

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420833

研究課題名(和文) バイラメラ空間内脱水酵素反応を利用した炭酸カルシウム中空ナノ粒子の気泡塔合成

研究課題名(英文) Synthesis of hollow calcium carbonate nano-particles in a bubble column using carbonic anhydrase reaction in a bilamellar system

研究代表者

吉本 誠 (Yoshimoto, Makoto)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80322246

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)：負に帯電させたリン脂質二分子膜ベシクル(リポソーム)の表面に炭酸脱水酵素分子を共有結合させた。これを異なる脂質二分子膜で被覆したバイラメラリポソームを調製した。リポソーム膜上の二酸化炭素水和反応と脂質膜に吸着させたカルシウムにより、二酸化炭素飽和水を用いた炭酸カルシウム生成反応を促進した。さらに、二酸化炭素含有ガスを連続供給した気液接触反応器(エアリフト型気泡塔)にリポソーム系酵素を触媒として懸濁することにより、炭酸カルシウム粒子を生成させるプロセスを構築した。

研究成果の概要(英文)：The carbonic anhydrase molecules were covalently conjugated to the negatively charged surface of phospholipid bilayer vesicles (liposomes). The liposomes were covered with different lipid bilayers to form the bilamellar liposomes. The formation of calcium carbonate was enhanced by the membrane-adsorbed calcium and the carbonic anhydrase-catalyzed hydration of carbon dioxide on the surface of liposomes with a carbon dioxide-saturated water solution. Furthermore, the process for the formation of calcium carbonate particles was developed by using the liposomal enzymes as catalysts in the gas-liquid contacting reactor (airlift bubble column) which was operated by continuously introducing carbon dioxide-containing gas.

研究分野：生物反応工学

キーワード：生体材料 ナノ材料 バイオリアクター 酵素反応 生物・生体工学

1. 研究開始当初の背景

中空炭酸カルシウム粒子がもつ低密度性、高比表面積等の特性は、炭酸カルシウムを基盤とする各種材料の機能化に有用である。二酸化炭素ガスを原料として、常温・常圧下で形態制御された炭酸カルシウム微粒子を調製できれば、医薬・化粧品関連物質の担体等として有用な材料が省エネルギー的に得られる。一連の炭酸カルシウム粒子生成反応過程において、二酸化炭素の水和反応が律速となる。すなわち、中空炭酸カルシウム微粒子を得るためには、この律速過程をナノ構造制御された反応場において促進する必要がある。脂質二分子膜小胞体(リポソーム)には、脂質膜界面や内水相に液本体とは性質が著しく異なる反応場を形成させることができる。また、リポソーム系では気液流動場等の機械的ストレス負荷条件下において、酵素の構造と活性が安定化されることが知られている。バイオミネラリゼーション反応において有用な炭酸脱水酵素 (CAB) の触媒活性を構造制御されたリポソーム系において発現させることにより、二酸化炭素ガスを用いる高効率な中空微粒子合成プロセスの構築が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、形態制御された炭酸カルシウム微粒子の高効率合成を目的として、同心円状に形成させた二層の脂質ラメラ(バイラメラ)間にカルシウムイオンを閉じ込めて炭酸イオンと反応させる。液本体に供給された二酸化炭素からの炭酸イオンの生成は、バイラメラ系に固定化した CAB により触媒する。粒子合成反応を高効率化するために、外部循環式エアリフト型気泡塔により二酸化炭素含有ガスを反応系に連続供給する。気泡塔内で発生する気液流動により、最外層脂質ラメラの構造変化を誘導して、CAB の触媒活性を制御する。このために、(1)CAB とカルシウムイオンを安定に保持するバイラメラ構造の調製、(2)粒子生成条件の制御および(3)気泡塔バイオリクターを利用する粒子合成プロセスの開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 炭酸脱水酵素 (CAB) を共有結合させたリポソームの調製

CAB 分子のアミノ基と共有結合する部位をもつ脂質 15 mol%、双性脂質 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC、35 mol%)、カルシウムイオンと結合する負電荷脂質 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG、20 mol%) および脂質膜の物理的強度を増大させる Cholesterol (CH、30 mol%) から形成されるリポソームを 5.0 mM MES 緩衝液 (pH 5.5) 中で形成させた。POPG と CH を含有しないリポソームも同様に調製した。凍結 (7 min)・融解 (7 min) 操

作を 7 サイクル繰り返した後、押し出し法によりリポソーム径を調整した。このリポソームと CAB を溶解させた 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 7.4) を混合して、25 °C で 3 h 静置した。この操作により、CAB 分子がリポソーム膜中の脂質と共有結合する。リポソームに結合せず、遊離状態で存在する CAB はゲルクロマトグラフィー (Sephacrose 4B カラムを使用) によりリポソームから分離除去した。リポソームの平均水和直径と粒子径分布は動的光散乱 (DLS) 法により評価した。リポソームに固定化された CAB の酵素活性は p-nitrophenyl acetate (p-NA) を基質として評価した。さらに、Tris 溶液中、CaCl₂ 共存下において二酸化炭素飽和水と混合した際の炭酸カルシウム生成による濁度 (波長 600 nm、OD₆₀₀) の経時変化に基づいて CAB の活性を評価した。

(2) 荷電リポソームとカルシウムイオンの相互作用の評価

CAB 固定化リポソーム ([lipid]_{overall} = 1.0 mM) と同体積の 200 mM CaCl₂ 溶液を混合後、12 h 静置してリポソーム表面にカルシウムを吸着させた。脂質膜と種々の濃度のカルシウム間の相互作用を DLS 法による粒子径分布と濁度 (波長 600 nm、OD₆₀₀) の経時変化に基づいて評価した。

(3) CAB とカルシウムを閉じ込めたバイオリポソームの調製と炭酸カルシウム粒子生成反応

CAB とカルシウムが脂質膜表面に複合化されたリポソームの懸濁液を用いて、POPC のみから形成される乾燥薄膜を水和することにより、最外層に POPC 膜をもつバイラメラリポソームを調製した。この際、水和するリポソーム懸濁液中の脂質濃度、リポソーム径を考慮して、バイラメラ化に用いる POPC 量を決定した。液本体中に存在するカルシウムイオンは、再生セルロース膜チューブを用いた透析法によりバイラメラリポソームから分離除去した。この透析操作には、50 mM Tris 緩衝液 (pH 9.0) を用いた。バイラメラリポソーム懸濁液と二酸化炭素を飽和させた水を混合して、バイラメラリポソーム内部における炭酸カルシウムの生成を誘導した。二酸化炭素飽和水と混合・静置後の反応液に脂質膜をミセルに溶解させる 40 mM コール酸ナトリウムを添加して、DLS 測定を行った。

(4) せん断流中におけるリポソームの構造変化の評価

せん断流によるリポソーム膜の構造変化を評価するために、微小円管内 (内径 190、380 μm) に蛍光色素 5(6)-carboxyfluorescein (CF) を内包させたリポソームを循環させ、CF の漏出量の経時変化を追跡した。リポソームの脂質組成は、POPC:POPG:CH = 5:2:3 (モル比) とした。得られた漏出 CF 量

の経時変化を CF の物質収支に基づき解析して、CF の脂質膜透過係数 P_{CF} [m/s] を決定した。また、外部循環式エアリフト型気泡塔(ライザー径 8.0 mm、ダウンカマー径 4.8 mm、液相体積 7.0 mL) に CF 封入 POPC リポソームを懸濁させて、ガス空塔速度 U_g [m/s] を変化させたときの P_{CF} 値を同様に決定した。エアリフト型気泡塔では、液体せん断ストレスに対するリポソーム膜の応答性を増大させるために、液本体に 0.3 wt% Carboxymethylcellulose (CMC) を溶解させて、リポソーム懸濁液の粘度を増大させた。

(5) 炭酸カルシウム微粒子の気泡塔合成

ガラス製外部循環式エアリフト型気泡塔に $CaCl_2$ を溶解させた Tris 緩衝液を仕込み、25 °C において CO_2 を含有する窒素ガスをガス空塔速度 1.0-2.0 cm/s で通気した。CAB 固定化リポソーム懸濁液を添加した後、濁度変化に基づき粒子生成を評価した。

4. 研究成果

(1) リポソームに共有結合させた CAB の酵素活性

Fig. 1 にリポソームと CAB を共有結合させた際の反応液のゲルクロマトグラフィー溶出挙動を、脂質濃度と p-NA に対する CAB 活性に基づいて測定した結果を示す。脂質濃度は酵素法により測定している。CAB 活性には 2 つのピークがみられ、最初のピークは脂質濃度のピークとほぼ一致している。これより、酵素活性を保持した CAB 分子がリポソームに固定化されていることがわかる。また、リポソームに結合していない遊離 CAB はリポソームから効率よく分離されていることが確認できる。

Fig. 2 に CAB を共有結合させたリポソームを、カルシウムイオンを溶解させた Tris 溶液に懸濁させて、二酸化炭素ガスを通気し

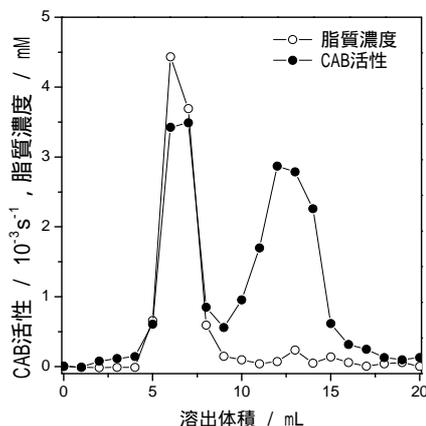


Fig. 1 ゲルクロマトグラフィーにおけるリポソーム/CAB 混合反応液の溶出挙動 (CAB 活性は、各フラクションを活性測定溶液中で 12 倍希釈して、p-nitrophenol 生成初速度に基づき決定した。)

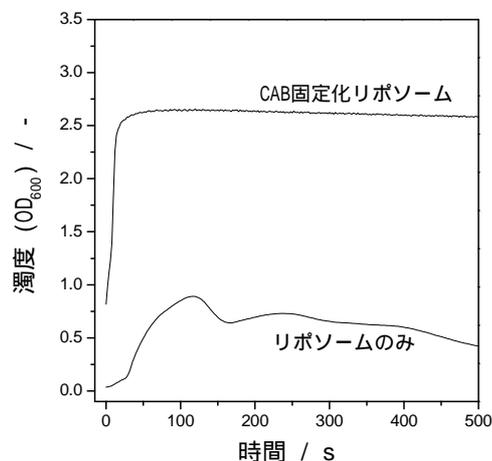


Fig. 2 CAB 固定化リポソームおよびリポソームのみの共存下における濁度の経時変化 (反応温度 30 °C、脂質濃度 50 μ M、初期塩化カルシウム濃度 46 mM)

た水と接触させたときの濁度 (OD_{600}) 変化を示す。リポソームの膜組成は、CAB に結合する脂質 15 mol%、POPC 85 mol% である。リポソーム懸濁液と二酸化炭素飽和水は混合前に 30 °C に保ち、反応中も 30 °C の一定に維持した。酵素を結合させていないリポソーム ($[Lipid]_{overall} = 50 \mu M$) の共存下では、濁度変化が小さい初期時間帯の後に濁度が増大して、その後減少傾向がみられる。これは炭酸カルシウム粒子が生成して、粒子が成長・沈殿する過程に対応すると考えられる。一方、同一脂質濃度において CAB 固定化リポソームを共存させた系では、誘導期がみられず、濁度の増加速度が著しく増大している。これらの結果より、リポソームに固定化された CAB が二酸化炭素の水和反応を触媒して、その結果炭酸カルシウム粒子の生成が促進されることがわかる。

(2) バイオラメラリポソームの特性と炭酸カルシウム生成反応への応用

POPG により負に帯電させたリポソーム懸濁液 ($[lipid]_{overall} = 0.5 \text{ mM}$) に種々の濃度の $CaCl_2$ を共存させたときの濁度の経時変化を測定した。リポソームが凝集すると濁度が増大する。 $[CaCl_2] = 60, 80 \text{ mM}$ では、20 min 後の濁度 (OD_{600} 値) は 0.4 以上に増大したことから、リポソームが凝集傾向にあることがわかる。一方、 $[CaCl_2] = 100, 200 \text{ mM}$ では、濁度の増加は 20 min 後に 0.15 以下に抑制された。特に 200 mM では濁度の増加は著しく抑制された。これは、高濃度のカルシウムイオン共存下では、リポソームの表面がカルシウムで飽和するためと考えられる。この結果に基づいて、高濃度のカルシウムイオン共存下でリポソームを凝集させずにバイラメラ化することができる。

CAB 固定化リポソームと CAB とカルシウ

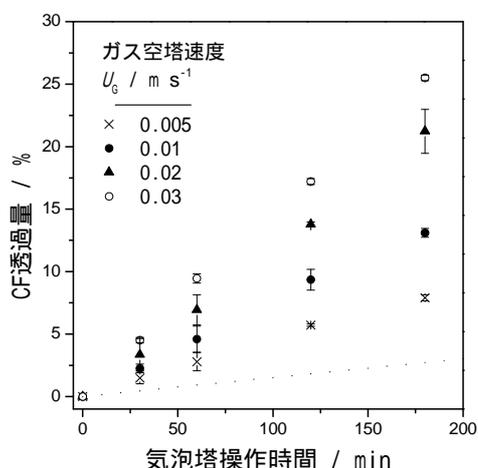


Fig. 5 外部循環式エアリフト型気泡塔に懸濁させたCF封入りポソーム（平均直径180 nm）からのCF透過量の経時変化（気泡塔には窒素ガスを通気した。気泡塔内の流体は40 °Cに維持した。）

応器においてリポソームに複合化させたCABが二酸化炭素の水和反応を触媒することを示す。さらに、エアリフト型気泡塔が二酸化炭素ガスを原料とした炭酸カルシウムの合成反応場として有用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7件）

M. Yoshimoto, J. Yamada, M. Baba and P. Walde, Enhanced heat stability of α -chymotrypsin through single-enzyme confinement in attoliter liposomes, *ChemBioChem*, DOI: 10.1002/cbic.201600150, 査読有

M. Yoshimoto, R. Kozono, N. Tsubomura, Liposomes as chaperone mimics with controllable affinity toward heat-denatured formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, *Langmuir*, **31**, 762-770 (2015). 査読有

M. Yoshimoto, M. Okamoto, K. Ujihashi, T. Okita, Selective oxidation of D-amino acids catalyzed by oligolamellar liposomes intercalated with D-amino acid oxidase. *Langmuir*, **30**, 6180-6186 (2014). 査読有

M. Yoshimoto and M. Higa, A kinetic analysis of catalytic production of oxygen in catalase-containing liposome dispersions for controlled transfer of oxygen in a bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **89**, 1388-1395 (2014). 査読有

T. Natsume and M. Yoshimoto, Mechano-sensitive liposomes as artificial chaperones for shear-driven acceleration of enzyme-catalyzed reaction. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 3671-3679 (2014). 査読有

M. Yoshimoto and Y. Todaka, Phase transition-induced rapid permeabilization of liposome membranes composed of milk-sphingomyelin. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **116**, 226-231 (2014). 査読有

T. Natsume and M. Yoshimoto, A method to estimate the average shear rate in a bubble column using liposomes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **52**, 18498-18502 (2013). 査読有

〔学会発表〕（計19件）

吉本誠、山田純、リン脂質ベシクルの微小液滴内に隔離された酵素一分子の特性と応用、2015.9.9、化学工学会第47回秋季大会、北海道大学（北海道札幌市）

吉本誠、岡本真和、宇治橋康太、沖田敬之、脂質膜の透過選択性と酵素安定化機能を利用するリポソーム系 D-アミノ酸化反応、膜シンポジウム 2014、2014.11.26、神戸大学（兵庫県神戸市）

T. Natsume, M. Yoshimoto and N. Katsumi, Estimation of the shear rate in airlift and normal bubble columns on the basis of shear-dependent permeability of liposome membranes, 2nd Int. Symp. Multiscale Multiphase Process Eng. (MMPE), 2014.9.25, Hamburg (Germany) 小園遼平、吉本誠、蟻酸脱水素酵素の熱安定性に及ぼす共存脂質二分子膜の疎水鎖特性と電荷の影響、化学工学会第46回秋季大会、2014.9.18、九州大学（福岡県福岡市）

夏目友誉、吉本誠、リポソームを用いる微小円管内せん断流中のグルコース酸化酵素の活性化、化学工学会第79年会、2014.3.20、岐阜大学（岐阜県岐阜市）

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