

メソポーラスシリカ担体を用いた酵素固定化技術

Enzyme Immobilization with Mesoporous Silica

富樫秀彰*1、小島秀蔵*2、田原直樹*3

Hideaki Togashi*1, Shuzo Kojima*2, Naoki Tahara*3

*1 技術開発本部技術開発部、*2 技術開発本部技術戦略部

*3 産業・国内プロジェクト本部ライフサイエンスエンジニアリング部

*1 Technology Development Department, Research & Development Division, *2 Technology Strategy Department, Research & Development Division, *3 Life Science Engineering Department, Industrial & Domestic Energy Project Division

要旨

当社は、(独)産業技術総合研究所、日揮触媒化成(株)と共同で、新しい酵素固定化用担体として粒子間隙型メソシリカ多孔体 (IMS) を開発した。IMS は、単一粒径のナノシリカ粒子の高密度凝集体であり、粒子間に大きさのそろったメソ孔を形成している。IMS の細孔径と表面修飾を調整することにより様々な酵素を高い活性を保持した状態で固定化し、酵素の繰り返し利用を可能とすることを確認した。IMS 担体は、ファインケミカル合成法の簡略化や、環境負荷の低減につながる酵素触媒の利用を飛躍的に促進することが期待されている技術である。

Abstract:

JGC, JGC C&C and AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) have jointly developed “Inter-particle Mesoporous Silica (IMS)” as an immobilization support for enzymes. IMS consists of close-packed silica nanoparticle aggregates. The uni-sized nanoparticles form micrometer-size particles, which contain mesopores with tetrahedral symmetry defined by the void between the nanoparticles. Immobilization with size-designed and surface-modified IMS allows enzymes to sustain high catalytic activity and obtain reusability. IMS is the technology which is expected to dramatically accelerate the usage of enzyme catalysts for simplifying the synthesis of fine chemicals or reducing toxic waste.

1. はじめに

従来の無機触媒とは異なり、生体触媒である酵素は、生体内で繰り返し広げられる基質特異性、反応特異性、立体特異性、位置特異性の高い反応を実現することから、化学工業における有機物の合成反応ルートの簡略化等に寄与することが期待されている¹⁾。また、反応が水溶液中、常温、常圧において比較的速く進行するという酵素反応の特性は、環境に対する負荷が低くエネルギー消費の少ない社会の実現、すなわち、「グリーンサステイナブルケミストリー」の確立に大いに貢献すると考えられている²⁾。しかしながら、水に溶解した状態で使用される酵素は、基本的に使い捨てであるため、コストが高くなるケースが多い。また、必要な活性を維持できる反応条件 (温度や pH) が制限されており、非水溶媒中や、酸性・アルカリ性条件下で

不活性化しやすいなどの問題がある。そのため、酵素を適用できる分野が、繊維、澱粉糖化、洗剤といった産業に限られていた³⁾。

このような酵素の弱点を克服する一手段として、酵素の固定化がある。酵素を固相担体上に安定して保持することができれば、繰り返し利用できる触媒となる。固定化の手法として、物理吸着、共有結合、静電的結合などの原理が利用され、酵素の種類や利用目的に合わせて最適な固定化担体が選択されている⁴⁾。

近年、メソポーラス材料といわれる新しい材料が次々と開発されている。メソポーラス材料とは、約 2~50nm の細孔（メソ孔）を持つ材料の総称である。「メソ meso」とは「マイクロ micro」と「マクロ macro」の中間の概念であり、タンパク質のようなマイクロ孔に入らない巨大な分子を細孔内へ導入することができるという特徴をもつ。細孔内に導入された酵素は、固定化されていない「フリー」の酵素に比べて、熱耐性や有機溶媒耐性が向上することが報告されている^{5),6)}。そのため、酵素固定化用担体としての利用が期待されていたが、現在までに報告されているメソポーラスシリカは、その構造が極めて薄い板状のアモルファスのシリカで構成されているものが多く、長期の利用に耐えるほどの機械的強度を付与するのが難しいという問題があった。そこで、当社は、(独)産業技術総合研究所、日揮触媒化成(株)と共同で、機械的強度に優れ、均一な細孔を提供するメソポーラスシリカの開発を実施し、様々な種類の酵素に対して汎用性のある固定化担体の開発に成功した^{7),8),9),10),11)}。以下にその概要を記す。

2. 粒子間隙型メソ多孔体担体の性質

粒子間隙型メソ多孔体(IMS)は、**図 1** に示す通り直径数十 nm の球状シリカナノ粒子が一次粒子として多数集まって、数 μm の二次粒子を形成する構造をしている。一次粒子の粒子間隙がメソ孔を形成しており、その孔径は一次粒子の大きさにより、任意に制御することが可能である。**図 2** は窒素吸着法によるメソ孔径の分布測定結果であるが、4種類の担体がそれぞれ均一な大きさのメソ孔径を持っていることがわかる。

IMS 担体は機械的強度が強く、反応液中での攪拌にも耐える。さらに、一般的なシリカ担体と同様、IMS 担体表面には適当な官能基を付加することが可能で、細孔径 (4~20 nm) と官能基 (-OH, -NH₂, -COOH, -CH₃) の組み合わせによって、20 種類程度のバリエーションを用意することができた。

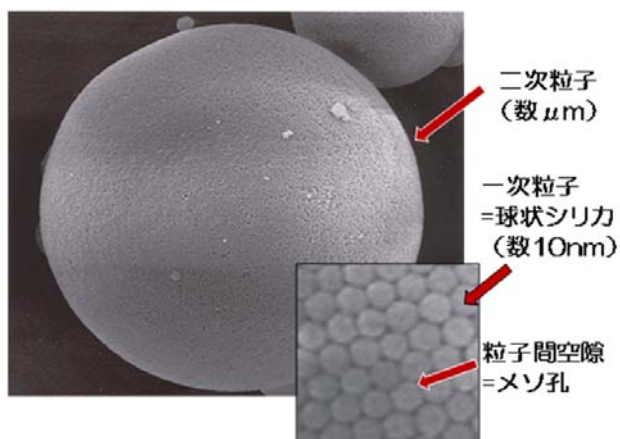


図 1 IMS 担体の電子顕微鏡写真

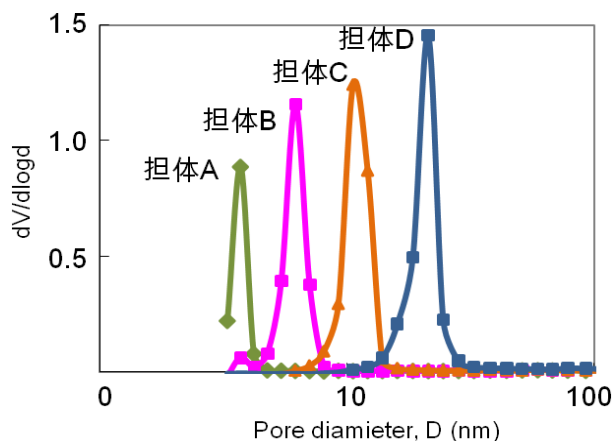


図 2 IMS 担体のメソ孔径分布

3. 担体の汎用性

IMS への酵素固定化における重要な因子として、酵素の大きさ（分子量）と表面電荷（等電点）がある。図3は、分子量や等電点が異なる酵素7種類に対して、最適なIMS担体（図中のIMS*-***）をマッピングしたものである。アミラーゼとデオキシリボアルドラーゼ(DERA)、あるいはグルコアミラーゼとプロテアーゼKのように、酵素の大きさと等電点が近ければ、同じIMS担体が最適となる傾向があることがわかる。

従来、固定化酵素の製作にあたっては、酵素を固定化する担体および固定化法の最適化に多くの労力が必要であった。一般的に、最適な担体を選択するためには、多様な担体入手し試行錯誤を繰り返さなければならない。今回開発した酵素固定化用担体は、酵素の種類毎に担体の基本構成を改めることなく、細孔の大きさと表面処理の調整のみで多くの酵素に適用可能である。細孔の大きさや表面処理は、酵素の物性情報（分子量、等電点、疎水性など）をもとにして設計されるため、最適な担体を、少ない労力で決定することができる。このように様々な酵素を容易に固定化できることが、IMS担体の特徴の1つである。

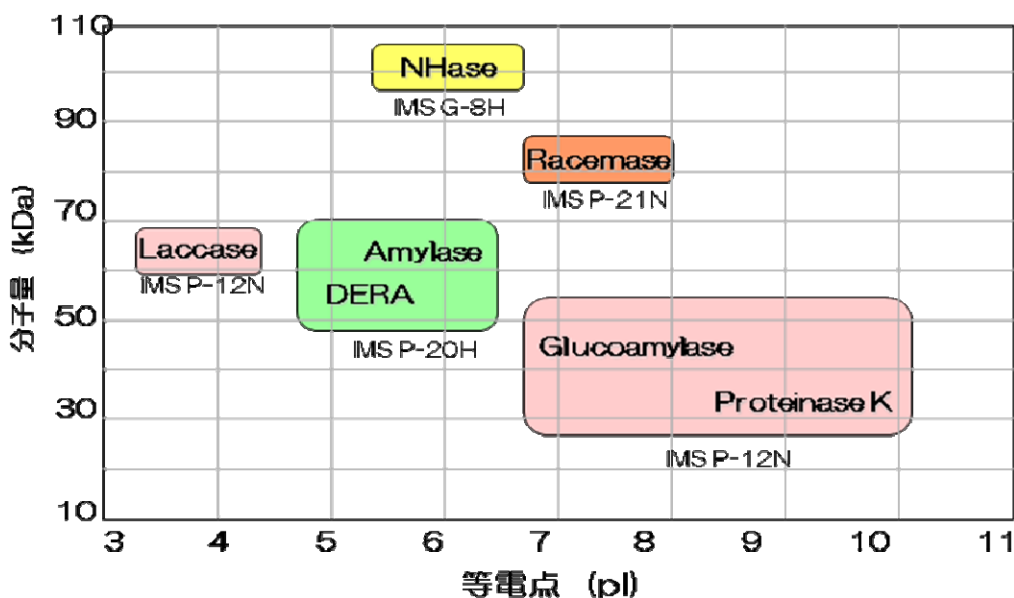


図3 各種酵素と最適なIMS担体のマッピング
(X軸：酵素の等電点、Y軸：酵素の分子量)

4. 固定化酵素の活性

既存の酵素固定化法として、共有結合、静電的結合、金属キレートなどを利用した方法がある。そこで、それらの原理を利用して固定化した場合と、IMS担体によって固定化した場合との酵素の比活性を比較した。比較結果を図4に示す。ラセマーゼについて、タンパク質分子中のアミノ基を利用した共有結合法(NHS)と、陰イオン交換基を使用した静電結合法(DEAE)、ニッケルイオンを利用したキレート法(His)、さらには別のメソポーラスシリカ(FSM)による固定化酵素の活性を比較したところ、IMS担体に固定化した酵素の比活性は高く、なかには100%近い相対活性を示すものもあった。また、他の酵素についても固定化後の比活性を測定したところ、98%（ニトリルヒドラーゼ）や74%（デオキシリボアルドラーゼ）など同様に高い値を示した。

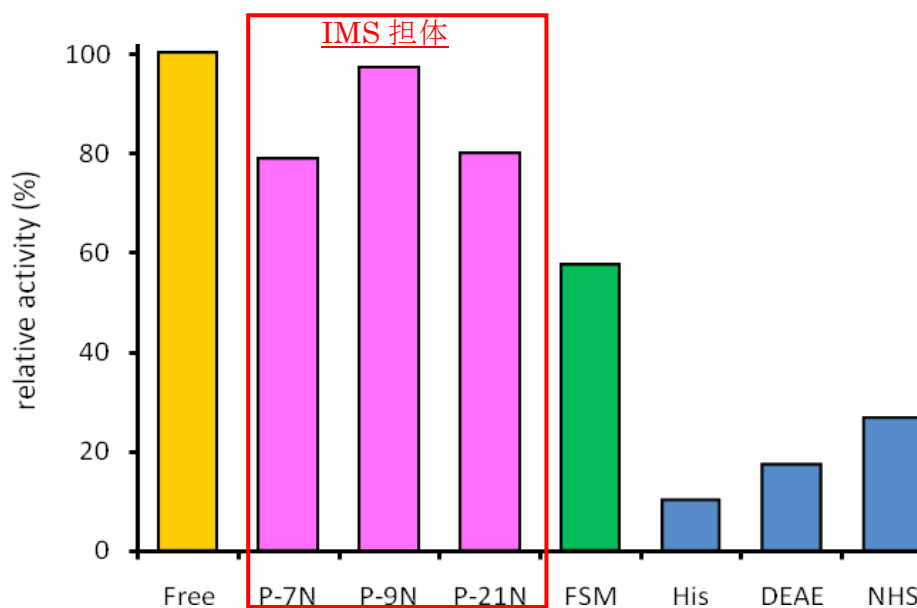


図4 各種固定化法との比較

5. 酵素の安定性の改善

固定化した酵素の繰り返し利用性について、IMS 固定化アラニンラセマーゼを用いて評価した。アラニンラセマーゼは、アミノ酸であるアラニンをラセミ化する酵素で、D体とL体の反応を触媒する。ラセマーゼを、4nm または 21 nm の細孔を持つ IMS 担体に固定し、繰り返しラセミ化反応を行った際の、その活性の変化を測定した。結果を図5に示す。

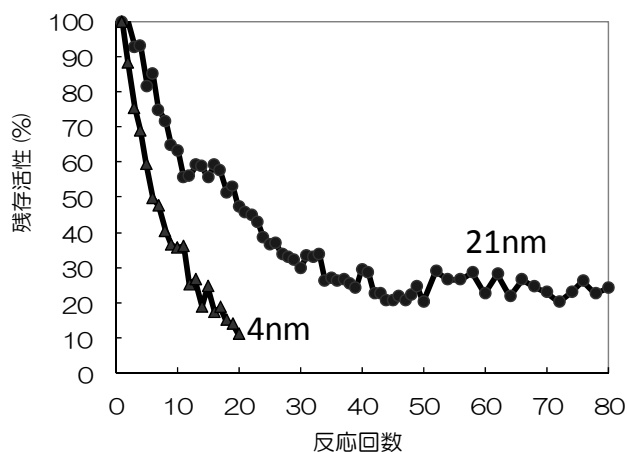


図5 バッチ反応を繰り返した場合の活性変化

使用した2種類のIMS担体の表面処理は同じで、細孔径だけが異なっている。細孔径4 nmのIMS担体に固定されたラセマーゼの活性

は、20回の反応後に10%まで低下する。一方、細孔径21 nmのIMS担体に固定されたラセマーゼは、40回の反応後も25~30%の活性を維持し、少なくとも80回まで安定した活性を示した。つまり、最適な大きさの細孔内に固定されたラセマーゼは、安定性が改善されること示している。安定性すなわち繰り返し利用性の改善は酵素の産業利用における経済性に直結する重要な要素である。

6. 結言

当社が開発した IMS 担体は、酵素に対して適切な細孔径と表面官能基を持つバリエーションが用意されているため、多くの種類の酵素を固定化することが可能である。また、機械的な強度にも優れ、さらに、産業的な利用を視野に入れたスケールでの大量生産が可能なメソポーラス材料である。

医薬中間体などのファインケミカルの生産や、エネルギー消費の少ない反応系の構築、あるいは環境負荷の大きい廃棄物を削減する手段として、酵素の利用に対する注目度は今後上がっていくことが予想される。本技術が貢献できる産業範囲が、医薬品のみならず、ますます広くなることを期待している。

実用化のためには反応をつかさどる酵素との組み合わせが必須である。このため、酵素を用いたプロセス開発を検討されている企業に対して、所有している酵素への適用性試験のための「サンプル提供」を行っている。また、適用性が認められた場合は、プロセス開発を支援する体制を準備している。

参考文献

- 1) 上島孝之； 産業用酵素、丸善 (1995)
- 2) 海野肇ら編； グリーンバイオテクノロジー、講談社 (2002)
- 3) 日経バイオテク編； 日経バイオ年鑑 2008、日経 BP (2007)
- 4) 野本正雄； 酵素工学、JSSP (1993)
- 5) 伊藤徹二ら； ファインケミカル、**35**、No. 8、5-18 (2006)
- 6) 高橋治雄ら； 豊田中央研究所 R&D レビュー、**36**、No. 2、57-62 (2001)
- 7) 富樫秀彰ら； 第 62 回日本生物工学会大会トピックス集、11-12 (2010)
- 8) 富樫秀彰ら； 第 62 回日本生物工学会大会講演要旨集、3P-1073、76 (2010)
- 9) 奈良貴幸ら； 第 62 回日本生物工学会大会講演要旨集、3P-1074、76 (2010)
- 10) 富樫秀彰ら； 酵素工学研究会第 64 回講演会要旨集、C-8 (2010)
- 11) Nara, T., et al.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **68**, 181-186 (2011)