

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410230

研究課題名(和文) プロテアーゼ活性維持力増大のためのトリプシン固定化ナノシートの調製とその応用

研究課題名(英文) Trypsin-immobilized nanosheets for increased proteolytic stability

研究代表者

坂田 眞砂代 (Sakata, Masayo)

熊本大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：60187391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、種々の化学修飾法を用いて、セルロース粒子や酸化グラフェンナノシート(GO)及びそれらの複合体への酵素(トリプシン)の固定化を試みた。得られた種々の固定化トリプシンの酵素活性をフリーのトリプシンと比較し、最適なトリプシン化学修飾法を検討した。

GOシート単体へ固定化したトリプシン固定化量は、シート1gあたり約1000 mgであった。フリーのトリプシンの活性は、50℃、1時間の保存条件下で、その活性は初期活性の10%以下に著しく減少した。一方、トリプシン-GOシートは、50℃、1～6時間保存までは、高い活性(80%以上)を維持できた。

研究成果の概要(英文)：In this paper, we report a simple and natural method for the preparation of enzyme-immobilized graphene oxide nanosheets (GO sheets) by the diimide-activated amidation of GO-bound carboxylic acids. Trypsin was used as a model enzyme for the investigation. In order to study the actual stabilization of immobilized trypsin, we also compared the thermal and chemical stabilities of the immobilized trypsin with the free-trypsin stabilities under various conditions. The trypsin-immobilized GO sheets (1.9 mg per mg-GO sheets) showed significantly higher thermal and chemical stabilities than the free form. After heat treatment at 50 °C for 6 h, the trypsin-GO sheets retained 80% of its initial activity, but free trypsin only retained 4% of its initial activity.

研究分野：機能性高分子化学

キーワード：酸化グラフェン ナノシート トリプシン 固定化酵素 酵素活性 自己消化 酵素安定性

1. 研究開始当初の背景

(1) トリプシンとは

酵素は物質の消化や吸収及び輸送など、生体内での化学反応の進行に触媒として機能する分子で、生体活動には欠かせないものである。消化酵素の一つであるトリプシンは、熱や pH の変化により変成し、とくに水溶液中では自己加水分解反応が進行し、時間とともに、その機能を失活してしまう。

(2) 固定化酵素について

近年、種々の微粒子担体に消化酵素を結合させ、活性を安定化させ、タンパク質解析のための分解酵素として利用する試みがなされている。一般に、酵素を担体に結合させる方法には、物理的固定化法と化学固定化法がある。物理固定化法は、操作は簡便であるが、トリプシンが担体から遊離しやすいという欠点がある。一方、化学的固定化法の例として、Yang ら (*Talanta*, Vol. 80, pp. 1298-1304, 2010) により、トリプシン固定化ダイヤモンドナノ粒子が開発されている。同固定化トリプシンは、60°Cの溶液中で5時間保存後においても、初期活性の60%のタンパク質分解能を維持できている。しかしながら、同ナノ粒子の調製は、担体表面へ官能基を結合した後、トリプシンを結合するという複雑な手順を要することや担体が高価であることより、実用化に至っていない。

(3) 申請者らの固定化酵素の開発状況

この分野において、すでに、申請者らは、酸化グラフェン(GO) ナノシート表面のカルボキシル基に酵素タンパク質をアミド結合により固定化することに成功している[①]。GO シートは、幅広い比表面積(約 2600 m²/g)をもち、種々の官能基(カルボキシル基, エポキシ基, OH 基)を有し、安価に調製できる担体である。本研究では、トリプシンを GO ナノシート表面の種々の官能基に化学的固定化を試みる。得られた種々のトリプシン固定化 GO ナノシートとフリーのトリプシンとのプロテアーゼ活性維持能(カゼイン, アルブミン等の分解能)を比較し、タンパク質分解酵素としての性能を評価する。トリプシン固定化ナノシートは、トリプシンを常に水中に分散・安定化させることができ、この特長がトリプシンの自己加水分解を低下させ、高い酵素活性を長時間維持できるものと期待している。

2. 研究の目的

本研究では、水溶液中でのトリプシン(タンパク質分解酵素)の活性を安定化させ、長時間その活性を維持させるために、トリプシン固定化ナノシートを調製する。トリプシンを固定する基体としては、幅広い比表面積(約 2600 m²/g)をもち、種々の官能基(カルボキシル基, エポキシ基, OH 基)を有する酸化グラフェンナノシートを選択する。同ナノシート表面に、種々の共有結合法でトリプシンを固定化させることにより、トリプシン活性の安定化を試みる。とくに幅広い pH 域、高温領域(50-60°C)および有機溶媒(エタノール濃度: 10~50%)の条件下で、タンパク質分解活性を低下させることなく、その活性を長時間(24 時間以上)維持することが可能なトリプシン固定化ナノシートの設計と「タンパク質解析のための分解酵素」としての応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) ナノシートの設計と調製

ナノシートの材料としては、表面に種々の官能基(カルボキシル基, エポキシ基, OH 基)を有する酸化グラフェン(GO)を選択する。GOは、Hummer 法を改良した方法[②]を用いて調製した。GO ナノシートは、GO を超純水中で超音波処理し、ナノシート状(厚さ:1-1.5 nm, 幅: 500-2000 nm)に分散させることにより調製した。

(2) トリプシン固定化GOシートの調製

a) アミド結合による固定化法

活性エステル化法(図1)により、pH 6 の水溶液中で、GO ナノシート表面のカルボキシル基にトリプシンをアミド結合させることにより調製した。

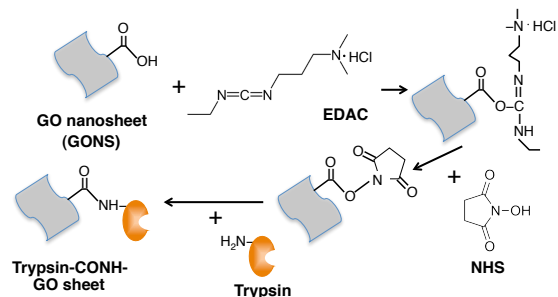


図1. アミド結合によるGOへのトリプシンの固定化

b) エポキシ基への固定化法

水酸化ナトリウム水溶液中で、GO ナノシート表面のエポキシ基を開環させることにより、トリプシンを共有結合させた(図2)。

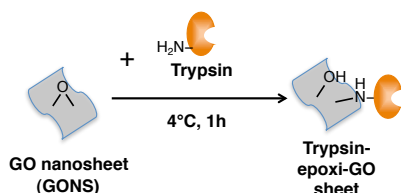


図2. エポキシ基によるGOへのトリプシンの固定化

c) 磁性化GOナノシートへのアミド結合による固定化法

GOとFe²⁺の酸化還元反応によってGOに磁性粒子を固定化後、(2)-a)の方法を用いてトリプシンを固定化した(図3)。

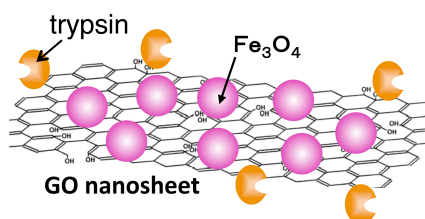


図3. 磁性化GOシートへのトリプシンの固定化

(3) ナノシートの物性評価および表面観察

酵素固定化ナノシートの合成確認は、主に元素分析法およびフーリエ変換型赤外(FT-IR)分光法により行った。ナノシート表面のナノ構造は、既存の原子間力顕微鏡(AFM)装置を用いて評価した。

(d) ナノシートの機能性の評価

種々のナノシートのタンパク質(カゼイン)の分解能を比較し、トリプシンの活性を維持可能なナノシートへの最適な固定化法を確立した。試料溶液中の酵素活性の定量は、初年度に申請している吸光プレートリーダー(SH-1100)を用いたカイネティック法濃度測定システムにより定量した。トリプシンの活性量は、トリプシンがカゼインを分解して遊離させるチロシンの濃度を測定することにより算出した。

4. 研究成果

(1) 固定化トリプシンの合成の確認

トリプシン固定化ナノシートの合成確認

は、XPS, FT-IR 及び元素分析等により行った。図4に示すように、担体のGOナノシートのFT-IR spectraにおいては、GO由来のC-O-C伸縮(1045 cm⁻¹), C-OH由来のO-H変角(1380 cm⁻¹), C=C伸縮(1642 cm⁻¹) および-COOH由来のC=O伸縮(1724 cm⁻¹)が確認できた。一方、フリーのトリプシンおよびトリプシン-CONH-GOシートにおいては、オリジナルのGOシートには存在しないアミドI(R-CONHR'由来のC=O伸縮: 1639 cm⁻¹)およびアミドII(R-NHR'由来N-H変角: 1535 cm⁻¹, N-H伸縮: 3300 cm⁻¹)のピークが共通して確認できたことより(図4-b)およびc)、トリプシン-CONH-GOシートにトリプシンが化学修飾されていることがわかった。GOシート1mgあたりに、1.9mgのtrypsinを化学修飾することができた。

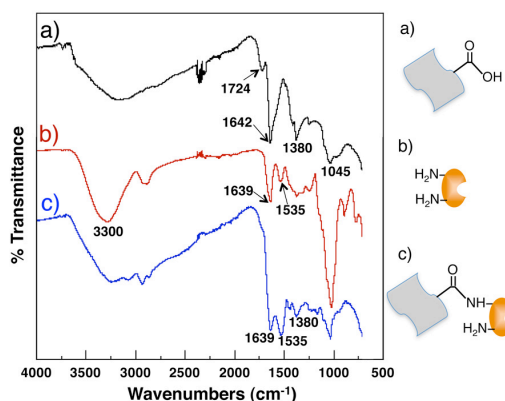


図4. GOシート(a), トリプシン(b)およびアミド結合によるトリプシン固定化GOシート(c)のFT-IRスペクトル。

(2) 固定化トリプシンの酵素活性の評価

フリーのトリプシンおよびトリプシン-CONH-GOシートの酵素活性(プロテアーゼ活性)の比較は、両者のカゼイン分解能を比較することにより評価した。具体的には、カゼインを分解することにより、1分間に1μgのチロシンを遊離させる酵素活性量を1unitとして活性能を算出した。図5-(a)に示すように、トリプシン-CONH-GOシートは、50°Cの条件下で1-6時間までは、高いプロテアーゼ活性(80%以上)を維持できた。また、フリーのトリプシンをエタノール水溶液中に保存した場合、エタノール濃度が20%以上になるとその酵素活性が著しく低下するのに対し、トリプシン-CONH-GOシートは、エタノール濃度が10-50%の条件下でさえも、高いプロテアーゼ活性(80%以上)を維持できた(図5-(b))。トリプシン固定化GOナノシートが、フリーのトリプシンに比べ、高い活性(80%以上)を維持できたことは、担体である

ナノシートの高い分散性に起因するものと考えられる。同ナノシートはトリプシンの活性を阻害することなく、トリプシンを水中に分散・安定化させることができ、自己加水分解を低下させ、酵素の安定化が得られたものと予想される。さらに、トリプシン固定化磁性GOナノシート (Fe_3O_4 1.0 mg/mg-sheets, トリプシン 0.8 mg/mg-sheets) は、磁石を近づけると容易に引きつけられ回収も容易であった(図6)。以上の結果より、得られた磁性化酵素固定化担体は、その機能性や再利用の可能性が大いに期待できる。

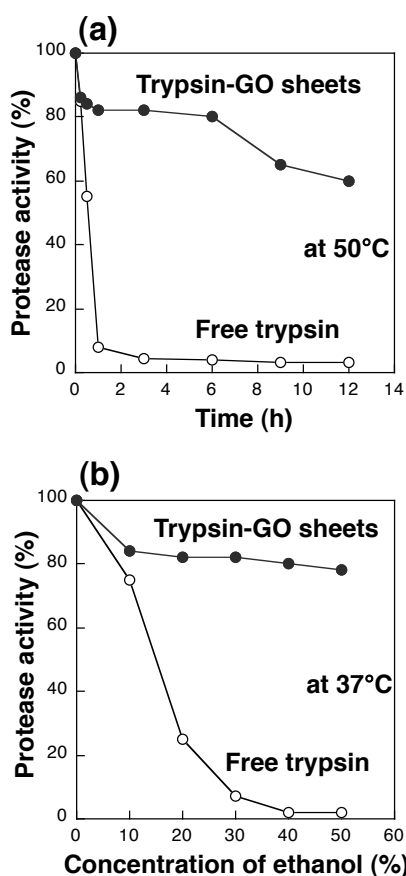


図5. フリートリプシンと固定化トリプシンの酵素活性維持能に及ぼす温度の影響(a)およびエタノールの影響(b).

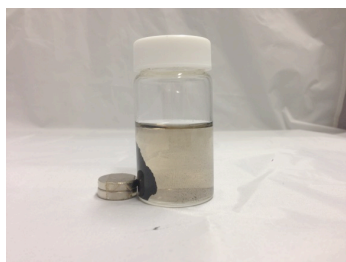


図6. 磁石に回収されたトリプシン固定化磁性GOナノシート

<引用文献>

- ① M. Sakata, A. Funatsu, S. Sonoda, T. Ogata, T. Tniguchi, Y. Matsumoto, Immobilization of trypsin on graphene oxide nanosheets for increased proteolytic stability, *Chemstry letters* Vol. 41(No.12), 2012,1625-1627
- ② M. Koinuma, C. Ogata, Y. Kamei, K. Hatakeyama, H. Tateishi, Y., Watanabe, T. Taniguchi, K. Gezuhara, S. Hayami, A. Funatsu, M. Sakata, Y. Kuwahara, S. Kurihara, Y. Matsumoto, Photochemical engineering of graphene oxide nanosheets, *Journal of Physical Chemistry C*, Vol. 116(No.37), 2012, 19822-19827

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① Masayo Sakata, Preparation of cross-linked γ -cyclodextrin particles for selective removal endotoxin, *Cellulose Communications*, Vol. 22 (No. 4), 2015, 191-195
- ② Masayo Sakata, Kasane Kimura, Koji Uezono, Masami Todokoro, γ -Cyclodextrin/polyurethane copolymer adsorbent for Selective Removal of Endotoxin from DNA Solution, *Journal of the Society of Japanese Women Scientists*, Vol. 15, No.1, 28-32, 2015 www.jstage.jst.go.jp/article/sjws/15/1/15_15004/_pdf
- ③ 坂田真砂代, 戸所正美, 包接を利用した新規エンドトキシン選択吸着剤の開発-ウレタン架橋シクロデキストリン微粒子, *高分子論文集*, Vol.71 (No.7), 2014, 283-292
DOI:10.1295/koron.71.283
- ④ 坂田真砂代, 環境汚染物質を捕まえろ -磁性化GOナノシート/ β -CD-ハイブリット材料, *化学*, Vol. 68, No.11, 2013, 59-60
- ⑤ Md. Ashaduzzaman, Kei Ishikura, Masayo Sakata, Masashi Kunitake, *Surface initiated ATRP: synthesis and*

characterization of functional polymers grafted on modified cellulose beads, International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy (8, Pt. 3), 2013, 243-248
yadda.icm.edu.pl/yadda/element/.../c/Ashaduzzman.pdf

- ⑥ Masayo Sakata, Koji Uezono, Kasane Kimura, Masami Todokoro, γ -Cyclodextrin-polyurethane copolymer adsorbent for selective removal of endotoxin from DNA solution, Analytical Biochemistry, Vol. 443, 2013, 41-45
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.08.010>

[学会発表] (計 16 件)

(1) 国際学会 (8 件)

- ① Towako Sakamoto, Ryosuke Harada, Masayo Sakata, Immobilization of gluco- amylase on cellulose supports by covalent binding for increased saccharification stability, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015.12.16, Honolulu, Hawaii, U.S.A
- ② Masayo Sakata, Kasane Kimura, Taku Matsuo, Masami Todokoro, Removal of endotoxin from DNA solution by cyclodextrin/urethane copolymer, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015.12.17, Honolulu, Hawaii, U.S.A
- ③ Risa Harada, Towako Sakamoto, Megumi Shimizu, Daisuke Nakamura, Yuki Maed, Masayo Sakata, Aminated cellulose nanofibers for removal of endotoxin from protein solution, 2015 Pusan-Gyeongnam/Kyushu-Seibu Joint Symposium on High Polymer (17th) and Fiber(15th), Proceeding pp.39-40, Dong-A University (Bumin Campus), 2015.11.13, Busan, Korea
- ④ Masayo Sakata, Kasane Kimura, Taku Matsuo, Masami Todokoro, Cyclodextrin polymer adsorbents for removal of endotoxin from bio-products, The 10th

SPSJ International Polymer Conference, 2014.12.3, つくば国際会議場, つくば市

- ⑤ Eri Ikegami, Yusuke Goto, Masayo Sakata, Chromatographic separation of DNA from bio-product solution by cellulose beads grafted with cationic linear polymer The 10th SPSJ International Polymer Conference, 2014.12.3, つくば国際会議場, つくば市

- ⑥ Masayo Sakata, Shohei Sonoda, Asami Funatsu, Ryosuke Harada, Preparation of magnetic graphene oxide nanosheets for enzyme immobilization support, 1st International Symposium on Graphene Oxide, 2014.3.13, 100th Anniversary Memorial Hall, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

- ⑦ Masayo Sakata, Shohei Sonoda, Asami Funatsu, Takaaki Taniguchi, Yasumichi Matsumoto, Preparation of trypsin-immobilized graphene oxide nanosheets and their application for increased proteolytic stability, 5th International Conference on Recent Progress in Graphene Research, 2013.9.9, Oookayama Campus, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

- ⑧ Shohei Sonoda, Aki Kuwahara, Asami Funatsu, Takaaki Taniguchi, Yasumichi Matsumoto, Masayo Sakata, Preparation of magnetic graphene oxide nanosheets for enzyme immobilization support, 5th International Conference on Recent Progress in Graphene Research, 2013.9.9, Oookayama Campus, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

(2) 国内学会 (8 件)

- ① 坂田 眞砂代、松尾 拓、戸所 正美、シクロデキストリンの包接作用を利用したエンドトキシン除去剤の開発、セルロース学会第 22 回年次大会、20150710、北海道大学学術交流会館

- ② 丸亀 俊昭、池上 瑛梨、坂田 眞砂代、ポリカチオングラフト化セルロース粒子の設計と DNA クロマト分離への応用、第 51 回化学関連支部合同九州大会、20150627、

北九州国際会議場

- ③ 原田 諒祐、園田 将平、坂田 眞砂代、トリプシン固定化酸化グラフェンナノシートの開発-トリプシン化学修飾法-、第63回高分子討論会、2014. 9. 25、長崎大学文教キャンパス
- ④ 松尾 拓、木村 かさね、坂田 眞砂代、LPS 選択除去のための酸化グラフェン固定化セルロースビーズ/γ-シクロデキストリン-ハイブリッド吸着剤の開発、第63回高分子討論会、2014. 9. 25、長崎大学文教キャンパス
- ⑤ 坂田 眞砂代、木村 かさね、松尾 拓、戸所 正美、包接能を利用するエンドトキシン選択分離剤の開発-ウレタン架橋シクロデキストリン微粒子-、第63回高分子討論会、2014. 9. 25、長崎大学文教キャンパス
- ⑥ 原田 諒祐、園田 将平、坂田 眞砂代、酵素修飾セルロースマイクロビーズの開発-トリプシンの化学修飾法、第51回化学関連支部合同九州大会、2016. 6. 28、北九州国際会議場
- ⑦ 坂田 眞砂代、園田将平、船津麻美、トリプシン修飾 GO ナノシートの酵素活性維持能、酸化グラフェンシンポジウム、2013. 8. 6、熊本大学黒髪キャンパス
- ⑧ 園田 将平、桑原 亜紀、船津 麻美、坂田 眞砂代、トリプシン修飾ナノシートの調製とその酵素活性維持能の評価、第62回高分子年次大会、2013. 5. 31、京都国際会議館

[図書] (計1件)

- ① 坂田 眞砂代、田崎裕人(編)、技術情報協会 出版、吸着・分離材料の設計、モジュール化と新しい応用 第7章第17節 エンドトキシンの選択的除去に求められる吸着材料、2015、503-510

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://chem.chem.kumamoto-u.ac.jp/~poly>

mers/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 眞砂代 (SAKATA, MASAYO)
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：60187391

(2) 連携研究者

谷口 貴章 (TANIGUCHI, TAKAAKI)
熊本大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：50583415