

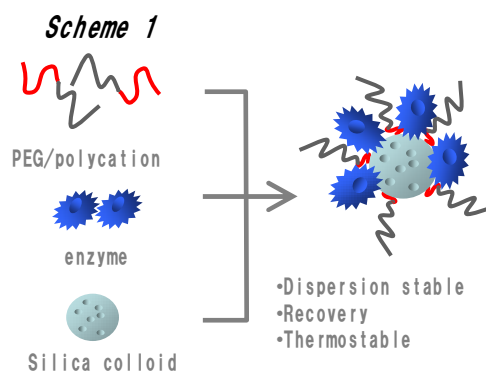
リパーゼ/PEG 化シリカ複合体の調製・物理化学的評価と応用

筑波大院数理 ○石川博子 小山高専物質工 飯島道弘

筑波大院数理 TIMS 大石基 筑波大数理院 TIMS TARA 長崎幸夫

【緒言】生体触媒である酵素は、高い基質特異性と活性を有することから、広く工業材料として用いられている。しかしながら、生体触媒故に pH や温度変化によって容易にその活性を失うことや、反応系からの酵素の分離回収が困難であることが知られている。そこで、その問題解決のために、酵素をシリカやラテックスなどの粒子に固定化し、回収性を向上させた固定化酵素が広く利用されている。一方、セラミックスは生体親和性、耐化学薬品性、耐熱性等に優れ、さらに安価であることから、固定化酵素担体として需要を増している。しかし、シリカ等の粒子表面への共有結合による酵素の固定化は、酵素の高次構造が壊れ、その活性は著しく低下することが知られている。他方、水溶性ポリマーによる酵素の化学修飾では、溶液中での安定性及び溶解性は向上するものの、化学修飾による活性低下が問題となっている。本研究では、生体適合性、運動性に優れた両親媒性ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG) と酵素をシリカコロイド粒子表面に共固定し、溶液中での安定性の向上および、粒子の界面に形成される PEG 密生層により酵素活性を維持することを目的とする。

【実験】リン酸緩衝液 (pH7.0、25mM) にリパーゼを溶解させ 6 $\mu\text{g/mL}$ の溶液を 10 mL 調製し、シリカコロイド溶液 (粒径:10nm、30wt%) 5 mL と混合してリパーゼ固定化シリカコロイド溶液を調製した。次に、このリパーゼ固定化シリカコロイド溶液に PEG とカチオン性セグメントを有する種々のブロックポリマー(0.1mM) 溶液を混合することでリパーゼ/シリカ/PEG 複合体を調製した。PEG による粒子の分散性を評価するため、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。また活性試験では、同緩衝液にプロピオン酸 p-ニト



Preparation of PEGylated Lipase/Silica Colloid for Biomaterials

Hiroko ISHIKAWA¹, Michihiro IJIMA², Motoi OISHI^{1,3}, and Yukio NAGASAKI^{1,3,4}

⁽¹⁾Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba 305-8573, Japan ⁽²⁾Oyama National College of Technology, Nakakuki 771, Oyama 323-0806, Japan, ⁽³⁾Tsukuba Research Center for Interdisciplinary Materials Science (TIMS), University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba 305-8573, Japan, ⁽⁴⁾Center for Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba 305-8573, Japan) E-mail: pirorinko2005_165@yahoo.co.jp

Key Word: enzyme immobilization / lipase / PEG / silica colloid / PEGylated silica

Abstract: Enzyme is biocatalyst possessing substrate specificity. However, the activity of enzymes is remarkably influenced by the environmental conditions such as pH and temperature. Other problems are the recycling and separation of the enzymes from the reaction mixture. To expand the industrial application of enzymes, novel PEGylated lipase/silica colloid was prepared by mixing with lipase and silica colloid, followed by the addition of PEG/oligocation block copolymers. Both dispersion and thermal stability of the PEGylated lipase/silica colloids were improved significantly. Indeed, enzymatic activity of PEGylated lipase/silica colloids was retained 90% after 5 times heating treatments, whereas the free lipase showed half enzymatic activity after once a heating treatment. In addition, the PEGylated lipase/silica colloid was retaining over 70% of its activity after 1 day at physiological condition (pH7.4, I=150mM, 37°C), though the free lipase lost 80% of its activity. PEG tethered chains on the lipase-adsorbed silica colloid may play an important role for the stable complex. Such the PEGylated lipase/silica colloid complex is promising for biomedical materials.

ロフェノールを溶解させ 98 μ g/mL の基質溶液を調製した。高温処理試験では、酵素溶液を 58 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱し、25 $^{\circ}$ C に冷却した後、基質溶液に加え 10 分間 37 $^{\circ}$ C で吸光度 (348nm) の変化を測定し活性評価を行った。さらに生体条件下 (pH7.4, I=150mM, 37 $^{\circ}$ C) での酵素活性の経時変化を評価した。

【結果・考察】両末端に OH 基を有する PEG-OH (M_w =5000)、カチオン鎖を持つ メトキシ-PEG-ペンタエチレンヘキサミン(N6-PEG、 M_w =5000、アミン数=6)、ポリジメチルアミノエチルメタクリレート (PEG-b-PAMA、 M_w =5000/4000、アミン数=25) を用い、ポリマーの構造が酵素活性に与える影響を検討した。図 1 には種々ポリマーで修飾したリパーゼの加熱処理前後の活性を示す。酵素単独 (E) では加熱処理によって半分程度の活性となつて入る。また、シリカに固定化したリパーゼ (E/Si) はフリーリパーゼとほぼ同様の挙動を示し、加熱処理後は活性が著しく低下している。一方、シリカにリパーゼを固定した後、N6-PEG 処理すると、興味深いことに加熱処理前でも活性が上昇する傾向にある。さらに加熱処理後も活性はほとんど低下していないことが確認された。また、加熱処理試験を繰り返し行った際、上述したように、わずか 10 分間の処理でリパーゼ単独の活性は初期の半分に低下するのに対し、リパーゼ/シリカ/N6-PEG 複合体は 5 回加熱後でも約 90%の活性が維持されていた。

このようなことは市販の PEG-OH では見られなかった。このように、N6-PEG は、負に帯電しているシリカコロイドとオリゴアミンとの静電相互作用により効率的に吸着することで粒子周囲に PEG 密生層を形成しているため、基質の局所濃度上昇にともなう初期活性の上昇と PEG 密生層による酵素間凝集の抑制が同時に達成されたものと考察される。図 2 にシリカコロイド単独および、シリカ/N6-PEG 複合体の TEM 写真を示す。予期したように、シリカコロイド単独では、粒子の凝集が観察された (図 2 (a)) もの、シリカ/N6-PEG 複合体は、全く凝集が見られない (図 2 (b))。

さらに、生体条件下 (pH7.4, I=150mM, 37 $^{\circ}$ C) での酵素活性の経時変化を測定したところ、リパーゼ単独では約 6 時間でその活性を 20%まで失うのに対し、リパーゼ/シリカ/N6-PEG 複合体は 24 時間経過後も約 70%の活性を維持していた。以上のように、リパーゼ固定化シリカ粒子周囲に PEG 密生層を調製することにより高イオン強度下でも長時間にわたって高い活性維持が確認された。

このように、PEG 密生層を周囲に有するナノ粒子・酵素分散体は様々な酵素利用の基盤材料とした高機能性ナノマテリアルとなり得ると考えられる。

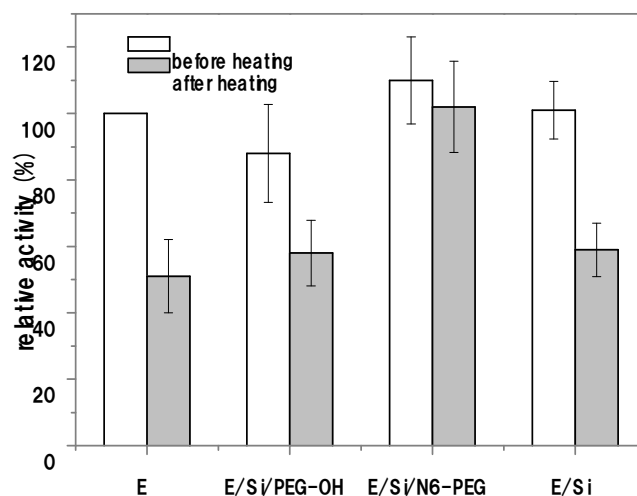


Fig. 1) remaining of enzyme activity with various PEG/oligocation block copolymers

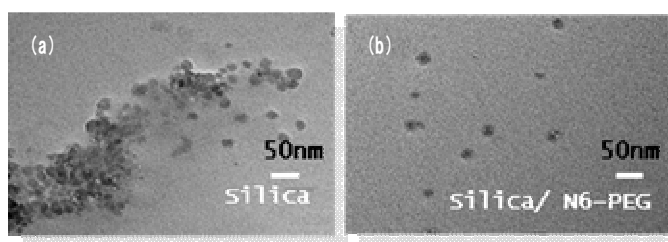


Fig. 2) TEM images of (a) silica particles alone and (b) PEGylated silica particles ($\times 60000$)