

称号及び氏名	博士（工学） 河村 暁文
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 31 日
論文名	「Study on Enzyme-Incorporated Self-Assembled Bionano-Reactor through Electrostatic Interactions in Aqueous Medium (水溶液中における静電相互作用により形成される酵素内包自己集合型バイオナノリアクターに関する研究)」
論文審査委員	主査 河野 健司 副査 小川 昭弥 副査 中澄 博行

論文要旨

近年、超分子化学の発展により、分子間相互作用による自己集合により形成される超分子集合体を用いた機能性材料に関する研究が注目を集めている。分子の自己組織化によりはじめて発揮される機能は数多く、例えば細胞は、脂質やタンパク質といった生体分子の自己組織化により形成され、生命活動を行うための様々な機能を発揮している。特に酵素や細胞は、生体内における生命を維持するための化学変換反応を非常にシンプルかつ巧妙に制御されたシステムで行っている。このような生体内での反応を人工系の超分子集合体により形成されるナノスケールの反応場を利用して模倣する試みが検討されている。

このような自己集合型ナノリアクターのひとつとして酵素内包ポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルが報告されている。PIC ミセルは水溶液中において反対荷電を有するブロック共重合体間の静電相互作用により形成されるコア-シェル構造を有するナノ微粒子である。PIC ミセルは反対荷電を有するブロック共重合体間だけでなく、イオン性連鎖を有するブロック共重合体に対して反対荷電を有するビニルポリマー、界面活性剤、酵素、DNA との間においても形成される。酵素内包 PIC ミセルはミセルのコア部に複数の酵素分子を内包しており、コアがポリエチレングリコール (PEG) で覆われたコア-シェル構造を有している。このような酵素内包 PIC ミセルのナノスコピックな酵素反応場による酵素反応の促進や酵素分子の基質特異性の変化の誘導、酵素反応のスイッチングなど、自己集合型バイオナノリアクターとして興味深い報告がなされている。

本論文では、自己集合型バイオナノリアクターとしての酵素内包 PIC ミセルについて、トリプシンを内包した PIC ミセルの形成、およびミセルコアへの架橋構造の導入によるトリプシンの酵素反応への影響について詳細に検討した。さらに酵素内包 PIC ミセルの高次機能化を目的とし、主鎖に荷電性連鎖を有し側鎖に末端にアセタール基を有する PEG からなるくし型高分子電解質を設計、合成し、酵素内包 PIC ミセル形成およびその表層機能化について検討を行った。

本論文は 7 章からなる。

第 1 章は、本論文の緒言であり、研究の背景と目的および本論文の概要について述べた。

第 2 章では、PEG とポリカルボン酸ブロックを有する種々のアニオン性ブロック共重合体、PEG-block-poly(α , β -aspartic acid) (PEG-PAA), PEG-block-poly(glutamic acid) (PEG-PGA), PEG-block-poly(methacrylic acid) (PEG-PMA) とカチオン性酵素であるトリプシンとのコンプレックス形成によるトリプシンのアミダーゼ活性への影響について、基質に L-lysine-*p*-nitroanilide を用いて検討した。まず PEG-PAA とトリプシンのコンプレックス形成によるトリプシンのアミダーゼ活性への影響を検討したところ、コンプレックス形成により酵素反応速度の促進が確認され、PAA 連鎖の鎖長が長いほど大きな促進効果を示した。このトリプシン酵素反応の促進について、酵素反応の速度論的パラメーターを決定したところ、触媒速度定数の増加によるものであった。また、酵素活性の pH 依存性を検討したところ、コンプレックス形成によりトリプシン単体に比べて酵素活性を示す pH 領域が低 pH 領域側にシフトした。さらに、他のポリカルボン酸 PEG-PGA、PEG-PMA についても同様にコンプレックス形成による酵素反応速度の促進効果について検討したところ、すべてのブロック共重合体において酵素反応の促進が確認された。また、酵素反応の速度論的パラメーターを決定した結果、PEG-PGA は PEG-PAA と同様に触媒速度定数の増加に由来する酵素反応速度の増加が確認されたのに対し、PEG-PMA は触媒速度定数の増加とともに、活性化エネルギーの減少も確認された。また酵素反応速度の pH 依存性について検討したところ PEG-PGA はトリプシン単体に比べて酵素活性を示す pH 領域が低 pH 領域にシフトしたのに対して、PEG-PMA は pH 依存性に変化はなかった。以上の結果からトリプシン酵素反応の促進効果はトリプシンの触媒活性部位であるアスパラギン酸残基-ヒスチジン残基-セリン残基の三つ組触媒活性部位のヒスチジン残基のイミダゾリウムイオンをブロック共重合体のカルボン酸ブロックが安定化することによって引き起こされたものであることが示された。

第 3 章では、トリプシン内包 PIC ミセルのコア架橋による酵素の機能について詳細に検討した。トリプシン内包 PIC ミセルのコア架橋は、架橋剤であるグルタルアルデヒドを添加し生成した Schiff 塩基結合を NaBH_3CN を用いて還元アミノ化することにより行った。コア架橋前後の動的光散乱測定による粒径測定から、ミセルコア内でのみ架橋反応が進行していることを確認した。また、コア架橋トリプシン内包 PIC ミセルは高い保存安定性を示し、トリプシンの酵素反応の初期速度は 1 週間後においてもその活性を維持した。さらに、コア架橋トリプシン内包 PIC ミセルはトリプシン単体と比較して、酵素反応の至適温度が大幅に上昇し、タンパク変性剤である尿素への耐性も示した。コア架橋の導入によりトリプシンの触媒活性部位であるアスパラギン酸残基-ヒスチジン残基-セリン残基の三つ組残基の空間配置が維持されたことが示唆され、コア架橋の導入が酵素の安定化に非常に有用であることが示された。

第 4 章では、コア架橋によるトリプシン内包 PIC ミセルの温度安定性の増加を確認したことから、温度応答性ゲルへのコア架橋トリプシン内包 PIC ミセルの固定化、および温度応答性ゲルの相転移に反応した酵素反応のスイッチングについて検討した。代表的な温度応答性ゲルであるポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) ゲルにコア架橋トリプシン内包 PIC ミセルを物理的に固定化した。コア架橋トリプシン内包 PIC ミセルは膨潤状態においても PNIPAAm ゲルからの放出は確認されず PEG シェル層により効果的に PNIPAAm ゲルに固定化された。コア架橋トリプシン内包 PIC ミセルの固定化によっても PNIPAAm ゲルの相転移温度に変化はなく、またコア架橋トリプシン内包 PIC ミセルの酵素活性も変化しなかった。したがって、コア架橋トリプシン内包 PIC ミセルは PNIPAAm ゲルと相互作用することなく、お互いの機能を維持したままゲルに固定化できることを明らかにした。さらに、PNIPAAm ゲルの相転移によるゲルの膨潤度の変化に反応して、内包されたコア架橋トリプシン内包 PIC ミセルの酵素反応を制御できることを明らかにした。

第 5 章では、PIC ミセル形成に用いる高分子材料をこれまでの荷電性ブロック共重合体からくし型高分子電解質へと展開し、末端にアセタール基を有する PEG とポリアリルアミンからカチオン性くし型高分子電解質 PEG-graft-poly(allyl amine) (PEG-g-PAA) を合成し、アニオン性酵素であるグルコースオキシダーゼ (GOD) との PIC ミセル形成について検討した。PAA ホモポリマーと GOD との PIC 形成においては、水不溶性の沈殿が生じたのに対し、種々の PEG 含率の PEG-g-PAA と GOD との PIC 形成では沈殿は生じなかった。動的光散乱測定により、化学量論的混合比において PEG-g-PAA と GOD とのコンプレックスはコア-シェル構造を有している PIC ミセルであることが明らかとなった。さらに、GOD の基質であるグルコースは容易に PIC ミセル内に拡散することによりミセル内核の GOD 分子は酵素活性を示し、PIC ミセルへの内包によってもその活性を維持することを明らかにした。

第 6 章では、コア-シェル構造を有する GOD 内包 PIC ミセルの表層へのペルオキシダーゼ (HRP) の修飾について検討した。PIC ミセル構造を安定化するために、コアにグルタルアルデヒド、および NaBH_3CN を用いて架橋を導入した。コア架橋前後の動的光散乱測定による粒径測定から、コア内でのみ架橋反応が進行していることを確認した。

また光散乱測定から、架橋構造の導入により高イオン強度環境下においても安定にミセル構造を維持することを明らかにした。さらに、酸処理によるミセル表層のアセタール基のアルデヒド基への変換を 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene dihydrochloride を用いて確認した。アセタール基をアルデヒド基に変換した後、HRP を添加することによりミセル表層へ HRP の固定化を行った。DLS 測定の結果、HRP とミセル表層のアルデヒド基との反応の結果、コア架橋 GOD 内包 PIC ミセルに比べ大きな粒径を有する粒子が確認され、HRP を架橋点とした PIC ミセル凝集体の形成が示された。

第 7 章では、本論文で得られた結論の総括を行った。

審査結果の要旨

本論文では、種々の酵素と高分子電解質とのポリイオンコンプレックス形成によって生成する自己集合型バイオナノリアクターとしての酵素内包ポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルについて、その構造、物性、機能および高次機能化に関する研究結果をまとめたもので、次のような成果を得ている。

- (1) ポリエチレングリコールとポリカルボン酸からなる荷電性ブロック共重合体とトリプシンから形成される水溶性コンプレックスによる酵素活性の増大について、ブロック共重合体のポリカルボン酸連鎖がトリプシン反応中間体のイミダゾリウムイオンの安定化に寄与することによるものであることを明らかにした。
- (2) トリプシン内包 PIC ミセルのコア部に架橋構造を導入することにより、トリプシンの自己分解の抑制、酵素活性の安定化、酵素活性の至適温度の上昇および尿素耐性の向上が実現できることを明らかにした。
- (3) 温度応答性を示すポリ N-イソプロピルアミドゲルにトリプシン内包 PIC ミセルをゲル内部に物理的に固定化した。ゲル内部に固定化された PIC ミセルはゲルの温度応答性収縮挙動に影響を与えないこと、および、ゲルの温度応答性収縮によって PIC ミセルに内包されたトリプシンの酵素活性のスイッチングが可能であることを示した。
- (4) 主鎖にポリアリルアミン、グラフト鎖にポリエチレングリコールを有するくし型高分子電解質を合成し、アニオン性の酵素であるグルコースオキシダーゼとのコンプレックス形成により、コアにグルコースオキシダーゼを内包したコア-シェル構造を有する PIC ミセルの構築に成功した。
- (5) グルコースオキシダーゼ内包 PIC ミセルのコアに架橋を導入することにより高イオン強度環境下におけるミセル構造の安定化を達成した。また、ミセル表層にペルオキシダーゼを修飾することにより、酵素二段階反応システムの構築が可能であることを示した。

以上の諸成果は、自己集合型バイオナノリアクターとしての酵素内包 PIC ミセルに関して、その生成プロセス、特性、機能を解明し、その有用性を明らかにするものである。これらの成果は、固定化酵素、酵素デリバリー、診断、触媒などの酵素に関連する諸分野において有用な機能性ナノマテリアルの開発に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。