

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 4日現在

機関番号：	15501
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011~2012
課題番号：	23760751
研究課題名（和文）	せん断流・温度変動に特異的に応答するクラスター化リポソームによる酸化酵素反応操作
研究課題名（英文）	Enzymatic oxidation reactions using clustered liposomes that specifically response to shear flow and temperature change
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）：バイオリアクター内の攪拌・混合などの液流動が誘起するせん断ストレスと温度変化によりリン脂質二分子膜小胞（リポソーム）の膜特性が変化する現象を、リポソームの膜組成、粒子径および凝集（クラスター化）挙動に基づき誘導・制御する手法を明らかにした。これらに基づき、バイオリアクターに懸濁させた各種酵素封入リポソームを酸化反応場とすることにより、酵素の安定性と反応性を広範に制御できる酸化酵素反応プロセスを開発した。

研究成果の概要（英文）：The membrane properties of closed phospholipid bilayers (liposomes) could be altered by relatively small changes in temperature and shear stress generated by the flow and mixing conditions in bioreactors. These membrane properties of liposomes were regulated based on their composition, size and clustering characteristics. Based on the results obtained, the catalytic oxidation reaction systems, where the stability and reactivity of enzymes could be widely regulated, were developed using various types of enzyme-containing liposomes suspended in a bioreactor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：リポソーム、酵素反応、バイオリアクター、ナノバイオ、せん断流

1. 研究開始当初の背景

グルコースオキシダーゼ等の酸化酵素は、医薬・食品工業、生体分子の選択的かつ高感度な検出等において広く応用が期待されている。酸化酵素反応では、副生する過酸化水素が酵素活性を阻害するため、酸化速度を精密に制御する必要がある。

内部水相に酵素分子が封入された脂質二分子膜小胞（リポソーム）は、微小サイズのバイオリアクターである。リポソーム懸濁系の酵素反応では、基質分子の脂質膜透過が律速過程となる。バイオリアクター内の流動特性に基づいてリポソーム膜の微細構造を制

御できれば、過酸化水素の生成・移動が精密に制御される酸化酵素反応プロセスを構築できる。これまでに、コーン・プレート型粘度計内の液体せん断流中において、リポソーム内に封入された蛍光色素の膜透過性が増大する現象およびリポソーム内封入酵素が気液二相流中と高温条件下で高度に安定化されることが見出されている。リポソームの粒子径や脂質膜組成に基づき、せん断流と温度変動に対する脂質膜の構造変化を効果的に誘起できれば、安定かつ高効率な酸化酵素反応プロセスを構築できる。

2. 研究の目的

本研究では、せん断流と温度に応答して脂質膜透過性が変化するリポソームを開発して、酸化酵素反応の制御に応用する。せん断流に対する脂質膜構造の応答性は、リポソームの膜組成と粒子径により制御する。せん断流に対する脂質膜の構造変化を増大させるために、リポソーム間の凝集によるクラスター化リポソームの調製と機能を検討する。また、補酵素を複合化させた脂質膜を調製して、温度変動する条件下でリポソーム膜が酵素活性を安定化する反応系について検討する。得られる結果に基づき、脂質膜を介した基質・生成物移動の制御を伴う酸化酵素反応プロセスについて、グルコースオキシダーゼ反応をモデル系として検討する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光色素内包リポソームの調製

不飽和リン脂質 POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) の乾燥膜を 100 mM の Carboxyfluorescein (CF) を溶解した 50 mM Tris-HCl / 0.1 M NaCl 緩衝液 (pH 7.4) で水和し、凍結融解後、Extrusion 法により細孔径 100 nm の膜を用いて単分散の CF 封入りリポソーム (CFL) を調製した。リポソーム外水相の CF はゲル濾過で分離した。脂質濃度は酵素法で決定した。CF は蛍光分光光度計を用いて、励起波長 460 nm, 蛍光波長 560 nm で定量した。

(2) せん断流中のリポソームの安定性

コーン・プレート型粘度計 (DV-II+Pro, Brookfield Eng. Lab., Middleboro, MA) に 0.5 mL の CFL 懸濁液を仕込んだ。40 - 55°C, コーン回転数 200 rpm (せん断速度 1500 s⁻¹) でリポソームを処理したときの平均粒子径 D_p , 多分散指数 PI を動的光散乱法により追跡した。

(3) せん断流中における脂質膜透過性

粘度計に 0.5 mL の CFL 懸濁液を仕込んだ。40 ~ 55°C で 60 min 間 漏出率 R_{CF} を追跡した。 R_{CF} は初期蛍光強度を I_0 , 40 mM コール酸で脂質膜を溶解させた時の全蛍光強度を $I_{0\infty}$, 任意の時間 t における蛍光強度を I_t , 全蛍光強度を $I_{t\infty}$ として $R_{CF} = (a I_t - I_0) / (I_{0\infty} - I_0)$ を得た。ここで $a = I_{0\infty} / I_{t\infty}$ であり、水分蒸発に伴う CF の濃縮を補正するために用いた。

(4) 補酵素複合化脂質膜の調製

POPC, Amino 基もつ POPE, Cholesterol からなる脂質膜 (POPC:POPE:Cholesterol=4:3:3) を 50mM リン酸緩衝液で水和し凍結融解後、Extrusion 法により粒子径を調整した。リポソーム/NADH (β -reduced nicotinamide adenine

dinucleotide) 混合液 ([Lipid] = 10 mM, [NADH] = 10 mM) を 2.5-5.0 mM の架橋剤溶液 (GA, PEG) に滴下した。混合液を 37°C で 5-30min 間静置して固定化反応を進行させた。未反応の架橋剤末端は 10mM Glycine (Gly) によりブロックした。遊離 NADH はゲルろ過で分離して固定化 NADH リポソームを得た。また、NADH の機能を明らかにするために Gly 処理のみを行ったものを調製した。リポソームの ζ -電位はレーザドップラー法により測定した。脂質膜に複合化された NADH と酵素との親和性は 60°C における蟻酸脱水素酵素 FDH の熱安定性に及ぼす NADH 複合化リポソームの効果に基づき評価した。FDH 活性はリポソームを溶解後、1.5 mM NAD⁺/FDH 触媒下、0.3 M 蟻酸の酸化による NADH の生成速度から決定した。FDH の一次失活を仮定して、FDH 活性の半減期 $t_{1/2}$ を算出した。

(5) リポソームのクラスター化反応

負電荷をもつ POPG (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol) を含有させ、Cholesterol を 30 mol% 含む POPC リポソームを 1.0 g/L グルコースオキシダーゼ (GO) を溶解した 5.0 mM MES / 0.15 M NaCl 緩衝液 (pH 5.5) 中で調製した。粒子径は約 200 nm とした。種々の濃度で CaCl₂ 溶液を添加して 25°C で 20 min 静置後粒子径分布を測定した。

(6) リポソーム系酸化酵素反応操作

① 脂質アシル鎖の特性が異なる酵素封入りリポソームの調製

使用した 3 種類のリン脂質の構造を Fig. 1 に示す。POPC, DLPC (1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) または DEPC (1,

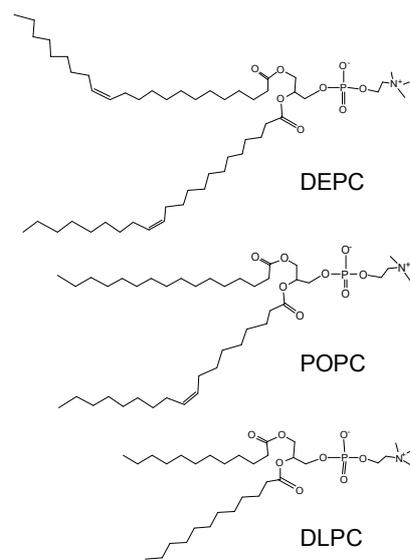


Fig. 1 各リン脂質の構造

2-Dierucoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) から形成される乾燥脂質膜を 1.0 g/L GO を溶解した 5 mM MES/0.15 M NaCl 緩衝液 (pH 5.5) で水和, 凍結融解して GO 封入リポソーム (POPC-GOL, DLPC-GOL, DEPC-GOL) を調製した。リポソーム径は平均細孔径 200 nm の膜を用いた Extrusion 法により調整した。遊離 GO 分子はゲル濾過により各 GOL から分離した。

②エアリフト型気泡塔内酸化反応操作

ライザー内径 8.0 mm, ダウンカマー内径 4.8 mm の外部循環式エアリフト型気泡塔内に GOL 懸濁液 ([lipid] = 0.5 mM) を仕込んだ。空気をガス空塔速度 $U_G = 0-3$ cm/s で気泡塔内に通気した。40°Cにおいて, 初期グルコース濃度 10 mM で酸化反応を開始した。グルコース消失量の指標として生成過酸化水素蓄積量の経時変化を酵素法により追跡した。

4. 研究成果

(1) リポソーム膜の透過性と安定性に及ぼす温度とせん断流の影響

$D_p = 117$ nm の CFL をコーン・プレート型粘度計内のせん断流中に 1 h 懸濁したときの CF 漏出率 R_{CF} および脂質に関する物質収支から算出したコーン・プレートステンレス表面への脂質吸着率 A_L の各温度依存性を Fig. 2 に示す。せん断速度は最大値 1500 s⁻¹ の一定とした。脂質吸着率は温度上昇とともに増加する傾向にあるが, 各温度で低レベルである。 R_{CF} 値は温度の上昇に伴い増加しており, 55°Cでは 40°Cの 4.2 倍大きな R_{CF} 値が得られている。すなわち, 液体せん断ストレスによるリポソーム膜透過性の増大は, 高温条件下で顕著となることがわかる。40°Cにおける R_{CF} 値の経時変化をせん断流中と静止液系で測定した結果を Fig. 3 に示す。静止液系に比べて, せん断流中では, いずれの時間で

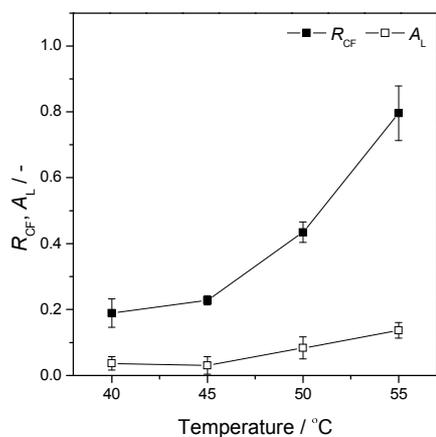


Fig. 2 CF 漏出率 R_{CF} と脂質吸着率 A_L に及ぼす温度とせん断流の影響

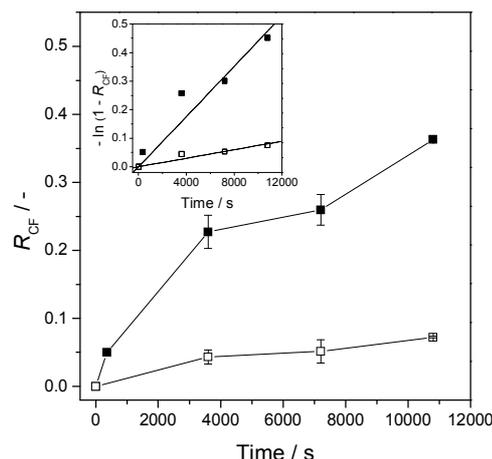


Fig. 3 せん断流中 (■) および静止液中 (□) に懸濁されたりポソーム (CFL) の R_{CF} 値の経時変化 (40°C)。

も R_{CF} が増大している。CFL の粒子径をせん断流懸濁前後で測定して比較したところ, 平均粒子径と多分散指数に顕著な差異は認められなかった (データ省略)。これらの結果より, CFL のベシクル構造は維持されたまま脂質膜構造が局所的に変化して CF の漏出が促進されたと考えられる。CF の脂質膜透過係数 P_{CF} を $-\ln(1 - R_{CF}) = P_{CF}(6/D_p)t$ に基づき算出すると (Fig. 3, inset の直線プロットに相当), せん断流中と静止液中の P_{CF} はそれぞれ 0.74 pm/s と 0.13 pm/s であった。Fig. 4 に R_{CF} 値に及ぼすリポソーム径と温度の影響を示す。各温度において粒子径の増大とともに R_{CF} 値が減少する傾向にある。これは粒子径の増大に伴いリポソームの比表面積が低下するためである。 $D_p = 323$ nm のリポソームの R_{CF} 値は大きくなる傾向が認められる。これは, せん断流中において粒子径の大きなリポソームの構造が部分的に崩壊す

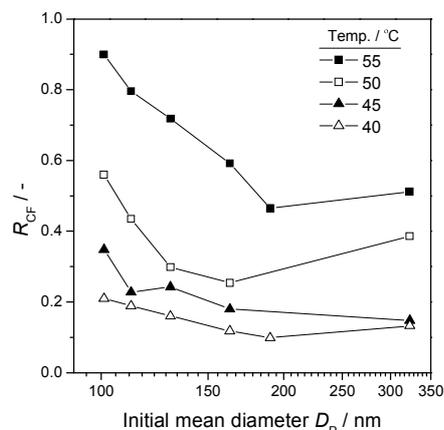


Fig. 4 せん断流中における R_{CF} 値に及ぼすリポソーム初期平均粒子径 D_p と温度の影響

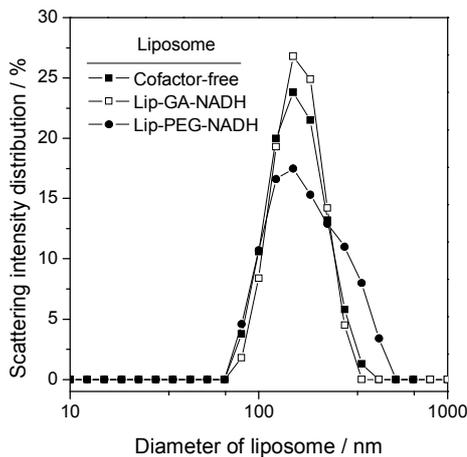


Fig. 5 各種 NADH 複合化リポソームの粒子径分布

る可能性を示している。

(2) NADH 複合化リポソームの特性と機能
①脂質膜への NADH の固定化に及ぼす架橋剤分子種の影響

Fig. 5 に GA と PEG を介して NADH を共有結合させたりポソームの粒子径分布を示す。比較のために、NADH 非共存下で同様の処理を行ったリポソームの結果も示す。PEG 系 (Lip-PEG-NADH) は GA 系 (Lip-GA-NADH) に比べると多分散である。これは PEG がリポソーム同士を架橋する可能性を示している。FDH-NADH 間相互作用に及ぼす粒子径の影響を低減するために、ゲルろ過によりいずれの架橋剤でも $D_p=150\text{-}155\text{nm}$ で単分散 ($PI < 0.1$) のリポソームとした。NADH を固定化したリポソームの膜表面は GA 系、PEG 系いずれの場合でも負に帯電していた。

②高温条件下におけるリポソーム膜上の NADH と FDH の親和性

Fig. 6 に 60°C における遊離 FDH の $t_{1/2}$ (1) と FDH の $t_{1/2}$ に及ぼす遊離 NADH(2)、固定化 NADH リポソーム(GA 系(3)、PEG 系(5))の影響を示す。また、脂質膜の影響を明らかにするために FDH と Gly 処理のみのリポソーム(GA 系(4)、PEG 系(6))共存下の $t_{1/2}$ も示す。FDH は $2 > 5 > 3 > 1$ の順で安定である。4,6 は 1 の半減期の値とほぼ同じであることから、リポソーム膜自体は負に帯電した FDH との電荷反発により FDH の $t_{1/2}$ にほとんど影響しない。したがって 3,5 の FDH 安定化効果は脂質膜上における NADH-FDH 間結合によるものである。2 に比べて 3, 5 の NADH 効果が低下した一因として、脂質膜による立体障害が考えられる。3 より 5 の方が熱失活の抑制効果が高いのは、PEG が脂質膜上における NADH-FDH 結合の立体障害を抑制しているためと考えられる。得られた結果に基づ

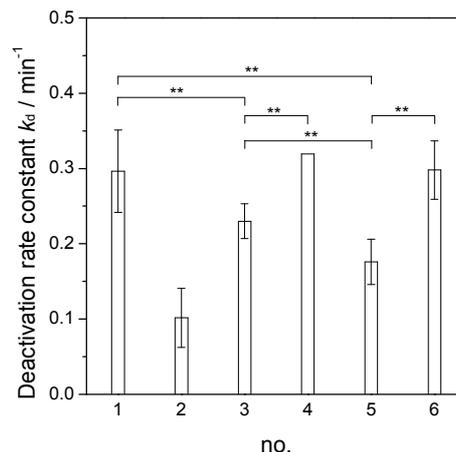


Fig. 6 NADH 複合化リポソーム共存下における FDH の 60°C における熱安定性(酵素活性の半減期)(共存物質;1: なし, 2: 遊離 NADH, 3: Lip-GA-NADH, 4: Lip-GA-Gly, 5: Lip-PEG-NADH, 6: Lip-PEG-Gly, NADH 濃度は 0.1 mM に統一した。 $**p < 0.01$ (Student's t test))

き、リポソーム膜上における NADH と FDH の相互作用の概念図を **Fig. 7** に示す。

(3) リポソーム系酸化酵素反応に及ぼす脂質アシル鎖の影響

脂質アシル鎖の特性が異なるリポソームにグルコースオキシダーゼを封入して、グルコースの酸化活性を調べた。DEPC の 2 本の疎水鎖中の炭素数は各 22 であり、いずれも二重結合を 1 つ有する。POPC を構成する各炭素鎖の炭素数は 18, 16 であり、二重結合は炭素数 18 の疎水鎖中に 1 つ存在する。DLPC は飽和脂質であり炭素数はいずれも 12 である。**Fig. 8** に外部循環式エアリフト型気泡塔における各 GOL のグルコース酸化活性を示す。静止液系、気液流動場いずれの場合も DEPC-GOL 触媒下の酸化速度が最も大きい。静止液系において不飽和度が最も高い

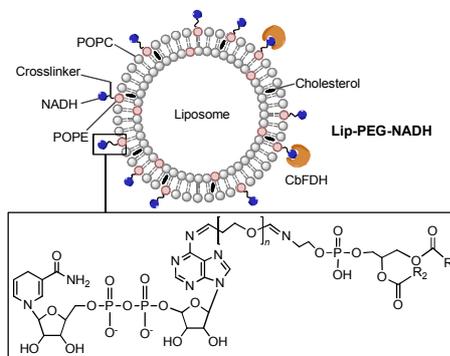


Fig. 7 リポソーム膜上における高温条件下の NADH と FDH 間の相互作用

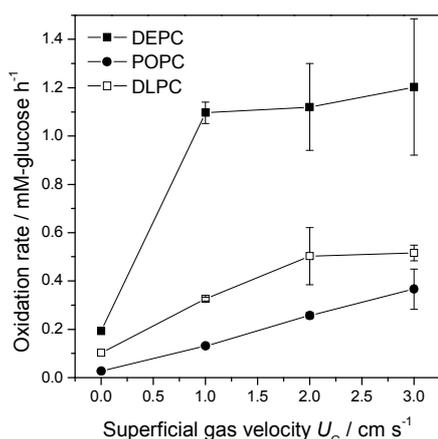


Fig. 8 GOL 触媒下のグルコース酸化速度に及ぼす GOL 構成脂質とガス空塔速度の影響

DEPC 膜は疎水鎖の配列に乱れが大きく電荷をもたないグルコース分子の膜透過が促進されたものと考えられる。DEPC-GOL 系の酸化速度は静止液系 ($U_G = 0$) と比べて $U_G = 1.0$ cm/s で顕著に増加し、 $U_G = 2.0, 3.0$ cm/s では僅かな増加がみられる。この結果より、DEPC 膜は気液流動に誘起されるせん断ストレスにより著しく構造変化すると考えられる。POPC-GOL は U_G の増加とともに酸化速度が増大しているが、速度が比較的小さい。DLPC-GOL は POPC-GOL と同様に酸化速度が U_G に依存して増大している。これらの結果より、POPC-GOL, DLPC-GOL の各系では、気液流動場中においてもグルコースの脂質膜透過律速で酸化反応が進行すると考えられる。

(4) クラスター化リポソームの調製と酸化酵素反応への応用 (吉本ら, 未発表データ)

負電荷をもつ脂質 POPG を 20 mol% 含有するリポソームは Ca^{2+} 濃度に依存して可逆的に凝集することがわかった。リポソームの凝集体は直径 3 μ m 程度であり、リポソームはクラスター化していると考えられる。そこで、各リポソーム内に予めグルコースオキシダーゼを封入して、これらをクラスター化させてグルコース酸化反応の触媒として応用した。静止液系では、クラスター化させていないグルコースオキシダーゼ封入リポソーム (GOL) に比べてクラスター化 GOL (Clu-GOL) の反応性は低下した。クラスター化により液本体に接触する脂質膜界面積が減少したことと Ca^{2+} と脂質分子の結合による脂質膜の構造変化が要因として考えられる。一方、気泡塔内の気液流動場では、Clu-GOL は GOL と同程度の反応性を示した。これらの結果は、液体せん断流中でクラスターの構造が変化して、グルコースをリポソ-

ム内に供給するための脂質膜界面がクラスター化状態に比べて効率よく形成されることを示唆している。リポソームのクラスター化により遠心分離等による反応液からのリポソームの分離回収が容易となり、リポソーム型触媒を繰返し用いる酸化酵素反応プロセスを実現できると考えられる。

リポソーム内への酵素の封入や脂質膜の透過性についてはリポソームを用いる薬物担体の開発をはじめとして国内外で多様な研究が活発に行われている。一方、本遂行課題の成果を発展させて、流体の流れが作り出す機械的ストレスを利用してリポソーム系で進行する各種反応を制御することができれば、リポソームをバイオリアクターにおける生体触媒として応用することや従来知られているリポソームの機能・応用範囲を拡大させることができる。

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 8 件)

- ① T. Natsume and M. Yoshimoto, Membrane permeability and stability of liposomes suspended in shear flow. *J. Dispersion Sci. Technol.*, in press. 10.1080/01932691.2012.752712. 査読有
- ② M. Yoshimoto, N. Kunihiro, N. Tsubomura and M. Nakayama, Preparation of liposome-coupled NADH and evaluation of its affinity toward formate dehydrogenase based on deactivation kinetics of the enzyme. *Coll. Surf. B*, 109, 40-44 (2013). 査読有
- ③ M. Inoue and M. Yoshimoto, Oxidation of glucose in gas-liquid flow catalyzed by glucose oxidase-containing liposomes with different acyl chain properties. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 46, 302-306 (2013). 査読有
- ④ M. Yoshimoto, M. Yamasaki, M. Okamoto, H. Umakoshi and R. Kuboi, Oligolamellar vesicles for covalent immobilization and stabilization of D-amino acid oxidase. *Enzyme Microb. Technol.*, 52, 13-19 (2013). 査読有
- ⑤ 吉本誠, リポソーム懸濁系の物質移動を伴う酵素反応. *膜*, 37, 270-275 (2012). 査読有
- ⑥ M. Yoshimoto, M. Inoue and N. Takaki, Reactivity and stability of catalase-bound liposomes containing glucose oxidase in an airlift bubble column. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 45, 645-650 (2012). 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① T. Natsume and M. Yoshimoto, Permeability and stability of phospholipid bilayer membranes under fluid shear stress in a cone-and-plate geometry, *The 18th Symp. Young Asian Biochem. Engineer's Community (YABEC2012)*, 2012. 10. 27, 徳島, 徳島大学
- ② 吉本誠, 夏目友誉, 井上正大, 液体せん断流中における脂質膜透過性とリポソーム系酸化酵素反応, 分離技術会年会 2012, 2012. 6. 2, 吹田, 関西大学
- ③ 夏目友誉, 堤賢太郎, 吉本誠, 脂質二分子膜の安定性と透過性に及ぼすせん断ストレス条件と懸濁リポソーム径の影響, 化学工学会第 77 年会, 2012. 3. 15, 東京, 工学院大学
- ④ 夏目友誉, 堤賢太郎, 吉本誠, 脂質二分子膜の透過性に及ぼすせん断流と温度の影響, 第 4 回化学工学 3 支部合同福井大会, 2011. 12. 8, 福井, ホテルフジタ福井
- ⑤ M. Yoshimoto, M. Inoue and N. Takaki, Activity and structural change of catalase-bound liposomes containing glucose oxidase suspended in an external loop airlift bubble column. *1st Int. Symp. Multiscale Multiphase Process Eng. (MMPE)*, 2011. 10. 5, 金沢, 金沢市文化ホール

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：