

研究課題別評価

1 研究課題名:非水系でのナノ集合体と生体分子の融合による機能変換と制御

2 研究者氏名:後藤雅宏

グループメンバー:一瀬博文 (研究期間 平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月)

河嶋優美 (研究期間 平成 15 年 4 月～平成 16 年 3 月)

3 研究の狙い:

生体分子のほとんどは、水中で効率よく機能するように作られている。本研究では、このような生体分子に、非水媒体という新たな機能発現の場を与えることがねらいである。非水媒体中でナノ集合体を作り出す特異環境は、バルク水のそれと大きく異なるため、取り込まれた酵素やタンパク質、DNA といった生体分子が、制限されたナノ空間で特異な挙動を示すことを期待し研究を遂行した。

4 研究成果:

(1)ナノ集合体を利用した酵素の新機能発現

本研究では、種々の酵素をナノ分子集合体逆ミセル中に包括し、有機媒体中における生体触媒の利用へ向けた一連の研究を展開した。

ペルオキシダーゼやラッカーゼなどの酸化酵素は、種々の芳香族性環境汚染物質を酸化的に分解し、バイオレメディエーションへの利用が期待される。本研究では、ペルオキシダーゼが逆ミセル中で機能発現しうること、また、界面活性剤により被覆されたペルオキシダーゼが有機溶媒中で活性を示すことを明らかとした。

一方、ラッカーゼはペルオキシダーゼと同様に種々の化学物質の一電子酸化反応を触媒する。過酸化水素に依存的なペルオキシダーゼ反応とは異なり、ラッカーゼは分子状酸素を利用して酸化反応を触媒する点で特徴的である。また、耐熱性に優れたラッカーゼも自然界に見いだされており、酵素の安定性やコストの面からペルオキシダーゼよりも工業的利用価値が高い酵素である。本研究では、耐熱性に優れた担子菌ラッカーゼに着目して詳細な検討を行い、有機媒体中のビスフェノール分解システムの構築に成功した。

(2)ナノ集合体による変性タンパク質の再生技術

バイオテクノロジー技術の発展により、外来の遺伝子を別種の発現媒体(宿主)へ組換えることにより、目的タンパク質の発現を簡便に行うことが可能となったが、この異種タンパク質発現系においてしばしば問題とされるのが、不溶でかつ不活性なタンパク質凝集体、インクルージョンボディ(封入体)の蓄積である。

本研究では、ナノ集合体の逆ミセルが、この不活性な変性タンパク質の再生に有効であることを見いだした。逆ミセルはその大きさより、内水相にタンパク質を1分子しか可溶化することができない。つまり逆ミセルは、逆ミセル内部に変性タンパク質を個々隔離することができる。このことによって、活性回復時におけるタンパク質同士の相互作用を大幅に軽減させることに成功した。つまり、逆ミセルの閉ざされたナノ空間がタンパク質の自己再生能力を有効に引き出し、変性タンパク質の効率の良いリフォールディング場として機能することを見いだした。

(3)逆ミセルのナノ空間を利用した遺伝子診断法の開発

逆ミセルのナノ空間に取り込まれたDNAは、水中とは大きく異なるハイブリダイゼーション挙動をとることが明らかとなった。アニオン性の界面活性剤 AOT を用いて形成した逆ミセル中に、種々の遺伝子サンプル(20mer 程度)を取り込ませ、ハイブリダイゼーションを行った。その結果、変異(ミスマッチ部位)を有する遺伝子サンプルのハイブリダイゼーションが、逆ミセル中で大きく抑制さ

れることが示された。この性質を利用すると遺伝子サンプルのハイブリダイゼーション速度を測定することによって、遺伝子の変異の有無を検出することができる。

変異が、最末端にカ所見られる場合でも、ハイブリダイゼーションの速度は大きく抑制され(68%)、中心付近に変異がある場合、そのハイブリダイゼーション速度は、正常遺伝子のそれに比べて10分の1以下に低下した。これより、遺伝子の配列に変異がある場合、逆ミセルのナノ空間で起こる二重らせんの形成が著しく抑制されることが明らかとなった。

塩基の配列にも依るが、水相中で極めて低濃度(1 μ M以下)のDNAに対しては、二重らせんの形成が起こりにくい。しかしながら、逆ミセル中では、通常、水相の割合が1・2%であるため、DNAは、50・100倍程度に内殻水相に濃縮される。また、逆ミセルのナノ空間に遺伝子を取り込みそれぞれを隔離することによって、その二重らせん形成の速度を制御することが可能となる。実際に、ハイブリダイゼーションの速度は、温度、界面活性剤濃度、塩の種類とその濃度に大きく依存し、遺伝子変異の存在をナノ集合体中でのハイブリダイゼーション挙動を通して検出することに成功した。

5 自己評価:

酵素は高選択的・高効率な物質変換を常温・常圧条件下において可能とする生体触媒である。近時、遺伝子工学技術の発展により機能改変酵素の創出も可能となり、多岐にわたる分野で生体触媒の高度利用を目指した研究が展開されている。しかしながら、難水溶性物質の変換反応には非水溶媒(特に有機溶媒)を用いる必要がある。酵素反応を非水系に展開し、生体触媒を脂溶性・難水溶性物質の変換反応に利用する技術の開発は、今日の化学工業分野において最も重要な課題の一つである。本研究では、非水溶媒中に種々の酵素を可溶化し機能発現する手法を確立することができた。これによってこれまで非水溶媒中で使用できなかった様々な酵素の非水系での利用が可能となった。今後は、工業的に有用な反応あるいは環境汚染物質の分解への応用を目指したケーススタディが望まれる。

界面活性剤で形成させたナノ集合体を利用し、酵素やタンパク質、DNAといった生体分子を非水系の溶媒に可溶化すると、水中と大きく異なる様々な興味深い現象が観察された。本研究では、ナノ集合体を用いることによって、非水溶媒における複合酵素系の電荷リレー反応を世界ではじめて達成できた(J. Biosci. Bioeng 誌の表紙を飾る予定 2005年4月)。本研究を始める前は、単一の酵素反応のみが取り上げられていた。しかしながら本研究の大きな成果として、複数の酵素のリレー反応が非水溶媒中で起きることを明らかにした。今後の課題は、酵素の長期間における安定性であると考えられる。

また、ナノ集合体の閉ざされた空間がタンパク質の自己再生を促進することを明らかにした。現在は、本手法の一般性を検討中である。つまり、いかなるタンパク質の再生に有効であるかを明らかにする必要がある。

さらに、ナノ集合体中におけるDNAの特異現象を利用した遺伝子診断法を開発することに成功した。本手法は、遺伝子解析に必要な安価に短時間という特徴を有しており、現在、九大医学部(検査部)においてB型肝炎に関する検査を目的とした実用化が検討されている。

本研究では、全く専門の異なる農学出身のポスドクを雇用した。工学部の研究者では持ち得ない遺伝子操作に卓越した技術を有していたため非常に大きな研究の発展が見られた。まさに、異分野の研究者との交流の大切さを実感したプロジェクトでもあった。

6 研究総括の見解:

本研究は、ナノ集合体を用いて非水媒体中における生体分子の新しい機能変換・制御法が望めるということで採択された。これまで通常水の中で機能すると考えられてきた酵素やタンパク質といった生体分子に非水媒体という新たな機能発現の場を提供できたという意味で大きく評価できる。

研究開始時は、研究テーマの絞り込みが必要と感じられたが、研究の進展とともに研究の方向性が明確になり(1)非水系の酵素反応の確立、(2)変性タンパク質の再生技術(3)遺伝子診断への展開と集約された。程度の差こそあれ、それぞれそれなりの成果が得られている。今後の課題は、生体分子の機能をいかに人為的に制御できるかにあると思われる。これまで、生体分子は水相中で機能するものと考えられてきたが、ナノ集合体の孤立ナノ空間を利用することによって、非水媒体中における生体分子の新たな応用展開が期待される。なお、応用展開では研究の方向を集中し、手法・手段には必ずしもとらわれずに進める必要があり、その面での経験を得ることを望む。

7 主な論文等：

論文

1. Catalytic oxidation of o-phenylenediamine by cytochrome c encapsulated in reversed micelles *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 11, 955-959 (2001), T. Ono, K. Kawakami, M. Goto, S. Furusaki
2. Preparation and Catalytic Performance of Surfactant-Manganese Peroxidase-MnII Ternary Complex in Organic Media, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 329-332 (2001) S. Okazaki, M. Goto, S. Furusaki, H. Wariishi, H. Tanaka
3. Catalytic Performance of Lignine Peroxidase Alip-P3 in reversed Micelles *Biochemical Engineering J.*, Vol.8, No. 2, 129-134 (2001) J. Michizoe, S. Okazaki, M. Goto, S. Furusaki
4. Catalytic Activity of Laccase Hosted in Reversed Micelles *J. Bioscience and Bioeng.*, Vol.92, No.1, 67-71 (2001), J. Michizoe, M. Goto, S. Furusaki
5. Complex Formation of Cytochrome c with a Calixarene Carboxylic Acid Derivative: A Novel Solubilization Method for Biomolecules in Organic Media *Biomacromolecules*, Vol. 3, No. 3, 438-444 (2002), T. Oshima, M. Goto, S. Furusaki
6. Remarkably Enhanced Inhibitory Effects of Three-Component Hybrid Liposomes Including Sugar Surfactants on the Growth of Lung Carcinoma Cells *Chem. Pharm. Bull.*, 50(4), 563-565 (2002) R. Ueoka, Y. Matsumoto, S. Hirose, K. Goto, M. Goto, S. Furusaki
7. Enantioselective Polymer Prepared by Surface Imprinting Techniques *Anal. Chimica Acta*, Vol. 469, No.2, 173-181 (2002), K. Araki, M. Goto, S. Furusaki
8. Polyethylene Glycol-Lipase Complex That is Catalytically Active for Alcoholysis Reactions in Ionic Liquids *Biotechnology Letters*, 24, 1341-1345 (2002), T. Maruyama, S. Nagasawa, M. Goto
9. A Molecularly Imprinted Polymer that shows Enzymatic Activity *Biochem. Eng. J.* 14, 85-91 (2003), T. Eiichi, K. Uezu, M. Goto, S. Furusaki
10. Oxidation of Bisphenol A Catalysed by Laccase in Reversed Micelles in Organic Media *Enzy. Microb. Technol.*, 31, 227-232(2002) S. Okazaki, J. Michizoe, M. Goto, S. Furusaki, H. Wariishi, H. Tanaka
11. Enzymatic Synthesis of Sugar Amino Acid Esters in Organic Solvents *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 94, No. 4, 357-361(2002), T. Maruyama, S. Nagasawa, M. Goto
12. DNA Hybridization in Reverse Micelles and its Application to Mutation Detection *Analyst* 128(2), 161 - 165(2003), Lian-Chun Park, T. Maruyama, M. Goto
13. Hypotlycemic effect of surfactant-coated insulin solubilized in a novel (S/O/W) emulsion *Int. Pharm. Chem.* Vol. 252, 271-274 (2003), E. Toorisaka, N. Kamiya, H. Ono, M. Goto
14. Control of water content by reverse micellar solutions for peroxidase catalysis in a water-immiscible organic solvent *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 95, No. 4, 425-427(2003), J. Michizoe, T. Maruyama, M. Goto

15. Use of ionic liquids in a lipase-facilitated supported liquid membrane. *Biotechnol. Lett.* 25, 805-808, (2003), E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto
16. Discriminate surface molecular recognition sites on a microporous substrate: A new approach *Macromolecules*, 36 (12): 4472-4477 (2003), Han MN, Kane R, Goto M, Belfort G
17. Protein Refolding in Nanostructured Reversed Micelles Including a Molecular Chaperone *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 96, No. 3, 275-278(2003), M. Sakono, H. Ichinose, M. Goto
18. Liquid membrane transport of amino acids by a calyx[6]arene carboxylic acid derivative *J. Membrane Sci.*, Vol. 217, 87-97(2003), T. Oshima, K. Inoue, S. Furusaki, M. Goto
19. Simple detection of point mutations in DNA oligonucleotides using SYBR GreenI *Biotechnol. Lett.* 25, 1637-1641 (2003), T. Maruyama, T. Takata, N. Kamiya, M. Goto
20. Can lipases hydrolyze peptide bond ? *Enz. Microb. Technol.*, Vol. 32, 655-657(2003), T. Maruyama, M. Nakajima, M. Seki, M. Goto
21. Transport of Organic Acids through a Supported Liquid Membrane Driven by Lipase-Catalyzed Reactions *J. Biosci. Bioeng.*, 96(4), 370-374 (2003), E. Miyako, T. Mayuyama, N. Kamiya, M. Goto
22. Enzymatic degradation of p-chlorophenol in a two-phase flow microchannel system. *Lab. on a Chip*, 3, 315-319 (2003), T. Maruyama, J. Uchida, T. Ohkawa, M. Goto
23. Enantioselective transport of (S)-ibuprofen through a lipase-facilitated supported liquid membrane based on ionic liquids. *Chem. Commun.*, 2926-2927(2003) E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto
24. Activation of manganese peroxidase in an organic medium using a mediator. *Biochem Eng J*, Vol. 19 (1), 43-46(2004), J. Michizoe, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto,
25. DNA hybridization in nanostructural molecular assemblies enables detection of gene mutations without a fluorescent probe. *Biomacromolecules*, 5, 49-53 (2004). T. Maruyama, L.C. Park, T. Shinohara, M. Goto,
26. Poly(ethylene glycol)-lipase complexes catalytically-active in fluoruous solvents. *Org. Biomol. Chem.* 2, 524-527 (2004). T. Maruyama, T. Kotani, N. Kamiya, M. Goto,
27. First application of calixarenes as extractants in room-temperature ionic liquids. *Chemistry Lett.* Vol.33, No. 3, 320-321(2004), K. Shimojo, M. Goto,
28. Dominant factors affecting extraction behavior of amino compounds by a calyx[6]arene carboxylic acid derivative , *Anal. Chim. Act.*, 509, 137-144(2004) T. Oshima, K. Inoue, K. Uezu, M. Goto
29. Refolding of denatured carbonic anhydrase B by reversed micelles formulated with nonionic surfactant. *Biochem. Eng. J.*, 19, 217-220 (2004), M. Sakono, N. Kamiya, M. Goto
30. Poly(ethylene glycol)-lipase complex highly active and enantioselective in ionic liquids. *Org. Biomol. Chem.*, 2(8), 1239-1244 (2004). T. Maruyama, T. Kotani, N. Kamiya, M. Goto
31. Electron-transfer reactions and function of Cytochrome P450cam monooxygenase system in reverse micelles. *Langmuir* 20, 5564-5568 (2004) H. Ichinose, J. Michizoe, T. Maruyama, N. Kamiya and M. Goto
32. Factors affecting the oxidative activity of laccase towards biphenyl derivatives in homogeneous aqueous-nonaqueous systems. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 98, No. 1., 14-19 (2004) J. Tominaga, J. Michizoe, N. Kamiya, H. Ichinose, T. Maruyama, M. Goto
33. Liquid membrane operations in a microfluidic device for selective separation of metal ions. *Anal. Chem.* 76, 4495-4500 (2004). T. Maruyama, H. Matsushita, J. Uchida, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto
34. Solvent extraction and stripping of silver ions in room-temperature ionic liquids. *Anal. Chem.*

- 76, 5039-5044 (2004), K. Shimojo, M. Goto
35. Calix[6]arene acetic acid extraction behavior and specificity with respect to nucleobases. *Anal. Chim. Acta.*, 521, 163-171 (2004), K. Shimojo, T. Oshima, M. Goto
 36. Highly enantioselective separation using a supported liquid membrane encapsulating surfactant-enzyme complex. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8622-8623 (2004) E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto
 37. Intermittent partition walls promote solvent extraction of metal ions in a microfluidic device. *Analyst* 129, 1008-1013 (2004) T. Maruyama, T. Kaji, H. Matsushita, N. Kamiya, K. Kusakabe, M. Goto
 38. Activation of lignin peroxidase in organic media by reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 495-501 (2004), M. Kimura, J. Michizoe, S. Okazaki, M. Goto
 39. Direct refolding of inclusion bodies using reversed micelles. *Biotechnol. Prog.*, 20, (2004), M. Sakono, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto
 40. Lanthanoid element recognition on surface-imprinted polymers containing dioleoylphosphoric acid as a functional host. *Anal. Sci.*, 20, 1593-1597 (2004) K. Uezu, T. Kuwabara, M. Yoshida, M. Goto
 41. Mutation detection in the drug-resistant hepatitis B virus polymerase gene using nanostructured reverse micelles. *Anal. Sci.*, 20, 1609-1611(2004) L.C. Park, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto
 42. A supported liquid membrane encapsulating a surfactant-lipase complex for selective separation of organic acids. *Chem Eur J* 11, 1163-1170 (2005) E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto,
 43. Functionalization of the cytochrome P450cam monooxygenase system in the cell-like aqueous compartments of water-in-oil Emulsions. *J Biosci Bioeng* 99, 12-17 (2005) J. Michizoe, H. Ichinose, N. Kamiya, T. Maruyama, M. Goto
 44. Transglutaminase-mediated protein immobilization to casein nanolayers created on a plastic surface. *Biomacromolecules* 6, 35-38 (2005) N. Kamiya, S. Doi, J. Tominaga, H. Ichinose, M. Goto
 45. Metal ion-selective membrane prepared by surface molecular imprinting. *J Chromatogr B* 818, 141-145 (2005) K. Araki, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto
 46. Detection of point mutations in the HBV polymerase gene using a fluorescence intercalator in reverse micelles, *Biotechnol Prog* in press. T. Maruyama, T. Takata, H. Ichinose, N. Kamiya, N. Hamasaki, M. Goto
- その他 29件(内国内9件)

学会発表

国際学会36件(内招待講演7件)、国内学会104件(内招待講演12件)

受賞

2004年 9月 日本生物工学会 論文賞

「Protein Refolding in Nanostructured Reversed Micelles Including a Molecular Chaperone」

2005年 3月 化学工学会 研究賞「界面活性剤よりなる分子集合体の生物工学的応用展開」