

# 超臨界流体を媒体とした酵素的合成における反応性制御

(東工大院・生命理工) 森 俊明

Toshiaki MORI

Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8501

Phone: 045-924-5782 / Fax: 045-924-5836 e-mail: tmori@bio.titech.ac.jp

## 1. 超臨界流体中での酵素反応の可逆的な制御

我々はこれまで、酵素の表面を脂質分子で覆って疎水化した脂質修飾酵素を作製し、極性の低い有機溶媒にも均一に溶解し、無水の有機溶媒中で加水分解の逆反応、例えば、エステル化、配糖化反応が効率よく進むことを明らかにしてきた。天然の未修飾酵素は有機溶媒中には溶けないので懸濁系で反応が行なわれてきたが、脂質修飾酵素では均一系なので反応速度は大きく向上した。しかし、クロロホルムなどの極性の有機溶媒中では、脂質修飾酵素と言えども失活することが多く、このことが一つの欠点でもあった。

### 超臨界フルオロホルム中での酵素反応

脂質修飾酵素は、有機溶媒と同じく超臨界流体中にも溶解することが期待できる。図1に37°C/60 atmでの超臨界フルオロホルム中で脂質修飾β-ガラクトシダーゼによるガラクトシル化反応の経時変化を示したが、その初速度はイソプロピルエーテル中に比べて20倍も加速された。天然の未修飾酵素を超臨界流体中に懸濁した場合には酵素が失活して反応は全く進行しなかった。脂質修飾酵素を用いた系では基質、酵素ともに均一に溶解しているため、物質移動が速くなった効果や溶媒和の変化などが原因として考えられる。超臨界流体中でのFT-IR スペクトル測定より、脂質修飾酵素のタンパク質部分の2次構造は天然のそれと同じであることが確かめられ、超臨界流体中でも酵素構造は変化していないと考えられる。

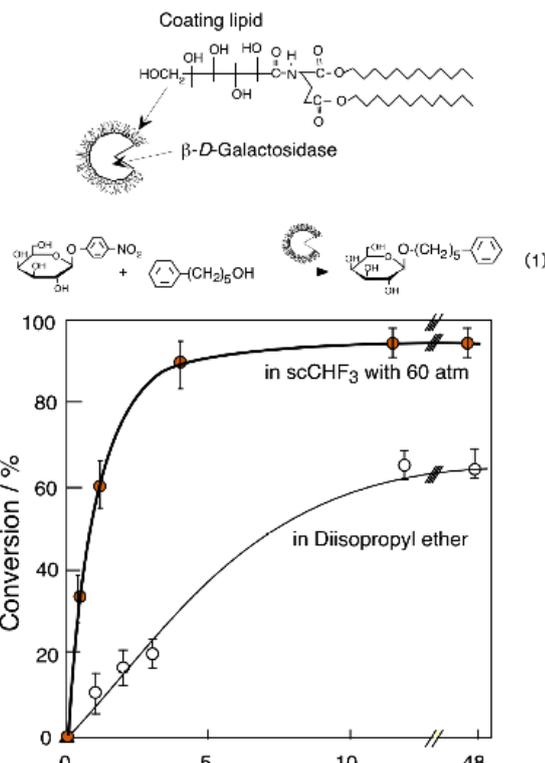


図1 脂質修飾β-D-galactosidase によるp-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (0.1 mM) の5-phenyl-1-pentanol (1 mM) への糖転移反応の経時変化 (37 °C)

### 超臨界フルオロホルム中での圧力や温度変化による反応制御

超臨界フルオロホルムは圧力や温度を変えると媒体の誘電率を連続的に大きく変化でき、反応媒体として興味深い。系内の温度を 37°C 一定にして圧力を変化させると、反応速度は、臨界圧力 48 atm 以上にすると反応性は 10 倍以上も向上し、100 atm を越えると速度は低下するベル型の曲線になった。しかし、反応収率は圧力を変化させても 90% とほぼ一定であった。圧力を 60 気圧に一定にし、温度を 20 から 60°C に変化させたときも、反応速度はベル型になったが、収率は常に高かった。

これらの温度や圧力の変化を誘電率の変化に置き換えてプロットしたのが図 2A である。誘電率が大きくなると反応速度が大きく変化するが収率は変化しない。種々の有機溶媒中で同じ配糖化反応を行い、有機溶媒の誘電率に対してプロットしたのが図 2B である。脂質修飾酵素は、極性の低い有機溶媒中では速度も収率も高いが、クロロホルムなどの極性溶媒中では急に活性が無くなり、失活してしまう。それに比べて超臨界フルオロホルム中で誘電率を変化させたときには酵素活性は可逆的に変化し、圧力や温度の少しの変化で酵素活性を可逆的に変えることができる。具体的には、20°C、50 気圧や 50°C、150 気圧では酵素を眠らせたまま保てるが、30°C、75 気圧にすると酵素活性をよみがえらせることもできる。すなわち、水溶液中では、pH や塩強度を変えて、有機溶媒中では溶媒を変えて（極性溶媒では失活するが）酵素反応の速度を変えていたのが、超臨界流体中では圧力を変えることにより簡単に可逆的に反応速度を on-off 制御できることになる。

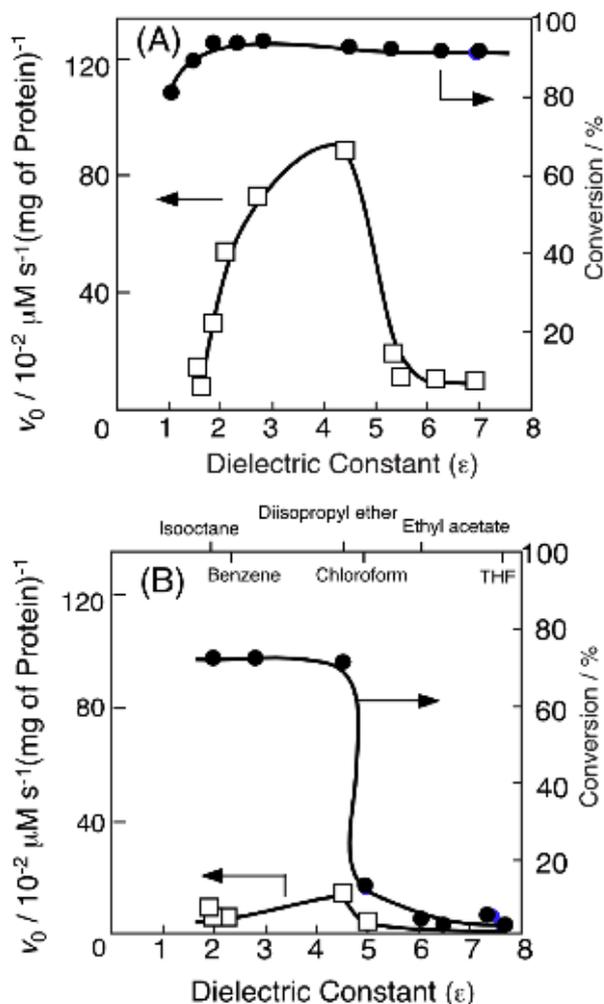


図 2 溶媒の誘電率 ( $\epsilon$ ) と、反応初速度及び反応収率との関係 (A) 超臨界フルオロホルムの圧力または温度を変えた場合。(B) 有機溶媒の種類を変えた場合。

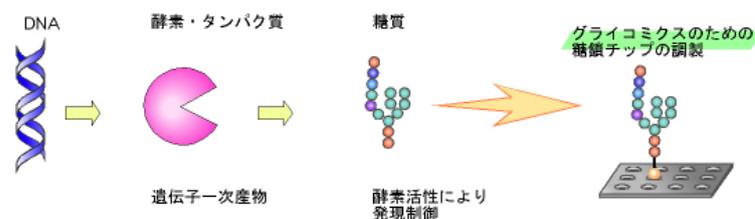
以上の例の他にもリパーゼによるトランスエステル化反応についても同様の制御ができることを明らかにしている。また、その場合、キラルな基質を用いることで、不斉選択的なエステル合成反応にも適用できる。

## 2. 糖鎖の高分子基板への固定化と分子間相互作用の解析

糖鎖は細胞表面において認識分子として機能するなど細胞の高次生命機能の発現に重要な役割を果たしている。しかしながら、糖の構造多様性のために分子レベルでの解明にはまだほど遠い。また、糖鎖を含む生体分子間の相互作用の際には、研究対象例がごく限られており、相互作用や分子認識の普遍的な理解が非常に困難である。糖鎖機能の解明のためには、網羅的な糖鎖ライブラリーの調製並びに相互作用の評価法が不可欠であり、第一段階としては、例えば酵素法による One-Pot 合成や糖鎖自動合成装置の開発のように、糖鎖を如何に自在に調製できるかが鍵になる。また、次の段階として解析の方法の簡便さと精密さを構築することである。生体分子の機能を解明するにあたり、例えば DNA チップ、タンパク質チップのような基板の上に生体分子を固定することにより種々の分子間相互作用について検討する方法が多くとられている。核酸・タンパク質のように固相合成法が確立されている場合には比較的容易に調製可能であるが、糖鎖チップに関しては重要視されつつも技術的には困難であった。本講演では超臨界流体を媒体に用いた固定化について述べる。

### 超臨界流体を用いた高分子基板表面への糖鎖高分子の固定化

細胞接着など糖鎖に関わる現象を詳細に調べるために現在は主にキャスト法で糖鎖を固定化したポリスチレン基板などが用いられている。しかし疎水性の基板に親水性の糖鎖を被覆するため剥離しやすいなどの問題があり、より安定な糖鎖固定化基板が求められている。当研究室では超臨界流体の基質溶解力と浸透力を利用して高分子基板表面を膨潤させ、フッ素系モノマー分子を浸透させた後に基板内部で重合させることによる表面改質に成功している。このときポリマーは基板のポリマーに絡まるように生成し、安定に表面に固定化されていると考えられる。本研究ではこれを応用し、超臨界流体中で膨潤させた高分子基板表面に 1) 酵素重合法により糖鎖を浸透させたり 2) 高分子量の糖鎖をそのまま浸透させることにより糖鎖を基板のポリマーに絡まるように表面に強く安定に固定し、その固定化量を制御することを検討した。この作製法ではポリマー表面にナノメートルレベルの深さで糖鎖を固定化でき、また減圧することで容易に媒体を



除去でき、人体に安全な組織再生デバイスや医療用具の作製にも応用できると期待される。

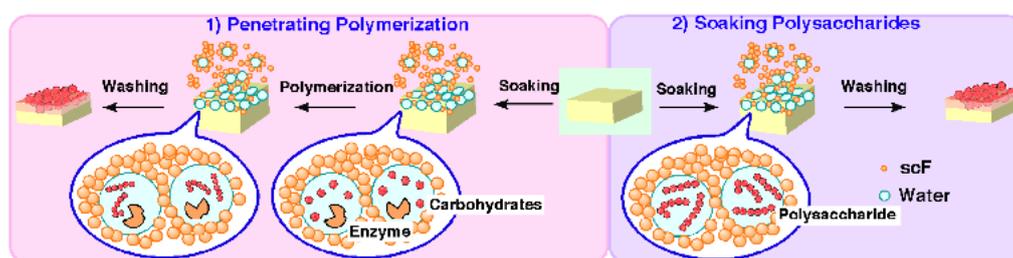


図 3 酵素重合（左）及び糖鎖浸透法（右）による高分子基板表面への糖鎖表層埋め込み

耐圧セルに酵素もしくは糖鎖水溶液を 5 vol% 加え、ステンレスの網を介して基板をおき、超臨界二酸化炭素またはフルオロホルムで満たして攪拌した。基板はポリスチレン、ポリエチレンを主に用いた。酵素反応溶液を用いた場合、酵素としてデキストランスクラーゼ、基質としてスクロースを用いた。糖鎖水溶液はデキストランとヒアルロン酸を用いた。それぞれの糖鎖について分子量の異なるものを用い、分子量の効果も合わせて検討した。超臨界流体中で糖鎖を浸透させた基板は接触角測定および XPS による表面元素組成分析によって表面の状態を評価したところ浸透重合と糖鎖の浸透のどちらで作製した基板表面においても未処理の基板に比べて 284 eV の C-C、C-H 結合ピークが減少し、286 eV の C-O 結合ピークが増加し、糖鎖が基板表面に固定化されたことが確認された(図 4)。条件の違いにより表面被覆率や浸透深さが異なり、表面被覆率は 20-40 %、浸透深さは 5-50 nm 程度の基板が得られた。フルオロホルムを用いたとき浸透重合の系とデキストランの浸透の系で固定化量の圧力依存性が異なり、フルオロホルムの密度や密度ゆらぎが圧力によって変化することによるエマルジョン形成効率や酵素の反応性の変化に起因するのではないかと考えられた。そこで水/超臨界流体エマルジョン中で酵素反応により生成した糖鎖の分子量を見積もり、また分子量の異なるデキストランを浸透させ固定化量の違いを調べることでフルオロホルムの物性と浸透重合、デキストランの浸透による固定化量の関係を明らかできた。またヒアルロン酸をポリエチレン基板に浸透させた結果、デキストランを浸透させたときと比べて比較的多くの糖鎖が深くまで固定化されていることがわかった。用いる糖鎖の種類や分子量が基板への浸透量に関与することが示唆された。

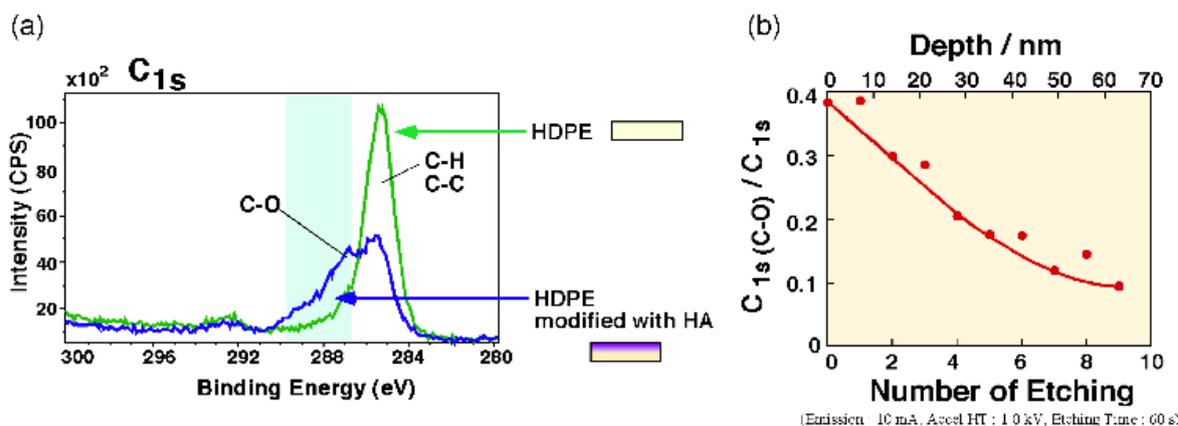


図 4 糖鎖浸透法により調製したヒアルロン酸導入ポリスチレン基板の表面分析 (a)代表的な ESCA の結果、(b)表面のエッチングにより見積もったヒアルロン酸浸透深さ

作製した基板に固定化されたヒアルロン酸が機能することを調べたところ、ヒアルロン酸結合タンパク質やヒアルロン酸認識性細胞が特異的に作用することも分かった。

また PTFE を固定化した基板にペプチド (RGD ペプチド 9mer) を浸透させたところ、PTFE 修飾基板に 10 nm 程度の厚さでペプチド鎖が固定化されていることがわかった。この基板上で細胞を培養した結果、配列特異的な接着挙動が観察された (Fig. 3)。

このことから安定な糖鎖、ペプチドなどの生体分子の固定化基板の新規な作製法を示すことができた。

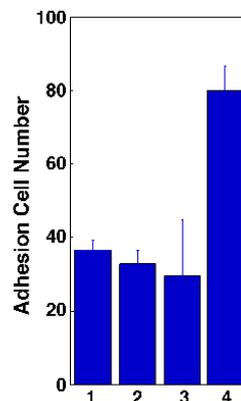


図 5 各種表面改質基板への接着細胞挙動

- 1:PTFE-penetrated substrate,
- 2:PTFE-penetrated substrate + RGD solution
- 3:RGD peptide penetrated substrate in scF + RGD (inhibitor)
- 4:RGD peptide penetrated substrate in scF

### 3. 超臨界流体エマルジョン中での酵素反応を用いた高分子基材の分解

前節で示したように、これまでにポリエステルなどのポリマー基板の表面に糖鎖、ペプチドなどの生体分子を導入できることを報告してきた。本研究では、固体基板 (ポリエステル基板等) 自体を基質として超臨界エマルジョン



図 6 ポリエステル基板の超臨界流体エマルジョン中のエステル加水分解酵素による分解反応

超臨界流体中でのエマルジョン形成と基板の膨潤・基板への浸透性を利用することで、大気圧下の水中での固液界面による加水分解反応よりも優れた反応場を提供できる可能性があると考え、超臨界エマルジョン中での高分子基板の酵素的分解の制御を検討した。(図6)

本実験では、基板としてポリカプロラクトン、酵素としてリパーゼ溶液 (lipase D, 10 mM Acetate Buffer, pH 5.6) を使用した。Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (平均分子量 40,000, Wako) をメルトプレスして約 30 mg のフィルムを作製した。反応前後の基板の質量を計測することで、分解率を算出し、1)大気圧下での加水分解、2)水/超臨界流体中での加水分解、3)水/超臨界流体中での溶出、をそれぞれ求めた。超臨界流体はフルオロホルム( $\text{CHF}_3$ ) を使用し、圧や加える水量による分解量の変化も検討した。また、GPC や ESI-MS を用いて分解産物の評価を行った。

また、同様の評価方法によって、酵素としてセルラーゼ (from *Aspergillus niger*, 0.2 M Acetate Buffer, pH 4.0) を用いて、セルロースフィルムの分解挙動についても検討した。

図7は横軸に反応時間、縦軸に反応前後のフィルムの重量変化を反応前のフィルムの重量で除した分解率をとっている。代表例として

12 MPaの超臨界フルオロホルム-リパーゼ溶液エマルジョン系によるPCLフィルムの分解

率、水中でのリパーゼ溶液による分解率、酵素なしの超臨界フルオロホルム-バッファエマルジョンでの溶出率を示している。水中での加水分解より水/超臨界流体中での加水分解の方が約4倍速いことを見いだした。これは、酵素が固体基質を分解するためには、触媒活性以外に、固体表面をいかに認識し、そこに結合するかが鍵になると考えられるため、超臨界流体中の特性である基板の膨潤と内部への酵素の浸透が大きく分解量の差に影響を与えていることが示唆された。

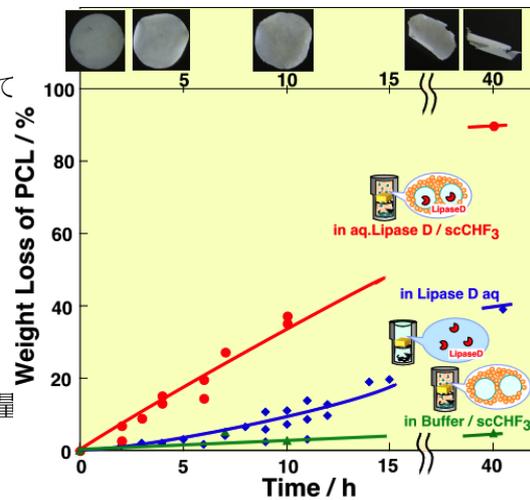


図7 各種条件下での分解反応に基づく重量減少量

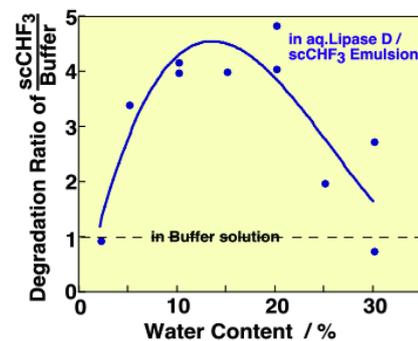


図8 酵素的分解における超臨界フルオロホルム中の水含量の効果

超臨界フルオロホルムの圧力の効果を検討したところ、9-13 MPaでピークをもつような鐘形の形状をとり、4倍程度速い分解量を示していることがわかった。エマルジョン中の水量の効果は10-20 wt%の水含量がエマルジョン形成効率が高いことが示唆された(図8)。

また、GPC や ESI-MS を用いて超臨界流体中での lipase D による分解産物の評価を行ったところ、PCL (平均分子量 40000) のフィルムは二量体まで分解が大部分で進むことが分かった (Fig. 3)。水中では、20 h 程度の分解では二量体まで結果が得られている。

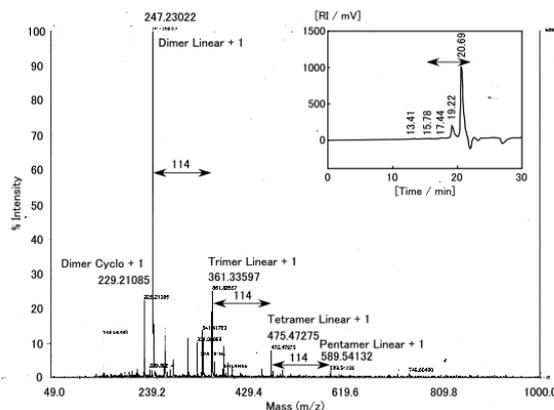


図9 酵素分解 21 時間後の PCL の GPC と ESI-MS の結果

#### 4. まとめ

超臨界流体を酵素反応溶媒に用いることにより反応活性の向上や不斉選択

性の向上などの利点があるばかりでなく、高分子基板の表面改質として超臨界流体も役立つことが分かりさらに固液界面の反応においても媒体として反応活性に及ぼす効果があることを明らかにした。通常の水や有機溶媒などの液体媒体ではなし得なかった機能をもつことより、生体触媒反応のみならず高分子合成反応など有機反応にも効果的な機能のあることが期待される。筆者は最近 1 分子計測による生体分子機能の解明を目指しているが、分子認識、相互作用の場として超臨界流体の効果にも興味を持っている。

#### 文献

1. 酵素反応の制御として、T. Mori et al., *Chem. Lett.*, 921 (1998); *Chem. Commun.*, 2215 (1998); *Chem. Commun.*, 2215-2216 (1998); *Chem. Lett.*, 921-922 (1998); *Chem. Commun.*, 1832-1833 (2001); *Jpn. J. Polymer Sci. Technol.*, **58**, 564-568 (2001); *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1188-1189 (2002)など。
2. 固体基板表面への機能性高分子の導入として、T. Mori, et al., *Macromolecules*, **39**, 604-608 (2006); *Biomacromolecules*, **8**, 2815-2820 (2007); *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **46**, 1577-1585 (2008); 森 俊明ら、特開2005-15778(2005)など。
3. 高分子調製基板としての評価法として、T. Mori, et al., *J. Am Chem. Soc.*, **126**, 2264-2265 (2004). *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14752-14757 (2004). *Biochemistry.*, **44**, 9456-9461 (2005)など。
4. 分子認識場としての超臨界流体として、T. Mori, et al., *Chem. Commun.*, 45-46 (2000)など。