes/proteins on the solid surface without suffering from denaturation that might occur upon coming in contact with the solid surface was investigated. Conjugating peptide tags that show a high affinity to silica and polystyrene surfaces, to enzymes enabled a strong, nearly irreversible immobilization without appreciable loss of activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 生物工学

科研費の分科・細目： 工学・プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード： 酵素、配向制御固定化、親和性ペプチドタグ、シリカ、ポリスチレン

1. 研究開始当初の背景

(1) 多孔性粒子などを担体とする固定化酵素を触媒素子として用いるバイオリアクターは、約 30 年以上前からバイオ生産物生産プロセスにおける重要な基盤技術であった。研究開始当初において、構造や安定性の異なる

多種多様な有用酵素を十分に利用するためには、付着状態での酵素分子の構造・配向制御が可能な汎用的固定化法（精密制御固定化法）の開発が必要不可欠であるという認識は、当該分野に携わる研究者に共有されていた

が、これらの事柄に着目した研究はほとんどみられなかった。

(2) 本研究で取組む精密制御固定化は、固定化酵素の調製においてだけではなく、プロテオーム解析や細胞培養などの生命科学分野においても重要な基盤技術である。そのため、近年、国内外の多数の研究者により、精力的に研究が行われるようになっていた。研究開始当初において、既に多くの精密制御固定化法が提案されていた (Nakanishi *et al.*, *Current Proteomics*, **5**, 161-175 (2008)) が、酵素反応を目的とした研究は少なかった。

(3) 申請代表者らが提案した精密制御固定化法では、実験及び理論に基づいてスクリーニングされた固体表面親和性ペプチドをタンパク質・酵素に化学的及び遺伝子工学的に連結するが、このような方法を、酵素の固定化と反応に着目して研究されていた例はみられなかった。

2. 研究の目的

(1) 既往の固定化方法における問題点は、酵素が担体表面との物理的あるいは化学的相互作用により構造変化を受ける (図 1 (A)) ことにより、固定化酵素としての活性発現が難しい場合が少なくないことである。本研究では、この問題点を解決するために、固体表面に特異的親和性を示すペプチドを酵素の末端に連結する (図 1 (B)) ことにより、酵素分子の構造・配向を精密制御可能な固定化方法の確立を目指して、必要な基礎的知見を得ることを目的とした。

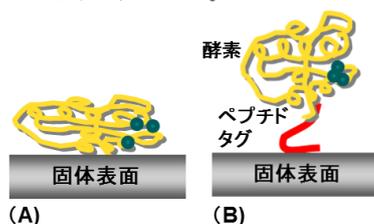


図 1 タンパク質は固体表面に付着することにより構造変化を受ける (A) が、適切な固体表面親和性ペプチドタグを連結する (B) ことにより構造制御が可能となる。

(2) 上記の目標を達成するために、本研究で取り上げる構造制御固定化法の対象となる酵素の調製と固定化条件及び反応条件を検討した。さらに、固定化酵素の残存活性及び安定性に着目して研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) シリカ表面親和性ペプチドタグのスクリーニング： 先ず、大腸菌鞭毛ライブラリーシステム (Invitrogen 社製) を用いて、石英ガラスプレート (SiO_2) に対して親和性を示すペプチド群をスクリーニングした。続いて、スクリーニングされたペプチド群を遺伝子工学的に GST (glutathione S-transferase) の C 末端に連結した。調製した親和性ペプチド連結 GST の、ナノシリカ粒子担体に対する付着特性及び付着状態での酵素の残存活性を調べ、最適なペプチドをスクリーニングした。また、確認のために、ペプチド連結タンパク質の表面に対する付着形態を分子力学計算 (Force field; Amber94) (Imamura *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 7 (2007)) により推定した。

(2) 固体表面親和性ペプチドタグ連結酵素の調製と固定化及び反応実験： 本研究でスクリーニングされたシリカ表面親和性ペプチドタグ GlS16 及び以前にスクリーニングされたポリスチレン親和性ペプチドタグ (Kumada, Nakanishi *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 401(2006)) をグルタルアルデヒドを用いて、酵素タンパク質表面のリジン残基に連結した。シリカ表面親和性ペプチドタグ GlS16 連結酵素の調製においては、緩衝液中でペプチドタグと市販多孔性シリカ粒子 Fractosil 500 を接触させ、固定化した。ペプチドタグをグルタルアルデヒドを介して化学的に β -glucosidase に結合した固定化酵素を調製し、合成基質の *p*-nitrophenyl- β -glucoside (PNPG) を用いて繰り返し反応を行った。 β -glucosidase は以前に確立した方法 (Song, Nakanishi *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 281-287 (2010)) を用いて精製した。

一方、*Bacillus circulans* 由来の分子量が約 18 万 β -galactosidase の大腸菌内での大量発現と精製条件の検討を行った。*B. circulans* β -galactosidase のような分子量 18 万の巨大タンパク質の固定化には、遺伝子工学的に N 末端のみにタグを連結する方法では、十分に強固な結合力が得られないことが考えられたので、上記の β -glucosidase の場合と同様に、化学的方法により精製酵素に親水性ポリスチレン特異的ペプチドを結合した。ただし、以前に我々が見出した PS19 tag (RAFIASRRIRKP) (Kumada, Nakanishi *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 401(2006)) の末端には、グルタルアルデヒドと反応するリジン残基が存在しないので、末端にリジン残基が配置した変異ペプチド (KRAFIASRRIRRP;

KPS19R10 tag) を結合した。まず、KPS19R10 tag をグルタルアルデヒドで処理後に酵素に結合させた。

KPS19R10 tag 連結 β -galactosidase の濃度を変えて細胞培養用の親水性 96 穴プレートの底面に固定化した。固定化後、ウェルに基質 (0.24% PNPG) を添加し、恒温槽内の水面にプレートを設置し、37°C で反応を行った。一定時間後に、プレートのウェルから反応液を回収し Na_2CO_3 溶液に加え、吸光度を 420 nm で測定した。

BLAST を用いたドメイン検索の結果、*B. circulans* β -galactosidase の C 末端近傍に糖鎖に高い親和性を示す Discoidin domain (DS domain) が存在することが明らかとなった。大腸菌内での DS domain の大量調製も行った。

4. 研究成果

(1) 酵素の精密制御固定化に適したシリカ表面親和性ペプチド群を、その C 末端に遺伝子工学的に連結した GST の多孔性シリカ粒子への付着特性について実験的検討を加えた。すなわち、*E. coli* 鞭毛ランダムペプチドライブラーシステムを用いてスクリーニングされたシリカ表面に特異的親和性を示すペプチド (GlsX)、が GST の C 末端側が入るように GlsX 配列をコードする DNA 断片をライゲーションし、各種ベクター pGEX-GlsX を構築した。構築したベクターを用いて *E. coli* BL21 (DE3) 株を形質転換し、タンパク質を発現し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

精製した GlsX 連結酵素を用いて、粒径 7nm の fumed silica と粒径 70nm の silicon dioxide への付着挙動を調べた。その結果、塩基性アミノ酸を 4 残基含む 12 アミノ酸残基からなる Gls16 連結 GST が直角平行型の不可逆的吸着平衡等温線を示すことが示された。一方、親和性ペプチドを連結していない野生型 GST は、吸着量と吸着力ともに低い値を示した。親和性ペプチドの吸着特性の違いについて基礎的な知見を得るため、分子動力学計算により吸着形態と吸着エネルギーを計算する方法を確立した。シリカ表面は、H-O-分子を O を上向きに 0.32nm 間隔で 271 分子並べることによって構築し、モデルガラス表面の 3 nm 上方にペプチド分子を置いた状態で分子シミュレーションを開始し、ペプチド分子を吸着させた。

(2) 本研究で見出した SiO_2 表面親和性ペプチドを、*A. niger* 由来の β -glucosidase に化学結合

法により連結した。すなわち、まず、親和性ペプチドを 25% グルタルアルデヒド溶液中で 10 分間処理後にグルタルアルデヒドによりラベルされたペプチドを 10% DMF/90% ether 混合溶液中で沈殿させた。このグルタルアルデヒドでラベルされたペプチドと酵素をインキュベーションすることによりペプチドを酵素に結合した。余剰のペプチドを除去した後に、酵素を担体に固定化した。複数の SiO_2 親和性ペプチドと多孔性シリカゲルの種類と酵素の固定化量の関係について調べた。その結果、親和性ペプチドとして GLS16 を用い、多孔性シリカ粒子 Fractosil 500 に固定化した場合に、 β -glucosidase の固定化量が最大となった。この結果は、親和性ペプチドを連結していない酵素を用いた結果の 2.5 倍以上であった。GLS-16 をグルタルアルデヒドを介して化学的に β -glucosidase に結合した固定化酵素を用いると、図 2 に示すように、少なくとも 5 回以上の繰り返し反応後も活性の低下はみられなかった。一方、ペプチドタグを連結していない酵素を用いた場合は、3 回目で活性が半減した (図 2 中の破線)。これらの結果は、親和性ペプチドタグの有用性を示唆するものである。

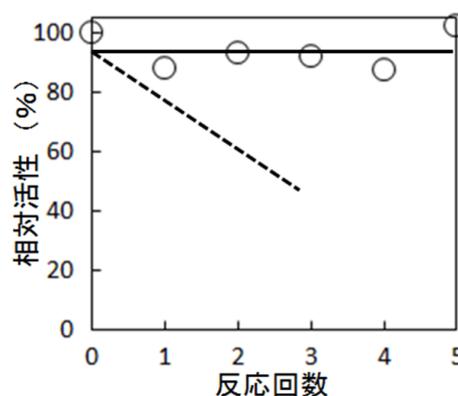


図 2 ペプチドタグ連結固定化酵素 (○) とペプチドタグを連結していない酵素を用いた繰り返し反応。最初の活性を 100% とした場合の相対活性と反応回数の関係を示す。

(3) (2) で示した方法と同様の方法によりグルタルアルデヒドによりラベルされた KPS19R10 tag を *B. circulans* β -galactosidase に結合させた。親和性ペプチドの結合により酵素の比活性は約 40% に低下した。この KPS19R10 tag 連結 β -galactosidase の濃度を変えて細胞培養用の親水性 96 穴ポリスチレンプレートの底面に固定化した。ポリスチレンプレートに固定化した酵素に 0.24% PNPG を添加し、37°C で、一定時間反応を行った。反

応実験に *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranosid (ONPG) ではなく PNPG を用いた理由は、*B. circulans* β -galactosidase の場合、基質として ONPG よりも PNPG に対する比活性が約 3 倍程度高いからである。いずれの濃度の酵素溶液を用いた場合も固定化酵素の活性には大きな差は認められなかったことから、固定化に大過剰の酵素溶液が使用されたことが推定された。基質のみを交換して繰り返し反応を行ったところ、固定化酵素の活性は回数と共に緩やかに低下したが、4°C の緩衝液中で静置すると、明らかに活性が回復する傾向を示した。今後、ポリスチレン表面での酵素の状態を解析することが必要であると考えている。DS domain タンパク質のポリスチレン表面への固定化については、現在検討を進めている。

以上の結果から、本研究で行った親和性ペプチドタグを連結する固定化法は、固定化状態の酵素の安定性および活性の維持に有効であることが明らかにされた。既往の研究では、プロテオームなどの分野でみられる抗原抗体反応などに着目した実験結果は多いものの酵素反応に適用した実験例が少ないので、本研究の結果は、非常に有意義であると考えられる。しかしながら、*B. circulans* β -galactosidase の場合は、96 穴ポリスチレンプレートの底面に固定化したために酵素担体の比表面積が十分に大きくとることはできなく、そのために精度の高いデータを得ることが困難であった。今後は、比表面積の大きい微粒子状のポリスチレンを使用した実験系を構築する必要がある。

さらに、今後の展開を図るためには、本方法を様々な酵素・酵素反応系に適用し、酵素の安定性、活性などの酵素の諸特性を詳細に解析することも必要であると考えている。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 2 件)

① J. Song, H. Imanaka, K. Imamura, M. Minoda, S. Yamaguchi, and K. Nakanishi: The Discoidin Domain of *Bacillus circulans* β -Galactosidase Plays an Essential Role in Repressing Galactooligosaccharide Production. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 73-79, **77** (2013). (<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120583>)

② J. Song, H. Imanaka, K. Imamura, M. Minoda, T. Katase, Y. Hoshi, S. Yamaguchi, and K. Nakanishi: Cloning and Expression of a

β -Galactosidase Gene of a *Bacillus circulans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 1194-1197, **75** (2011).

(<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.110014>)

[その他]

ホームページ等

http://www3.chubu.ac.jp/faculty/nakanishi_kazuhiro/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 一弘 (NAKANISHI KAZUHIRO)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：90026584

(2) 研究分担者(平成 23 年度のみ分担者)

今村 維克 (IMAMURA KOREYOSHI)
岡山大学・自然科学研究科・教授
研究者番号：70294436

今中 洋行 (IMANAKA HIROYUKI)
岡山大学・自然科学研究科・助教
研究者番号：10379711