

## 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24年 5月25日現在

機関番号：14301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22780090  
 研究課題名（和文） 新規カーボンナノチューブ／ペプチド複合素材を用いた酵素の機能的複合体化  
 研究課題名（英文） Formation of functional complex of enzymes with novel carbon nanotube/peptide composite  
 研究代表者  
 橋田 泰彦（HASHIDA YASUHIKO）  
 京都大学・物質－細胞統合システム拠点・特定研究員  
 研究者番号：30512462

研究成果の概要（和文）：カーボンナノチューブ（CNT）／ペプチド複合素材と酵素の複合体化に取り組み、モデル酵素としてアルカリホスファターゼ（ALP）を固定化することに成功した。固定化に伴う酵素機能への影響を解析した結果、ALP活性はわずかな基質親和性の低下を示したもののその分子活性は完全に維持していた。また、固定化によりALPの熱安定性が向上し、複合体化により酵素機能を改善することが可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Complex formation of carbon nanotube (CNT)/peptide composite and enzymes was performed, and it was succeeded that alkaline phosphatase (ALP) was immobilized to the CNT/peptide composite as a model enzyme. By the kinetic analysis of enzyme reaction, it was demonstrated that the molecular activity of ALP was retained through the immobilization, while its substrate specificity was reduced. Furthermore, thermal stability of ALP was enhanced by immobilization to CNT/peptide composite, suggesting that it is possible to improve enzyme function via immobilization to CNT/peptide composite.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素、カーボンナノチューブ、ペプチド、タンパク質工学、ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブは、物理・材料・エレクトロニクスなどの分野において大きな注目を集めるナノ炭素素材であるが、その優れた機械的、光学的、電気的特性により生化学分野においても大きな期待を集めている。しかし、その極めて疎水的な表面特性と、高い化学的安定性のために水溶液中への分散

や化学修飾が極めて困難であり、このことが生化学分野におけるCNT応用研究の推進を妨げる一因となっていた。

## 2. 研究の目的

我々は、CNTを自己組織化的に被覆することのできるペプチドをデザインし、このペプチドを用いてCNT表面を被覆することにより、

その表面特性を親水的に改変する方法を考案した。このペプチド被覆によって、CNT/ペプチド複合素材は水溶液中への分散性を獲得しただけではなく、ペプチド側鎖の官能基を利用した化学修飾をも可能とした。これにより、CNT を生化学分野で簡便に利用するための下地が整ったと言える。

そこで本研究では、ペプチド被覆 CNT を用いてその表面に酵素を固定化することにより、酵素の機能を融合した機能的 CNT 複合体を創生することを目的として、CNT/ペプチド複合素材へのアルカリホスファターゼを固定化するとともに、これに伴う酵素の機能変化について詳細な検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) ペプチド/CNT 複合素材の調製

本研究では、CNT を被覆するペプチドとして、正電荷を持ち高い分散安定性を有する (KWKG)<sub>7</sub> ペプチド、およびこれと同じ基本構造を持ち、一つの SH 基を有する CWKG(KWKG)<sub>6</sub> ペプチドを用いた。単層 CNT (SWCNT) 1 mg に (KWKG)<sub>7</sub> ペプチドおよび CWKG(KWKG)<sub>6</sub> ペプチドをそれぞれ 10 mg 1 mg 添加し、重水 5 ml を添加して 1 時間超音波処理することにより CNT 分散液を調製した。これに重水 8 ml を加えた後、20,000×g で 150 分間遠心することによりバンドル化した CNT を取り除いた後、分画分子量 100,000 の透析チューブを用いて透析を行い、過剰量のペプチドを除去した。これらの操作により SH 基を有する CNT/ペプチド複合素材を得た。



Fig. 1 CNT/ペプチド複合素材の分散液

#### (2) CNT/ペプチド複合素材への酵素固定

CNT と複合化するモデル酵素としては、酵素免疫測定法などで広く使用されている仔牛小腸由来アルカリホスファターゼ (CIAP) を用いた。マレイミド基を導入した CIAP (同人化学より購入) 10 μg (2 nmol マレイミド基相当量) と SH 基を有する CNT/ペプチド複合素材 (6 nmol SH 基相当量) を緩衝液中で混合し、4°C で 24 時間インキュベートして CNT/ペプチド複合素材の SH 基に CIAP を固定化した。

#### (3) CIAP 活性測定

酵素活性の測定は、基質に *p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) を用いて行った。反応は 1 mM

MgCl<sub>2</sub> および 20 μM ZnCl<sub>2</sub> を含む 1 M ジエタノールアミン緩衝液 (pH9.8) 中で行い、分光光度計を用いて 405 nm の吸光度変化を連続的に測定することにより、*p*NPP のリン酸エステル加水分解により生じる *p*-ニトロフェノール (*p*NP) の濃度を定量した。*p*NP の濃度はモル吸光係数  $\epsilon_{405} = 17,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  を用いて算出した。

## 4. 研究成果

### (1) CIAP 固定化の確認

CIAP 固定化 CNT 分散液を 0.22 μm のフィルターでろ過して CNT を除去したのち、ろ液の *p*NPP 加水分解活性を測定した。この結果、濾液に含まれた酵素活性はろ過前の 8% であった。この値は、フィルター濾過によって CNT/ペプチド複合素材から脱離するペプチドの割合とよく一致しており、ほぼ全ての CIAP が CNT/ペプチド複合素材に固定化されているものと考えられた。

### (2) 固定化に伴う CIAP 活性の変化

遊離 CIAP および CNT 固定化 CIAP の活性を反応温度 25°C で測定し、Michaelis-Menten プロットにて解析した。結果を Fig. 2 に示す。

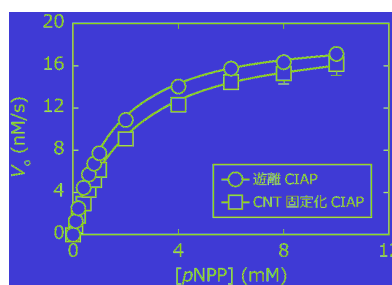


Fig. 2 CIAP による *p*NPP 加水分解反応の Michaelis-Menten プロット

この解析の結果、遊離 CIAP と CNT 固定化 CIAP の  $V_{\max}$  はそれぞれ 19.4 および 19.5 となり、固定化前後で完全に活性を維持していることが分かった。これまでに報告されている CNT への酵素の固定化法では、共有結合法で 42% ~ 62% (Asuri, P., *et al.* (2006) *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 804-811)、吸着法においては 1%未満~28% (Karajanagi, S. S., *et al.* (2004) *Langmuir* **20**, 11594-11599) まで酵素活性が減少することが報告されており、本研究で示された活性低下を全く伴わない CNT への酵素の固定化は、従来技術と比べて極めて優れたものであると言える。

CIAP の分子活性は固定化の影響を全く受けなかったが、 $K_m$  は遊離 CIAP が 1.47 mM、CNT 固定化 CIAP が 2.21 mM となり、固定化により若干の増加が見られた。これは、固定化により基質との親和性がわずかに低下したこ

とを示している。

### (3) CIAP 活性の熱力学的解析

CNT への固定化によって CIAP の触媒機能がどのような影響を受けるのかをさらに詳しく調べるために、酵素反応の熱力学的解析を行った。20°C~40°C で酵素反応を行い、各反応温度における  $V_{\max}$  および  $K_m$  を決定した。Fig. 3、Fig. 4 は求められた  $V_{\max}$  と  $K_m$  をそれぞれ Arrhenius プロットおよび van't Hoff プロットで解析した結果を示したものである。

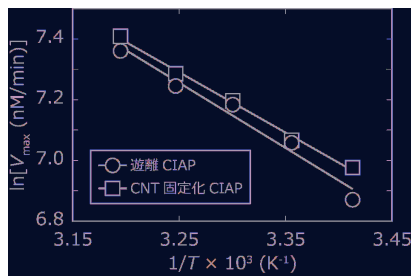


Fig. 3 CIAP による pNPP 加水分解反応における  $V_{\max}$  の Arrhenius プロット解析

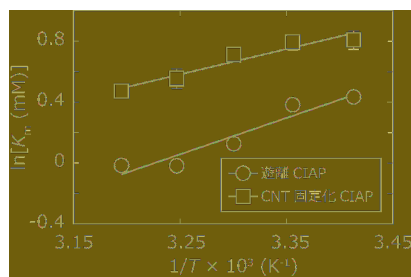


Fig. 4 CIAP による pNPP 加水分解反応における  $K_m$  の van't Hoff プロット解析

	$K_m$ (mM)	$\Delta G^\ddagger$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\ddagger$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\ddagger$ (J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> )
CIAP	1.47	-15.2	19.9	122
CNT 固定化 CIAP	2.21	-15.2	13.8	95.5

Table 1. 基質結合過程における熱力学的パラメーター

$V_{\max}$  は、20°C~40°C のいずれの温度においても遊離 CIAP と CNT 固定化 CIAP の間に大きな差は見られず、Arrhenius プロットもよく一致していた。このプロットから求められる反応の活性化エネルギー ( $E_a$ ) は、CNT 固定化 CIAP が 16.5 kJ/mol、遊離 CIAP は 17.9 kJ/mol と算出され、両者の値はよく一致していた。これらの結果からも、CNT/ペプチド複合素材が固定化された酵素の分子活性に全く影響を及ぼしていないことが確認された。一方、 $K_m$  の van't Hoff プロットでは測定したすべての温度で CNT 固定化 CIAP の  $K_m$  の値が遊離 CIAP の値よりも大きくなり、両者の van't Hoff プロットは平行になった。このプロット

から求められる熱力学的パラメーターを Table 1 に示した。この結果、CNT への固定化に伴う  $K_m$  の増大が、基質結合に伴うエントロピー変化量 ( $\Delta S^\ddagger$ ) の減少によるものであることが明らかとなった。これは CNT への固定化により CIAP の運動が制限され、このことが基質との結合においてエントロピー的に不利に働いていることを示しているのではないかと考えられる。

### (4) CIAP の熱安定性の検討

次に CNT/ペプチド複合素材に固定化することによって、タンパク質の構造安定性が向上するかどうかを検討するために、CNT 固定化 CIAP の熱安定性を評価した。Fig. 5 は 39°C~52°C で 30 分間熱処理したのちの CIAP の残存活性を測定したものである。この結果、30 分間の熱処理によって活性が 50% まで減少する温度  $T_{50}$  は、CNT 固定化 CIAP が 49°C、遊離 CIAP は 44°C となり、CNT/ペプチド複合素材への固定化により  $T_{50}$  が 5°C 向上していることが確認された。

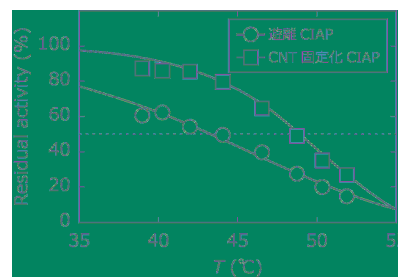


Fig. 5 CIAP の熱安定性

さらに詳細な検討を行うため、各温度において熱失活を経時的に測定し、失活の速度定数を Arrhenius プロットで解析した (Fig. 6、Table 2)。

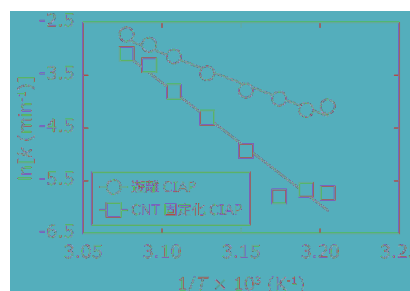


Fig. 6 CIAP の熱失活の Arrhenius プロット解析

	$T_{50}$ (°C)	$E_a$ <sup>†</sup> (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$E_a$ <sup>‡</sup> (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\ddagger$ (J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> )
CIAP	44	137	95.5	-11.4
CNT 固定化 CIAP	49	113	102	129

Table 2. CIAP の熱失活過程における熱力学的パラメーター

この結果、CNT 固定化 CIAP の熱安定性向上は、失活に必要なエンタルピー変化量 ( $\Delta H$ ) が遊離 CIAP と比べて大幅に上昇したためであることが分かった。

#### (5) 総括

本研究で用いた CNT/ペプチド複合素材は、これまで困難であった CNT の水溶液系への分散と、化学修飾による簡便な機能化を実現しているだけではなく、酵素を固定化する担体としての機能に関しても従来の CNT 素材と比べて優れていることが示された。特に酵素活性は、これまでに報告されている CNT 素材と固定化法の組み合わせでは、大幅な活性低下が避けられなかったが、CNT/ペプチド複合素材を用いた場合には活性低下を全く示しておらず、画期的である。また、酵素の熱安定性も向上しており、酵素の固定化に優れた特性を有していると言える。酵素を固定化した CNT は、バイオセンサーやバイオカタリシスエレクトロニクスにおける酵素電極として大きな期待がもたれており、今後これらの分野における応用研究の展開が期待される。

#### 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 1 件)

- ① Development of a Novel Composite Material with Carbon Nanotubes Assisted by Self-Assembled Peptides Designed in Conjunction with  $\beta$ -Sheet Formation  
Yasuhiko Hashida, Tomokazu Umeyama,  
Journal of Pharmaceutical Sciences, in press (Epub ahead of print)  
DOI: 10.1002/jps.23144  
査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① カーボンナノチューブへのアルカリホスファターゼの固定化  
橋田 泰彦、梅山 有和、今堀 博、橋田 充  
日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都)  
発表年月日: 2012 年 3 月 24 日
- ② ペプチドを用いて分散されたカーボンナノチューブを利用した光線温熱効果の検討  
田中 宏則、周 舒文、橋田 泰彦、川上 茂、梅山 有和、村上 達也、今堀 博、山下 富義、橋田 充  
日本薬学会第 131 年会 (静岡)  
発表年月日: 2011 年 3 月 29 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: カーボンナノチューブ-ペプチド複合体

発明者: 橋田 泰彦、橋田 充、樋口 ゆり子、今堀 博、梅山 有和、磯田 正二、辻本 将彦

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-068972

出願年月日: 平成 23 年 3 月 25 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

橋田 泰彦 (HASHIDA YASUHIKO)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定研究員

研究者番号: 30512462