

安定分散かつ耐熱性を併せ持つ酵素担保ナノ粒子の設計

筑波大学大学院数理物質科学研究科

原 暁 非、長 崎 幸 夫

Glucose dehydrogenase (PQQ-GDH) and α -methoxy-poly(ethyleneglycol)-*b*-poly[2-(*N*, *N*-dimethylamino) ethyl methacrylate] (PEG-PAMA) were dropped into gold sol (pH=9.0) to formulate enzyme/polymer/gold hybridizes called nanozymes. Size growth and red-shift in the surface plasmon resonance (SPR) of the gold nanoparticles (GNPs), observed in dynamic light scattering (DLS) and ultra-visible (UV) spectroscopy analysis, respectively, suggested the adsorption of the PQQ-GDH and PEG-PAMA on the surface of the GNPs. Transmission electron microscopy analysis (TEM) showed that the nanozyme mainly composed of single GNP, on the surface of which the PQQ-GDH and/or the PEG-PAMA were loaded. ζ -Potential of the nanozymes evidenced the presence of the PEG-PAMA layer around the GNP. The nanozyme thus obtained was highly dispersible even though under physiological saline condition for one week by the protection of the peripheral hydrophilic PEG shell. It also kept its architecture in fact spanning broad pH regions from 9.0 to 2.5, providing a desirable, convenient approach to generate nanozymes at various pH regions, retaining high dispersion stability of the GNPs. It is interesting to note that apparent enzymatic activity decreased ca. 40% when the PQQ-GDH adsorbed on bare GNP surface, while co-immobilization with the PEG-PAMA gave 1.4 times higher activity than that of free enzyme, associated with notable improvement of the poor thermostability of the PQQ-GDH at pH=9.0, 25°C. These results significantly indicated the responsibility of the PEG-PAMA not only for the structure stability of the nanozyme, but also its enzymatic activity.

1. 緒 言

酵素の利用は、酵素という概念が現れるかなり前からも行われており、ほぼ人類の歴史と共に始まったと言われている。これは、酵素が卓越した触媒機能（高効性・特異性）を有することに強く起因している。近年、生化学の発達による酵素の作用機構の解明や、新しい酵素源（細菌、微生物など）の開発、特に多様な設備及び技術（分離、精製、分析）の顕著な進歩などは、酵素の研究を著しく促進し、酵素の応用は各領域まで広く浸透している。現在、醸造・発酵工業をはじめとして、繊維工業、皮革工業、食品工業、医薬品工業など広い分野にわたっている。我々の日常生活には欠かせないものになってきている。

一方、よく知られているように、酵素は、生体触媒で、もっとも代表的な機能性タンパク質である。ネイティブな立体構造を形成してはじめて触媒機能を発揮する。逆にいうと、変性した酵素には触媒機能はない。よって、酵素はタンパク質と同様に、周囲環境（温度、酸、アルカリ、有機溶媒など）に対し、非常に敏感である。この変性しやすい特徴は、酵素の応用を大幅に制限している。この問題を解決するために、今まで様々な方法が報告されてきた。例

えば、蛋白質工学の方法により、酵素活性にあまり影響しない程度に、静電相互作用や疎水性相互作用、化学結合など様々な力で酵素分子の構造を固定する。この方法は良い結果が得られるものの、複雑、専門知識が要するという欠点がある。従って、簡単かつ有効な方法が必要である。

固定化酵素、特にナノ粒子に固定された酵素の研究は、近年非常に注目を集めている。固定化酵素の作成は、物理あるいは化学吸着方法により酵素を簡単にナノ粒子へ固定することである。このように作った固定化酵素は、例えば、工業用の反応触媒として、反応系からの分離・回収・再利用が元のフリー酵素より簡単・便利になり、経済面の有利さは明らかである。また、固定化により酵素安定性の改善は、注目されるもう一つの重要な原因である。

我々は、この固定化酵素の方法を利用し、モデル酵素として油脂分解酵素リパーゼを金ナノ粒子やシリカ粒子の表面へ吸着させ、リパーゼの固定化酵素（ここは、酵素複合体と呼ぶ）を作成した。この作り方は、酵素と粒子を混合させるだけで非常に簡単である。また、ナノ粒子は低毒性、不活性、良い生体適合性、低コスト（シリカ粒子）、特別の光学活性（金粒子）など多様な利点を有するため、このような酵素/ナノ粒子複合体の応用範囲は広いと考えられる。予想通りに、酵素複合体の耐熱安定性が著しく向上することを見出した¹⁾。特に、酵素と共に親水性のPEGを共固定することにより、極めて高い分散安定性を示すことを見つけている。これは、粒子への固定化が酵素構造の変化を抑制し、更にPEG密生層が粒子の凝集を抑えらるとともに酵素リフォolding能を示した結果と考えられる。

以上の概念を基にして、本研究では、より実用性が高



Design of enzyme-loading nanoparticles with both high thermostability and high dispersability

Yukio Nagasaki

Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba Research Center for Interdisciplinary Materials Science (TIMS)

い酵素の複合体の研究を行うことを目的とした。グルコース酸化酵素 glucose oxidase (GOD) は、昔からよく研究され、現在血糖値の測定やグルコースセンサーに広く応用されている。しかしながら、グルコースの酸化には、酵素が不可欠であり、サンプル中の酵素濃度により測定値は大きく変わるため、これは致命的な欠点であった。一方、pyrroloquinoline quinine (PQQ)を含む Glucose dehydrogenase (PQQ-GDH) は、GOD と比べて、反応性が高いことと酵素から影響を受けないことが魅力的な利点である。また、グルコース以外の糖類とも反応し、人工電子受容体も沢山あるため、GOD より簡単にグルコースセンサーを作ることが可能である。しかしながら、PQQ-GDH は熱に対して不安定であり、これが実用化を妨げている²⁻⁴⁾。従って、本研究で提案する酵素/金粒子の酵素複合体により PQQ-GDH の耐熱安定性が改善できれば、グルコースセンサーの研究・応用に大きく貢献することが期待できる。

2. 実験

2. 1 酵素複合体の作成

グルコース酸化酵素 PGG-GDH (pH=9, 0.1 ml) と pH=9 に調整された市販品金ナノ粒子 (GNPs, 粒径 10nm, 0.9 ml) のトリス緩衝溶液 (Tris-HCl, 20mM, pH=9) を混ぜることにより、PQQ-GDH を GNPs の表面へ固定させた。25℃で 10 分間静置した後、更に、正電性のセグメントを有する親水性ポリマー PEG/ ポリアミン α -methoxy-poly (ethylene glycol)-*b*-poly [2-(*N,N*-dimethylamino) ethyl methacrylate] (PEG-PAMA) の Tris-HCl 緩衝液 0.05 ml を添加し、PQQ-GDH/ 金粒子 /PEG (E/Au/PEG) 酵素複合体を調整した。

2. 2 酵素複合体の構造分析

Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) を利用して、動的光散乱 (DLS) と表面電位の測定により酵素と PEG-PAMA の吸着によって起こる金ナノ粒子のサイズおよび表面電位の変化を確認した。紫外・可視分光分析 (UV, PL-2500, 島津) により、酵素と PEG-PAMA の吸着によって起こる金ナノ粒子の表面プラズマ (SPR) 吸収波長の変化を確認した。透過型電子顕微鏡 (JEM-100CX, JEOL) を使用し、TEM 測定により形成された E/Au/PEG 酵素複合体の金ナノ粒子の構成を確認した。

2. 3 酵素複合体の分散安定性

塩濃度 150mM になるように E/Au/PEG 酵素複合体に NaCl を加えた。酵素複合体の粒径変化 (30 分間以内) 及び金粒子の SPR 吸収波長の変化 (30 分後) を 25℃で測定した。その後、酵素複合体を 4℃で保存して、粒径変化を

1 週間行った。

E/Au/PEG 酵素複合体に各濃度の塩酸溶液を加え、複合体溶液の pH 値を酸性に調整した。上の実験と同様に、酵素複合体の粒径変化 (30 分間から 1 週間以内) 及び金粒子の SPR 吸収波長の変化 (30 分後) を評価した。

2. 4 酵素複合体の活性

Tris-HCl 緩衝溶液 (20mM, pH=9) 0.75 ml に、0.1 ml グルコースの Tris-HCl 溶液 (1 mM) と 0.05 ml 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) 水溶液 (0.08mM) を入れた。そして、0.1 ml の酵素複合体溶液を添加し、良く混ぜた後、600nm において DCIP の UV 吸収減少速度を酵素反応速度として測定した。

酵素複合体を 25℃で 5 時間静置し、1 時間ごと酵素複合体の活性を前と同様に測定し、活性の安定性を評価した。

3. 結果と考察

3. 1 酵素複合体の構造分析

図 1a に示すように、GNP 溶液に PQQ-GDH を添加すると、その量の増加に伴い、GNPs の表面プラズモン (SPR) 吸収は徐々に長波長側に移動し、吸収強度も強くなった。DLS の測定結果により、この SPR 変化と共に、複合体のサイズも増大した (図 1b)。酵素と金ナノ粒子の個数比 (E/Au) が 4 以上になると、複合体のサイズが異常に大きくなると共に、サイズの再現性も悪くなった。4℃で一週間保存した後、低い E/Au 比の複合体よりこのサイズが顕著に増大した。大量の酵素の金粒子表面への吸着により弱くなった GNPs 間の静電斥力が、複合体の凝集を促進したためと考えられる。一方、E/Au 比一定 (E/Au=2) の複合体へ、更に PEG-PAMA を加えると、同様の変化傾向を示した (図 2)。PEG-PAMA と金ナノ粒子の個数比 ($PPg = \text{PEG-PAMA}/\text{Au}$) が 240 倍以上では、E/Au/PEG 複合体の粒径と SPR 吸収波長がほぼ安定になった。物質が GNPs 表面に吸着すると GNPs の表面屈折率が変わるため、SPR 吸収が変化する⁵⁾。従って、PQQ-GDH と PEG-PAMA が金表面へ固定されたことが SPR と DLS の実験結果により証明された。

以上の結果により、E/Au=2 と PEG-PAMA/Au=480 の酵素複合体 (それぞれ NZ-2-0 と NZ-2-480 で表示) を酵素複合体のモデルとして用い、各特性の検討を行った。

GNPs (10 nm)、フリー酵素 (DLS 測定結果: 8-10 nm)、及び酵素複合体 (NZ-2-0 と NZ-2-480) のサイズ (DLS 測定結果) と PEG セグメントの水中鎖長 (5 nm) を比較したところ、NZ-2-0 と NZ-2-480 がそれぞれ主に一つの金ナノ粒子から構成されたと考えられる。これは、TEM 写真 (図 3a と 3b) により確認された。また、DLS 測定結果により、酵素複合体のサイズ分布は多少多分散であり (図

1b と 2b)、数個 GNPs の凝集体が少量存在することが確認された。これも TEM 写真と一致する。更に、図 3c と 3e を比べて、酵素複合体の場合は、金ナノ粒子の表面に酵素のような球状なものが吸着していることは明らかになった。従って、本研究で作成した酵素複合体は、主に一つの金ナノ粒子へ酵素と PEG ポリマーの共固定により構成された。酵素複合体の形成過程は、図 4 のようにイメージできる。

3. 2 素複合体の分散安定性

NaCl 濃度 150mM になった後 30 分以内で、NZ-2-0 のサイズが 20 倍ぐらい上昇したことに對して、NZ-2-480 は、4℃で一週間静置したことに係わらず、サイズの変化が全く観察されなかった。(図 5) PEG-PAMA の代わりに等量 (PEG-PAMA/Au=480) および二倍量の PEG-OH をそれぞれ NZ-2-0 の中に加えて調製した酵素複合体 (control-480 と control-960) は、control-960 では、このサイズ変化は多少抑制されたが、control-480 にはまったく抑制効果がなかった。従って、生理塩濃度に対する分散安定性は、NZ-2-480 自身の特性で、フリー PEG-PAMA (使用した酵素複合体は精製してないため) の分散剤効果 (PEG-OH と類似する) に由来したものとは考えられない。NZ-2-0 の表面電位は約 -35mV (図 6) であるため、粒子間の静電斥力により分散しているが、塩の添加によりこの静電斥力が弱くなって、粒子が凝集した。NZ-2-480 の表面電位は零に近いので (図 6)、親水性の PEG により分散している。この PEG 層が粒子の凝集を阻害するため、NZ-2-480 の分散安定性に対して大きく寄与していると考えられる。

酵素複合体溶液の pH を 9 から酸性まで調整した後 30 分間以内のサイズ変化は図 7 に示している。溶液の酸性は強くなればなるほど、NZ-2-0 サイズの増大は速くなった。同時に、SPR 吸収波長は長波長側に移動した。酸性環境において、NZ-2-0 は不安定で、凝集した。これに対して、NZ-2-480 のサイズ及び SPR 吸収波長はほぼ変化せず、非常に安定であった。酸性環境下では、酵素が正電性になって (PQQ-GDH の等電点は 9.5 である)、負電性の金ナノ粒子と静電相互作用により NZ-2-0 粒子の凝集を促進したと考えられる。しかしながら、NZ-2-480 は、PEG ポリマーの共固定により金ナノ粒子の表面電荷がほぼゼロ (表面電位の結果) になったと共に、親水性 PEG 層がこのような凝集 (もしあれば) を障害するため、粒子の凝集は発生しなかった。よって、酸性環境においても、NZ-2-480 酵素複合体の PEG 層の外れはなく、酵素複合体は安定に分散できることが見出された。

3. 3 素複合体の活性

図 8 に示すように、PQQ-GDH は金ナノ粒子へ固定された後、活性がフリー酵素より 6 割程度に減少した。その上に PEG-PAMA で修飾すると、フリー酵素に比べて活性が若干大きくなった。 K_m 及び最大反応速度を評価した結果は、NZ-2-0 複合体とフリー酵素は、最大反応速度と K_m glucose 値 (酵素とグルコース反応する K_m 値) がほぼ一致し、金表面への固定により酵素の失活がないことを確認した。しかし、フリー酵素より NZ-2-0 複合体の K_m DCIP 値 (酵素と DCIP 反応する K_m 値) は倍ぐらい増大した。NZ-2-480 複合体とフリー酵素は、この三つの値が実験誤差範囲内では一致であった。(表 1) よって、酵素は金ナノ粒子に固定された後、周囲環境が疎水性に変化したため、酵素と DCIP 基質の接触が悪くなったと考えられる。親水性の PEG-PAMA と共固定の場合、酵素の親水性の周囲環境は維持されたため、 K_m 及び最大反応速度はフリー酵素と比べて変化してなかった。

25℃で 5 時間静置すると、フリー酵素の活性は速やかに低下した。これに対して、酵素複合体の活性変化は遅くなった。特に NZ-2-480 複合体の場合、5 時間後の酵素活性がフリー酵素の初期活性と一致した。酵素複合体は、フリー酵素より活性安定性が顕著に改善された。

4. 総 括

固定化酵素は注目されている現在でも、固定化酵素自身の構造に関する詳しい情報はほぼ報告されていなかった。本研究では提案する PEG/酵素共固定系はこれまでの“単なる”固定化酵素と比べて、飛躍的な特性の向上が期待できるだけでなく、その構造と性質の関連を解明することは、このようなナノ粒子上の PEG/酵素二元系の特徴を抽出し、一般化することで実用化につなげる極めて重要なプロセスである。従って、本研究では、酵素複合体の構造を明らかにさせるため、構造と各性質 (分散安定性や酵素活性) の関連、更に固定化酵素の性質コントロール・設計にとっても、非常に興味深い研究であると考えられる。タンパク質工学の方法を利用し、PQQ-GDH の安定性を向上させようとする試みは多く、その一部は有用であるものの、すべての酵素化学に適用するためには難がある。本研究のように簡単、便利、短時間で調製できる、かつ有効な方法は、他にはない。

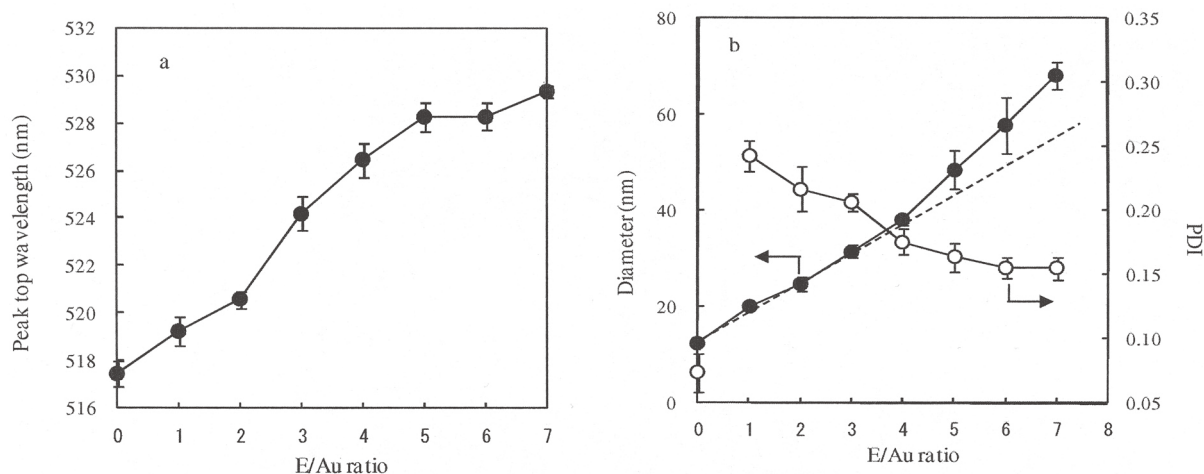


Figure 1 (a) E/Au-dependent peak top wavelengths of the SPR bands of NZ-*m*-0; (b) variations in the diameter and polydispersity index of NZ-*m*-0 as the E/Au ratio increases from 0 to 7. (*m* denotes the molar ratio of enzyme to GNP(E/Au) and 0 denotes the ratio of PEG-PAMA to GNP (PEG-PAMM/Au)).

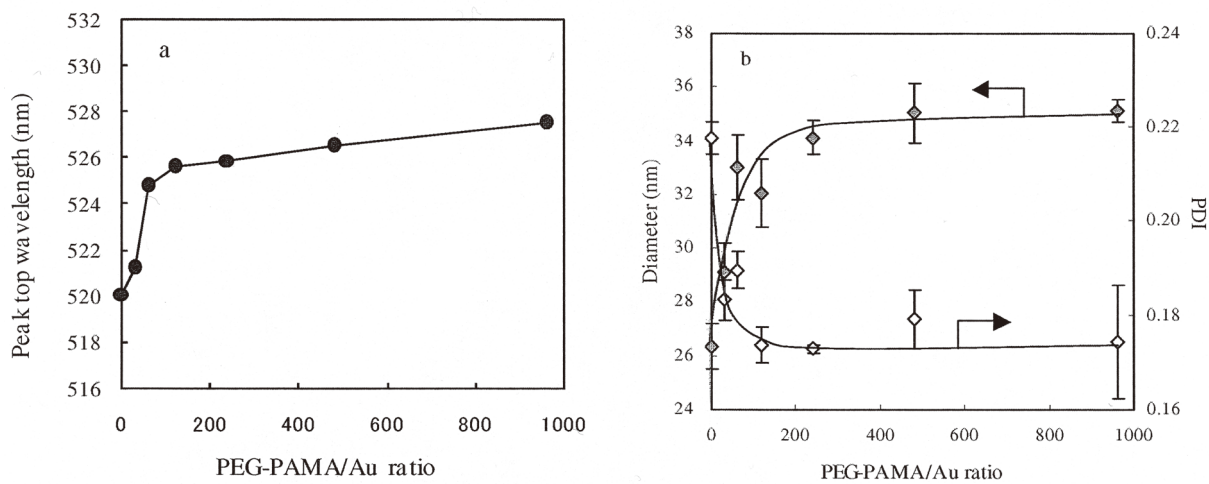


Figure 2 (a) *PPg*-dependent peak top wavelengths of the SPR bands of NZ-2-*PPg*; (b) variations in the diameter and polydispersity index of NZ-2-*PPg* as the *PPg* value rises from 0 to 960. (*PPg* denotes the ratio of PEG-PAMA to GNP (PEG-PAMA/Au)).

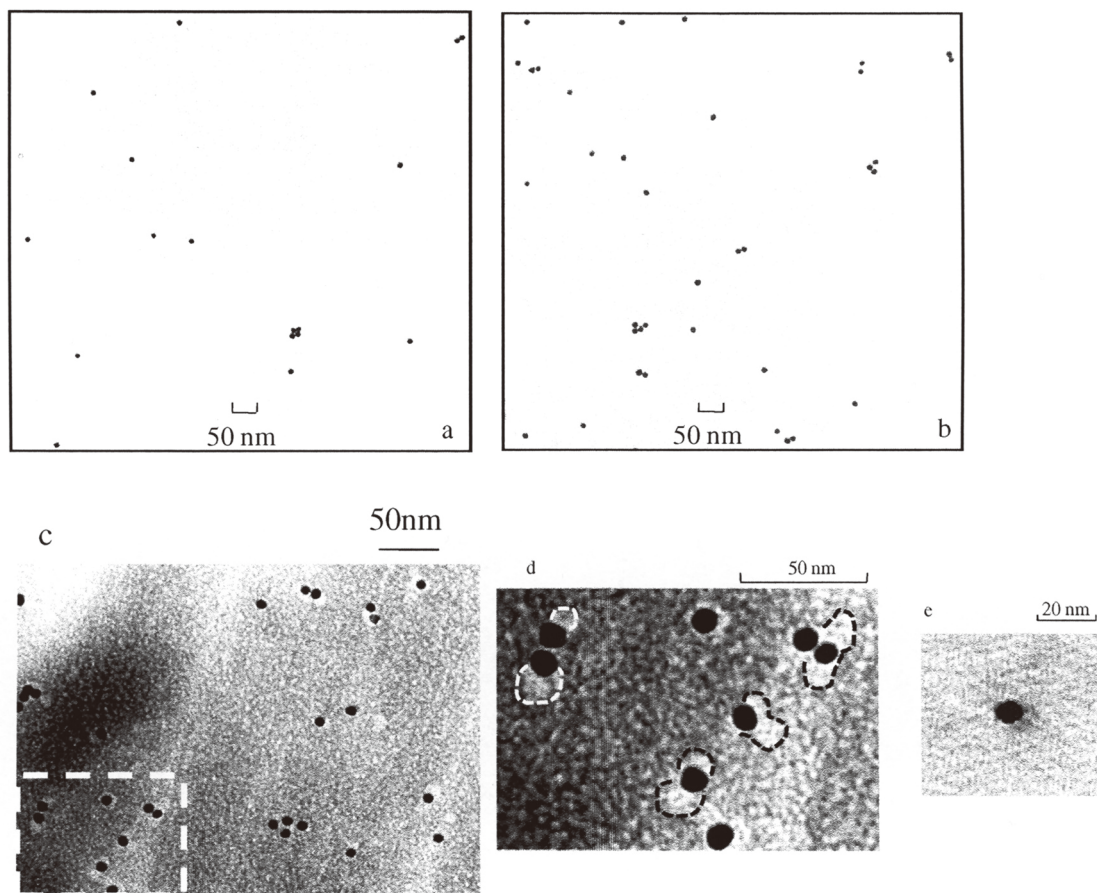


Figure 3 (a) and (b) are TEM pictures of NZ-2-0 and NZ-2-480, respectively; (c) and (e) are TEM pictures of NZ-2-480 and GNPs, both dyed using silicotungstic acid aqueous solution. (d) is an amplified TEM picture of a part of (c) for better viewing.

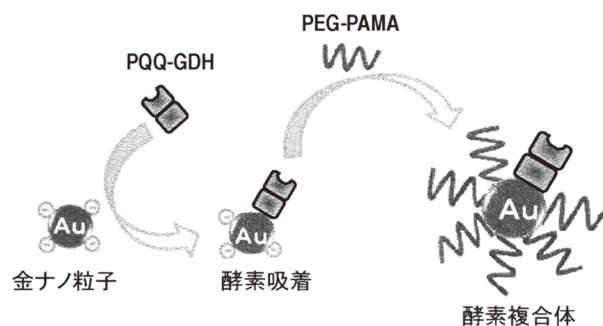


Figure 4 酵素複合体の作成イメージ図

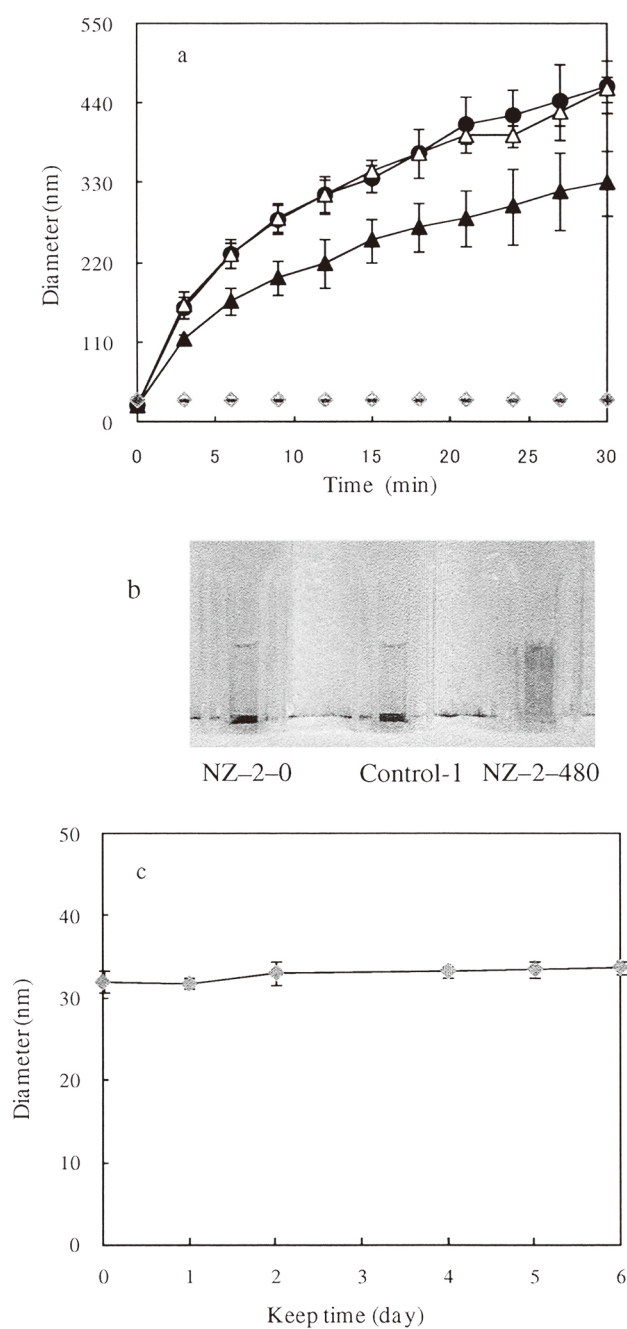


Figure 5 (a) Physiological saline-induced variations in the size of NZ-2-0 (closed circle), NZ-2-480(closed diamond), control-1 (PEG-OH/Au=480; open triangle), and control-2 particles(PEG-OH/Au=960; closed triangle), during the first 30 minutes after salt addition. (b) Pictures of NZ-2-0, control-1 and NZ-2-480 particles in 150 mM NaCl after being kept at 4°C for one week. (C) Time – dependent variations in the size of NZ-2-480 particles in 150 mM NaCl 4°C .

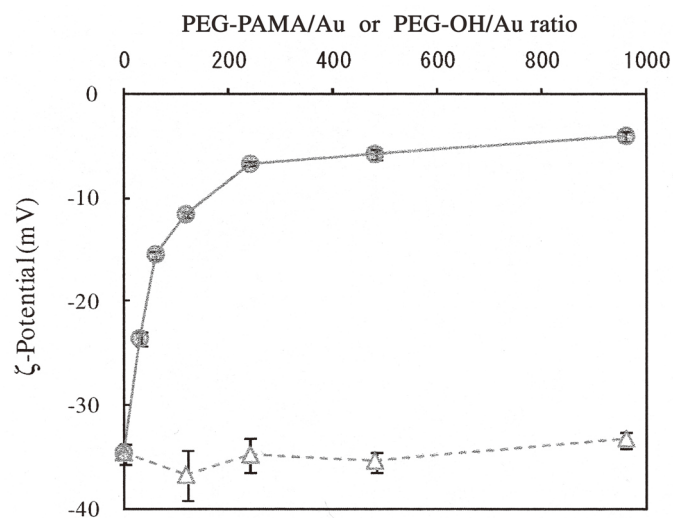


Figure 6 Variations in the ζ -potential of freshly prepared nanozymes particles as a function of the PEG-PAMA/Au ratio (solid line) and the PEG-OH/Au ratio (dashed line).

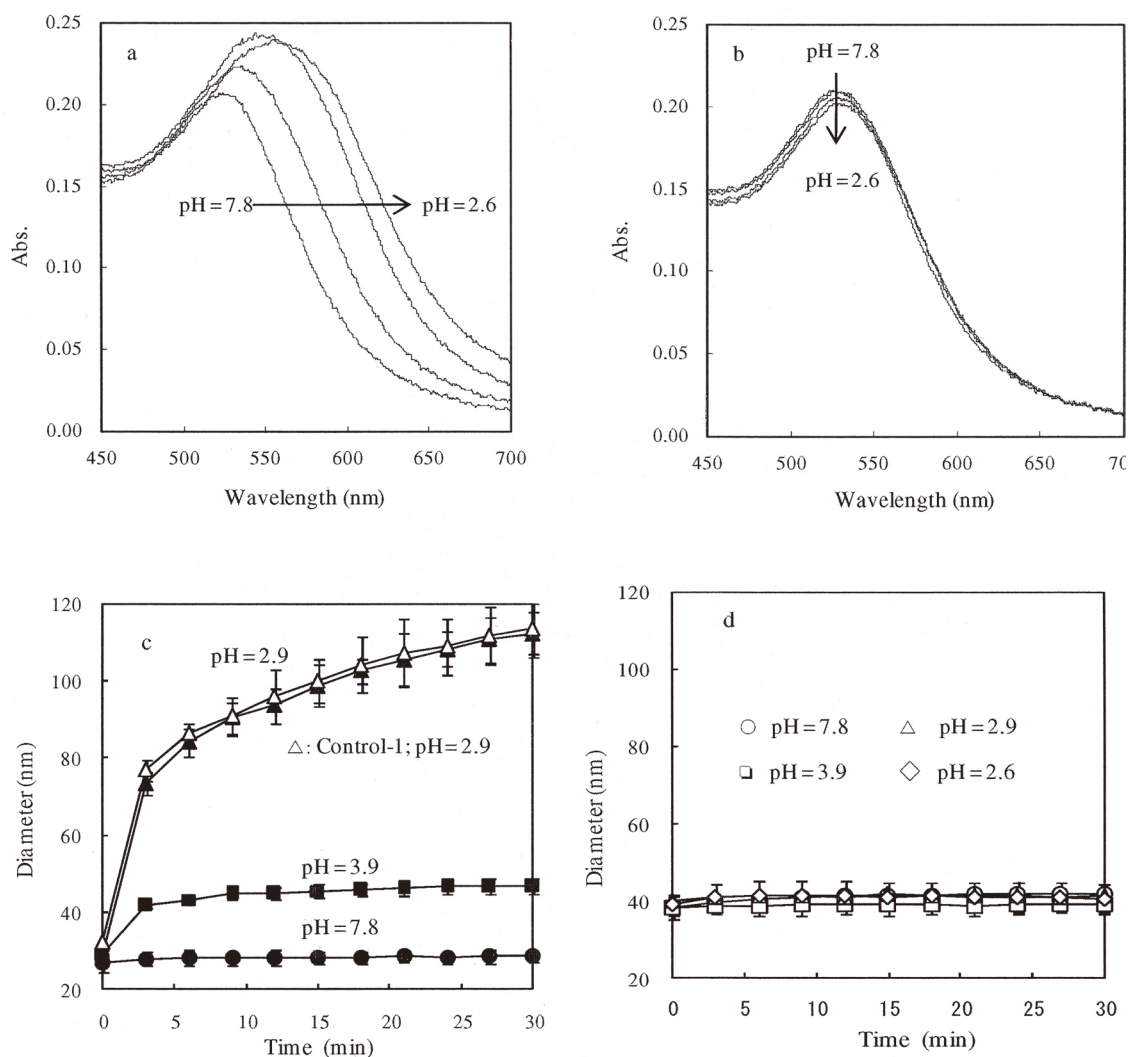


Figure 7 pH-induced variations in the SPR spectra (a, b; during the first 30 minutes after the addition of HCl of various concentrations) and size (c, d; during the first 30 minutes after the addition of HCl of various concentrations) of NZ-2-0 (a, c) and NZ-2-180 (b, d).

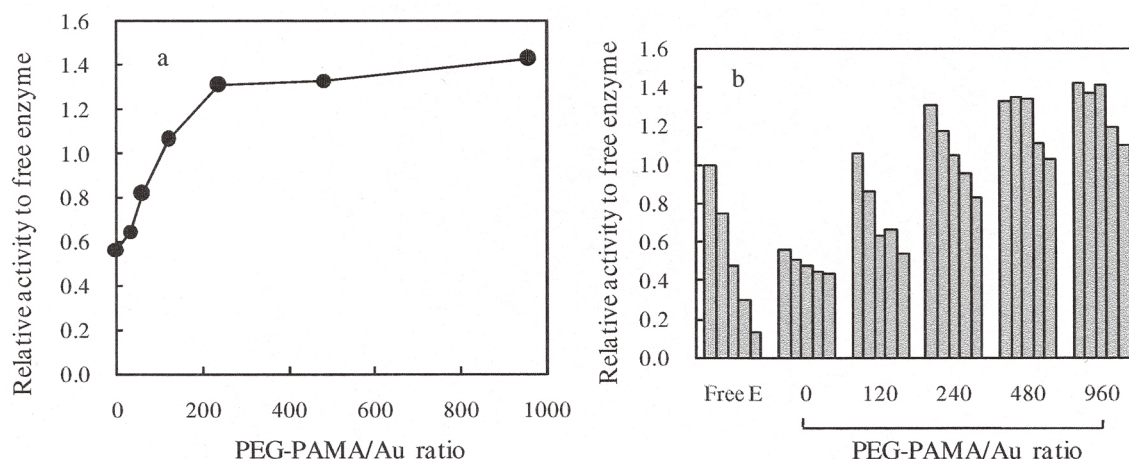


Figure 8 (a) Influence of the *PPg* value on the normalized apparent enzymatic activity of the NZ-2-*PPg* nanozymes; (b) time-dependent normalized apparent enzymatic activity of NZ-2-*PPg* and free enzyme at 25°C. (From left to right: 0, 1, 2, 3 and 4 hours, for each group.)

Table 1 Kinetic parameters of PQQ-GDH in free enzyme, NZ-2-0, and NZ-2-480

	$K_{m, \text{glucose}} (10^{-3} \text{ M})$	$K_{m, \text{DCIP}} (10^{-4} \text{ M})$	$V_{\max} (\mu\text{mol/min})$
Free E	0.36	2.31	1.52
NZ-2-0	0.31	5.01	1.49
NZ-2-480	0.38	2.28	1.57

(参考文献)

- 1) Nagasaki Y, Yoshinaga K, Kurokawa K, et al. : Thermal and Dispersion Stable Lipase-installed Gold Colloid, - PEGylation of Enzyme-installed Gold Colloid-, *Colloid Polym. Sci.* 285, 563-567, 2007.
- 2) Geiger O, Gorisch H, : Reversible thermal inactivation of the quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*, *Biochem. J.* 261, 415-421, 1989.
- 3) Sode K, Ootera T, Shirahane M, et al. : Increasing the thermal stability of the water-soluble pyrroloquinoline quinine glucose dehydrogenase by single amino acid replacement, *Enz. Microbiol. Technol.* 26, 491-496, 2000.
- 4) Igafashi S, Okuda J, Ikebukuro K, et al. : Molecular engineering of PQQGDH and its applications, *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 52-63, 2004.
- 5) Aoki S, Zhou H. S, Honma I, et al. : Observation of Cytochrome b-562 Adsorption on Gold-Particle Surface by Optical Absorption Measurement, *Surface Rev. and Let.*, 3, 1137-1141, 1996.