

多孔質シリカ粒子上への酵素集積化と

バイオプロセスの応用

戸田 敬志・池田 丈・廣田 隆一・黒田 章夫
広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻

〒739-8530 東広島市鏡山 1-3-1

E-mail: ikedakeshi@hiroshima-u.ac.jp

Home Page: <http://home.hiroshima-u.ac.jp/akbio/>

有用物質の生産には酵素を担体に結合させた固定化酵素が広く利用されている。酵素を固定化することで、酵素と生成物の分離が容易になり、また、酵素を回収して再利用することができる。当研究室ではシリカ表面に強固に結合する性質を持つタンパク質「Si-tag」を発見し、Si-tag を利用したタンパク質固定化法・精製法の開発を進めてきた。本研究では、酵素と Si-tag を遺伝子工学的に融合することで、目的とする酵素を多孔質シリカ粒子上に固定化した。さらに、複数種の酵素を同時に固定化することで、多孔質シリカの有するナノ細孔内において酵素分子同士を近接化させれば、効率的な多段階バイオプロセスの実現が可能ではないかと予想し、その検証を試みた。

1. はじめに

酵素は、常温・常圧といった温和な条件下で化学反応を触媒する。また、基質特異性が高く、複雑な反応を効率的に触媒できるといった利点があり、バイオプロセスによる有用物質生産に利用されている。酵素による物質生産は環境負荷も小さいことから、従来の化学プロセスに変わる環境調和型のホワイト・バイオテクノロジーとして注目されている。

酵素を工業的な物質生産に利用する場合、酵素を不溶性の担体に固定化した固定化酵素が広く用いられている。酵素を固定化することで、酵素と生成物の分離が容易になり、また、酵素を回収して再利用することができる。

当研究室では、シリカ(SiO_2)表面に強固に結合するタンパク質「Si-tag」を発見した[1]。Si-tag は強い正電荷と柔軟な天然変性構造を有し、非共有結合でありながら非常に強くシリカ表面に結合する[2,3]。Si-tag を遺伝子工学的に融合することで、任意のタンパク質にシリカ結合能を付与することができる。この性質を利用して、Si-tag を接着分子として利用したシリカ・ガラス上へのタンパク質固定化法の開発を進めてきた[1,4]。これまでに、半導体であるシリコンデバイスと生体分子を融合したバイオセンサーの開発や[5-7]、シリカ粒子との親和性を利用した Si-tag 融合タンパク質のアフィ

ニティー精製法の開発を行い[8-10]、Si-tag を利用したタンパク質固定化法の有用性を実証してきた。

本研究では、Si-tag のシリカに対する高い親和性を利用して、Si-tag を融合した酵素を多孔質シリカ粒子上に固定化した。得られた固定化酵素について バイオプロセスにおける有用性を検討した。また、多孔質シリカの有するナノ細孔内に複数種の酵素を同時に固定化し、酵素同士を近接化させることで、効率的な多段階バイオプロセスの実現を試みた(図 1)。

2. 方法と結果

(1) Si-tag 融合酵素の作製と固定化

固定化のためのモデル酵素として好熱性細菌 *Thermus thermophilus* 由来の解糖系酵素群および乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)について、それぞれ Si-tag との融合タンパク質を発現するためのプラスミドを構築した。Si-tag 融合タンパク質を発現した大腸菌の菌体破砕液にシリカ粒子を添加して混合したところ、目的タンパク質はシリカ粒子上に固定化された。固定化時の pH・塩濃度・界面活性剤濃度などを最適化することで宿主である大腸菌由来のタンパク質の吸着を抑制し、精製操作を経ることなく、目的タンパク質を高純度に固定化することに成功した。

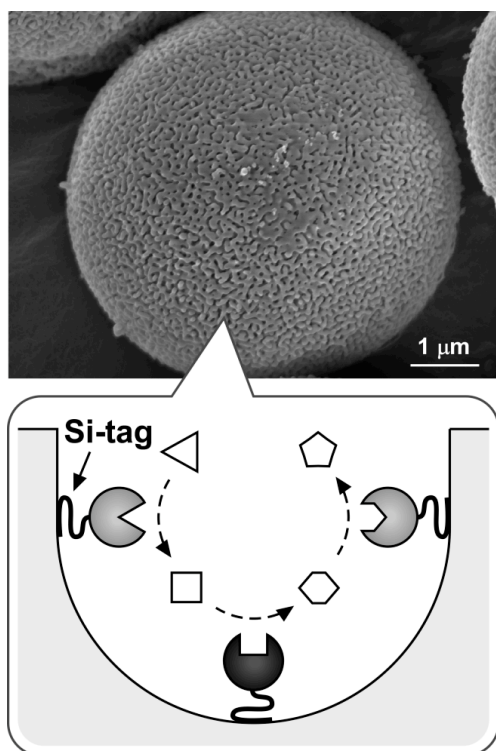


図 1. 多孔質シリカ粒子上への Si-tag 融合酵素の集積化の概念図。多段階の酵素を集積化することで連続反応がスムーズに起こり、反応効率が向上することが期待される。

また、固定化されたタンパク質の結合安定性について検討したところ、固定化された Si-tag 融合タンパク質は 100℃で熱処理しても解離せず、安定に粒子上に保持されることを確認した。一般的に酵素は固体表面上に固定化されることで熱安定性が向上することが知られているため、固定化された酵素の熱安定性についても現在確認中である。

(2) 固定化酵素の活性測定

得られた Si-tag 融合 LDH について未固定の状態およびシリカ粒子上に固定化された状態でそれぞれ活性測定を行ったところ、固定化に伴う活性低下はほとんど見られず、固定化後も高い触媒活性を維持していることが確認された。従来のタンパク質固定化法では、固定化の際のタンパク質分子の配向を制御できないため、タンパク質が本来の活性を発揮できず、固定化に伴い活性が低下するのに対し、Si-tag を用いたタンパク質固定化法では、目的タンパク質に融合した Si-tag が固体表面側を向くため、タンパク質分子の配向が揃い、高い活性を発揮できたと考えられた(図 1)。

また、連続する 2 段階の反応を触媒する酵素を同時

に固定化した場合は、別々に固定化した粒子を混合した場合よりも高い反応効率を示した。これは、予想通り連続反応の酵素同士が空間的に集積化・近接化されたことによって、生成物/基質の受け渡しがスムーズに起こり、反応効率が向上したと考えられた。

3. まとめと今後の展望

本研究により、Si-tag を利用することで精製操作等を経ることなく簡便かつ安定に酵素を多孔質シリカ上に固定化できることが示され、Si-tag を利用した固定化酵素の作製法の有用性が実証された。

また、連続する反応を触媒する複数の酵素を同時に固定化することで、酵素同士が空間的に集積化され予想通り反応効率が向上することが確認された。今回の結果は二段階の反応のみでの検証であったが、今後はより多段階の反応について反応効率の測定を行い、本手法の有効性についてさらなる検証を行う。さらに、実際に本手法を用いたバイオプロセスによって有用物質の生産を行うなど、実用化に向けてさらなる研究を進める。

参考文献

- [1] Taniguchi K, *et al.*: Biotechnol. Bioeng., 96, 1023-1029 (2007)
- [2] Ikeda T, & Kuroda A: Colloids Surf. B: Biointerfaces, 86, 359-363 (2011)
- [3] 池田 丈, 黒田章夫: バイオサイエンスとインダストリー, 70, 346-350 (2012)
- [4] Ikeda T, *et al.*: Anal. Biochem., 385, 132-137 (2009)
- [5] Fukuyama M, *et al.*: Jpn. J. Appl. Phys., 49, 04DL09 (2010)
- [6] Fukuyama M, *et al.*: Jpn. J. Appl. Phys., 50, 04DL07 (2011)
- [7] 池田 丈, *et al.*: 日本微生物生態学会誌, 26, 64-74 (2011)
- [8] Ikeda T, *et al.*: Protein Expr. Purif., 71, 91-95 (2010)
- [9] Ikeda T, *et al.*: Protein Expr. Purif., 77, 173-177 (2011)
- [10] 池田 丈, 黒田章夫: 化学工業, 63, 49-53 (2012)