

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620124

研究課題名(和文) クラウディング・ナノコンパートメントの創製とナノリアクターとしての開発

研究課題名(英文) Development of novel nanoreactor system utilizing molecularly crowded nano-compartments

研究代表者

岸村 顕広 (Akihiro, Kishimura)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70422326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水中で簡便に作製でき、サイズがサブミクロン領域で制御可能、かつ、外空間と物質のやり取りができる高分子ベシクルPICsomeを基盤材料とし、内部に分子クラウディング環境を作り出しうるナノスケールのコンパートメントの開発を進めた。その結果、ナノコンパートメント内に酵素だけでなく、クラウディング剤を封じ込めたナノリアクターを開発することに成功した。さらに、ナノコンパートメント特有の酵素安定化効果や、クラウディング剤封入に基づく低温での保存安定性などの効果を見出し、酵素ナノリアクターの応用範囲の拡大を可能にする成果を上げた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we tried to develop novel type of nano-reactors to enhance enzyme properties, such as activity, life-time, stability, and so on. For this purpose, we exploited our original nano-compartments, PICsomes, which can be prepared in the aqueous media and encapsulate proteins inside based on a moderate loading method. Firstly, we succeeded in encapsulation of enzymes together with specific amount of macromolecular crowding reagents, dextrans. Furthermore, we found the stability enhancement of enzymes after encapsulation into nano-compartments. Also, enzymatic activity was preserved even after freezing of enzymatic nano-reactors, when macromolecular crowding reagents were co-encapsulated. Thus, we demonstrated potential utility of molecularly crowded nano-compartments for developing advanced and practically useful enzymatic nano-reactors.

研究分野：超分子・高分子化学、有機機能材料学

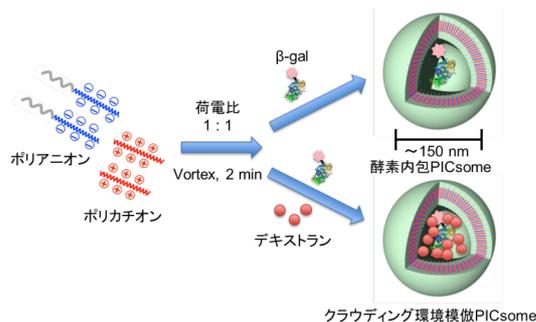
キーワード：ポリイオンコンプレックス ベシクル 酵素 ナノリアクター ナノコンパートメント タンパク質デリバリー 分子クラウディング

1. 研究開始当初の背景

生物学の進歩に伴い、生命現象を分子レベルで理解する手法が発達してきたが、実環境は非常に複雑な分子夾雑系であり、試験管レベルでは行わないような濃厚環境下で、精緻かつ選択性の高い化学反応が行われている。また、反応場が区画化(コンパートメント化)されている点も特徴である。特に、細胞内ではサブミクロンスケールで区画化された濃厚環境で、生体物質の振る舞いを考える場合、いわゆる『分子クラウディング』効果と閉じ込められた空間の効果、即ち、『コンファインメント』効果、の双方を考慮する必要がある。しかしながら、これまで、双方の効果を工学的視点で材料開発に取り入れ、いわゆる酵素ナノリアクターとして活用した例はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、水中で簡単に作製でき、サイズがサブミクロン領域で制御可能、かつ、外空間と物質のやり取りができる高分子ベシクル PICsome を基盤材料とし、内部に分子クラウディング環境を作り出しうるナノスケールのコンパートメントとしての開発を進めた。特に、内部に酵素を封入した PICsome に注目し、クラウディング条件に導いたナノコンパートメント内部で種々の酵素反応を行い、最終的に酵素の活性向上や長寿命化を実現する分子クラウディングナノリアクターの創製法の確立を目的とした(図1)。



3. 研究の方法

[ポリマー合成] PICsome を構成するポリアニオンとして、ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 (PEG-PAsp) を既報に従い合成した。ポリカチオンとしては市販の Poly-L-Lysine (PLL) を用いた(図2)。PEG-PAsp の荷電連鎖長は、¹H NMR により求め、重合度 70 であることを確認した。また、いずれのポリマーもサイズ排除クロマ

トグラフィー (SEC) 測定により単峰性を持つことを確認した。

[PICsome 作製] 各ポリマーを 50 mM リン酸バッファー (pH7.4) に溶かし、1 mg/ml に調製した後、荷電比が 1:1 となるように、2 分間ボルテックスミキサーにより攪拌混合することで PICsome を作製した。1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) を架橋剤として用い、PIC 層のアミド結合によって架橋を行い、残ったポリマーを限外ろ過によって精製した。動的光散乱法 (DLS) と透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、粒径と形態の評価を行った。

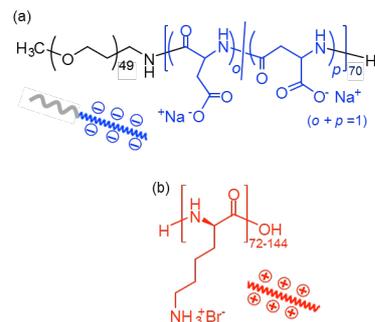


図 2. PICsome 作製用ポリマー。(a) PEG-PAsp、(b) PLL

[酵素封入] PICsome への酵素封入は、酵素へのダメージを最小限にするため、上述の通りにポリマー溶液を混合した後、攪拌終了 5 秒前に酵素溶液を加えることで行った。EDC 架橋後に精製し、DLS、TEM の測定を行った。また、ローダミン標識した β -gal (Rho- β -gal) を用い、内包効率を算出した。

[クラウディング剤内包 PICsome の作製] Alexa-Fluor 350 で蛍光標識したデキストラン溶液 (分子量 60k, Ale-Dex; デキストラン終濃度 : 13 mg/mL) を PEG-PAsp 溶液と混合した後、1-2. と同様に荷電比 1:1 となるように PLL 溶液を加えて攪拌混合を行い、架橋、精製を行った。

[酵素・クラウディング剤内包 PICsome の作製] 同様にデキストラン溶液と PEG-PAsp 溶液を混合し、PLL 溶液を加えた後、酵素溶液を加え、架橋、精製を行った。

[酵素活性評価] Rho- β -gal の基質として *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を使用した。Rho- β -gal の加水分解反応によって生成した生成物の吸光度変化から初速度を算出し、ミカエリス・メンテン型の反応機構を仮定した解析 (Lineweaver-Burk プロット) から酵素反応のパラメータを算出した。

4. 研究成果

[PICsome 作製と酵素、クラウディング剤封入] 上述の手法を用いることで、粒径約 160 nm のベシクルの形成が確認できた。また、Rho-β-gal を用い、その蛍光強度から算出した仕込みに対する内包効率率は約 0.6 %であった。さらに、SEC 分析から、精製後に Rho-β-gal が除去できていることも確認できた。以下、得られた酵素ナノリアクターを β-gal@PICsome と呼ぶことにする。一方で、デキストランを封入した PICsome について、酵素内包 PICsome と同程度の粒子径を持つベシクルの形成が確認できた(Dex@PICsome)。次に、酵素とクラウディング剤であるデキストランを同時封入させた場合、β-gal@PICsome 比較して粒度分布が広がっているが、中心粒径は重なっており、同程度の粒子径を持つベシクルの形成が確認できた (β-gal/Dex@PICsome; 図 3)。また、標識した蛍光基の定量により、Dex と β-gal が同時に封入されており、そのモル比が β-gal:Dex ~ 1:350 となることがわかった。

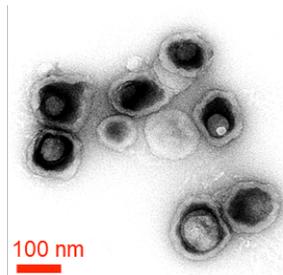


図 3. β-gal/Dex@PICsome の TEM 画像

[PICsome 封入によるコンパートメント化の効果] β-gal の PICsome 封入に伴うコンパートメント化の効果を、求めた酵素反応のパラメータから比較した (表 1)。 k_{cat} は酵素の回転数、 K_m は酵素と基質の親和性、 k_{cat}/K_m は酵素の触媒効率を示しており、コンパートメント化によって k_{cat}/K_m に大きな変化はなく、コンパートメントの有無による酵素活性への影響は認められなかった。一方で、37 °C で

表 1. PICsome 内包と酵素反応の活性

	k_{cat} (/s)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (/M · s)
β-gal	151±21	0.51±0.03	(2.87±0.35)×10 ⁵
β-gal@PICsome	70.0±14.8	0.33±0.03	(2.12±0.40)×10 ⁵

24 時間保存したサンプルについては、β-gal@PICsome のみ顕著な活性低下抑制効果が示された。これは、酵素濃度が PICsome 内

では一定に保たれ、希釈されないコンパートメント化の効果によると考えられた。

[Dex-酵素同時封入の効果]

次に、デキストランを酵素と同時封入させた条件で評価を行ったところ、37 °C での安定性向上のみならず、-20 °C で 24 時間保存した場合にも活性低下を抑制可能であることを見出した。これは、PICsome 内部で凍結が起こりにくいことが原因と考えられた。このように、PICsome 内に酵素を孤立させ、さらにクラウディング剤のような親水的で非特異吸着しにくい高分子を共存させることで、PICsome 型酵素ナノリアクターの有用性をさらに高めることができた。

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 3 件)

- ① Sayan Chuanoi, Yasutaka Anraku, Mao Hori, *Akihiro Kishimura, *Kazunori Kataoka, Fabrication of polyion complex vesicles with enhanced salt and temperature resistance and their potential applications as enzymatic nanoreactors. *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 2389–2397. (DOI: 10.1021/bm500127g) 査読有
- ② *Horacio Cabral, Kanjiro Miyata, *Akihiro Kishimura, Nanodevices for studying nano-pathophysiology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *74*, 35–52. (DOI: 10.1016/j.addr.2014.06.003) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックス型透過膜を有する中空カプセル PICsome の開発と DDS への応用、日本膜学会第 36 年会、2014 年 5 月 13 日、早稲田大学 (西早稲田キャンパス)、東京。
- ② 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックスを用いた水中での簡便なポリマーナノ構造形成と生体材料応用、第 86 回千葉地域活動高分子研究交流講演会、2014 年 6 月 10 日、出光会館、市原市、千葉。
- ③ Akihiro Kishimura, Development of Polyion Complex Vesicles “PICsomes” with Semipermeable Properties As a Novel Platform for Nano-medicine, The 5th International Conference on the Development of Biomedical Engineering in

Vietnam, International University, Ho Chi Minh City, Vietnam, June 17, 2014.

- ④ 坂村有紀、森 健、片山佳樹、岸村顕広、クラウドディング環境を生かした酵素ナノリアクターの創製, 第24回バイオ・高分子シンポジウム, 2014年7月24日, 東京都目黒区(東京工業大学大岡山キャンパス)
- ⑤ 岸村 顕広、高分子中空ナノカプセルPICsomeを用いた新しいDDSのアプローチ、第30回日本 DDS 学会学術集会、2014年7月30日、慶応義塾大学(芝共立キャンパス)、東京。
- ⑥ 岸村 顕広、物性制御可能なナノカプセルの開発と新しい生理学の可能性、第二回生体分子サイエンスセミナー、2014年9月2日、すずかけ台ホール、東京工業大学、東京。
- ⑦ Yuki Sakamura, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama and Akihiro Kishimura, Development of nanoreactor by using artificial intracellular environment, The 15th IUMRS International Conference in Asia, Fukuoka University, Fukuoka, Japan, August 26, 2014.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

九州大学大学院工学研究院 応用化学部門分子教室(片山研) :

<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~katayama/>

分子システム科学センター (CMS)

<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~cms/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸村 顕広 (KISHIMURA, Akihiro)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号 : 70422326