

《様式B》

研究テーマ	「乳糖不耐症者を対象とした新規ラクターゼ固定化担体の開発」		
研究責任者	所属機関名	名古屋工業大学	
	官職又は役職	准教授	
	氏名	水野 稔久	メールアドレス： toshitcm@nitech.ac.jp
共同研究者	所属機関名	株式会社 天野エンザイム	
	官職又は役職	研究員、研究所長	
	氏名	高橋哲也、小池田聡	

(平成 28 年度募集) 第 29 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

<実施内容の成果>

本研究では、乳糖不耐症者自らが乳製品中のラクトースを除去可能な「ラクターゼ固定化製品」の開発に利用可能な、新規の酵素固定化担体の開発と、その手法を用いて作製されたラクターゼ固定化体の機能評価、さらに生体毒性の評価などを行った。乳製品といった、分解したい目的基質（今回であればラクトース）以外の夾雑物が多いサンプルから、酵素反応を用いてこれを分解する場合には、架橋高分子の網目構造内に酵素を固定化することは有効である。また、溶媒との比表面積を十分に取れる繊維積層構造にこれを成形することは、効率良い酵素反応の達成には重要である。そこで架橋高分子を部材として用いた不織布の利用を検討した。架橋高分子からなる不織布の繊維内部に酵素を固定化するためには、予め架橋されたものを用いては駄目なため、後架橋可能な高分子を蛋白質共存下で二官能性の架橋剤により架橋させつつ電界紡糸を行う方法を検討した。具体的にはポリ（アクリルアミド-co-ジアセトンアクリルアミド）共重合体（Poly(AA/DAAM)）を後架橋可能な高分子、二官能性架橋剤としてアジピン酸ジヒドラジド（ADH）を用いた。その結果、この不織布（Poly(AA/DAAM)不織布）を用いることで、蛋白質を不織布のナノ繊維内部に変性させることなく固定化させることに成功した。しかし、弱酸性条件下（pH<5）でも不織布が崩壊してしまうことや、仮に中性条件下であっても、長時間溶媒に浸漬することで、やがて不織布の繊維同士が癒着してしまうなどの問題点が明らかとなった。そこでこの問題の解決のため、上記不織布のナノ繊維1本1本を疎水性高分子で被覆しコアシェル型の不織布とする方法を次に検討した。疎水性高分子にはポリεカプロラクトン（PCL）を選択した。その結果、コアシェル型不織布とすることで、あらゆるpH範囲において不織布の崩壊が起こらず、さらに繊維同士の癒着も見られなくなり、上記問題点の解決に成功した。そこで最後にコアシェル型不織布のコア部分にラクターゼを内包固定化した不織布の作製を行い、酵素活性の評価を行った。その結果、単にラクターゼをバッファー溶液に溶かした場合と比較し、驚くことに86%程度の酵素活性が観測された。さらに、哺乳類細胞をこの不織布上に播種し細胞毒性の評価を行ったところ、細胞毒性も全く観測されなかった。以上のことから、乳糖不耐症者をターゲットとした「ラクターゼ固定化製品」の開発に利用可能な、不織布型の新規固定化担体の開発に成功した。

<企業側からの今後予想される効果>

本開発技術によるラクターゼの固定化技術は、潜在的に大きな商業価値を持つものである。世界の食品市場では乳糖を除去した乳製品（ラクトースフリー製品）市場が、年率10%以上を超える成長率で成長しており、市場規模は全世界で1兆円に達している。ラクトースフリー製品は、乳糖をラクターゼで分解した牛乳から製造されるが、そのコストは通常製品の2.5倍であり、通常の牛乳から簡便に乳糖を分解する技術が求められている。本技術はこのニーズを満たすものである。

2. 実施内容および成果の説明 (A4で、5ページ以内)

2.1 酵素固定化担体としての不織布繊維内部の利用

酵素固定化の技術開発は古くから様々な方法が検討されており、二次元フィルム (図1上段) あるいはメソポーラス構造体 (図1内であれば中段左の格子型) といった担体の表面へ固定化する方法、あるいは酵素同士を化学架橋することでマイクロ粒子化する方法 (図1下段中) などが知られている。酵素は基質分子へのアクセスを確保しなくてはならないために、溶媒に曝される形での利用が一般的である。しかし今回の研究目的のように様々な夾雑物の含まれる溶液に浸漬し利用する際には、夾雑物との相互作用により酵素活性が低下することが危惧される。

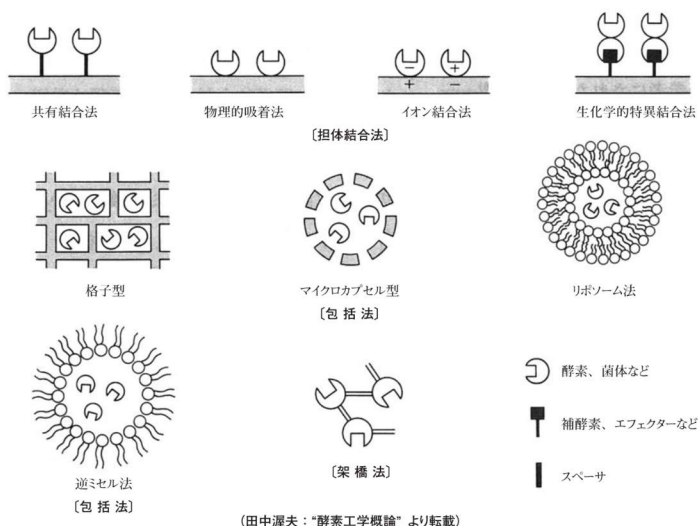


図1 酵素固定化技術の開発

この問題の解決方法として、最近我々の研究室では、架橋高分子からなる不織布ナノ繊維の内部への固定化方法に関して検討を進めている。具体的には、用いる高分子に後架橋可能な水溶性高分子を選択し、この高分子の架橋反応を進めつつ電界紡糸により不織布を作製することで、網目状の架橋高分子からなるナノ繊維の内部に酵素分子を変性させることなく固定化可能であることを明らかとしてきた (Langmuir, **32**, 221-229 (2016))。また網目状の架橋高分子を用いることで、酵素の働きを阻害しうるプロテアーゼなどの近接を物理的に防ぎつつ、比較的低分子の基質は繊維内部まで到達でき、その結果繊維内部の酵素分子との反応が十分確保可能であった。しかし、まだまだこのような目的に合致した不織布用の高分子部材の開発はほとんど報告例がないために、本研究では新たにポリアクリルアミド系高分子を開発し、本研究の研究目的となる、牛乳などの乳製品に一定時間接触させて乳糖を分解させる利用が可能となる、不織布型のラクターゼ固定化担体の開発を検討した。

2.2 蛋白質内包固定化不織布に利用可能な不織布部材の開発

ポリアクリルアミドゲルは、蛋白質の Native-PAGE の分離担体として利用されていることからわかるように、変性させることなく蛋白質を内包可能な部材である。そこで、ポリアクリルアミド系高分子を母材にした不織布作製が可能となれば、蛋白質をナノ繊維内部に固定化した不織布作製が可能と考えた。しかし、高分子鎖同士が既に架橋されて水に不溶となったゲルの状態では、電界紡糸はできない。そこで、脱水反応により

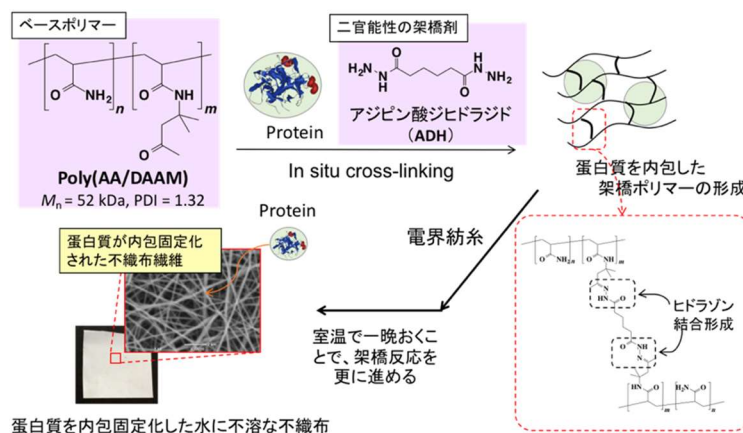


図1 Poly(AA/DAAM)をベースポリマーとして用いた蛋白質内包固定化不織布の作製スキーム

後架橋可能なポリアクリルアミド系高分子を準備し、二官能性架橋剤を加えて得られる架橋高分子を電界紡糸用の部材として用いることを考えた。具体的には、ポリ (アクリルアミド-co-ジアセトンアクリルアミド) 共重合体 (Poly(AA/DAAM)) をベースポリマー、二官能性架橋剤としてアジピ

ン

酸ジヒドラジド (ADH) を用いて得られる架橋高分子を用いることとした (図 1)。Poly(AA/DAAM)側鎖のケトン部位と ADH のヒドラジド部位の間の反応は、蛋白質表面の官能基とは反応しない生体直行反応の一つであり、高分子鎖同士の架橋反応による蛋白質へのダメージは低いと期待された。Poly(AA/DAAM)はアクリルアミド (AA) とジアセトンアクリルアミド (DAAM) の RAFT 重合により合成し、数平均分子量 5.2 kDa、分子量分散度 1.32、AA と DAAM の組成比が 8:2 のものを用いた。Poly(AA/DAAM)の 20 wt%溶液 (溶媒は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8)) に対して ADH (DAAM に対して 1/2 当量分) を添加し、こちらを電解紡糸して得られた不織布の SEM 画像を図 2 に示した。こちらより、直径 200 nm 程度のナノ繊維が集積した不織布が作製できていることが確認できた。そこで、次にこの不織布への蛋白質の内包固定化へと検討を進めた。

ラクターゼを内包して評価をする前に、まずは緑色蛍光タンパク質 (GFP) の内包固定化から検討を行った。これは GFP であれば、蛍光発光挙動への影響から、不織布繊維内部の蛋白質がどの程度変性を受けているかを評価しやすいためである。GFP 内包不織布の作製は、Poly(AA/DAAM)の 20 wt%溶液 (溶媒は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8)) に GFP (Poly(AA/DAAM)に対して、5wt%になる量添加した) を添加して均一溶液としたのち、ここに ADH (DAAM に対して 1/2 当量分) を添加し電解紡糸を行うことで行った。得られた不織布の蛍光発光の様子を図 3 に示した。こちらより、内包固定化された GFP に目立った変性は見られず、当初の目論見通り蛋白質を変性させることなくナノ繊維内部に固定化させることが可能な不織布部材の開発に成功したといえる。

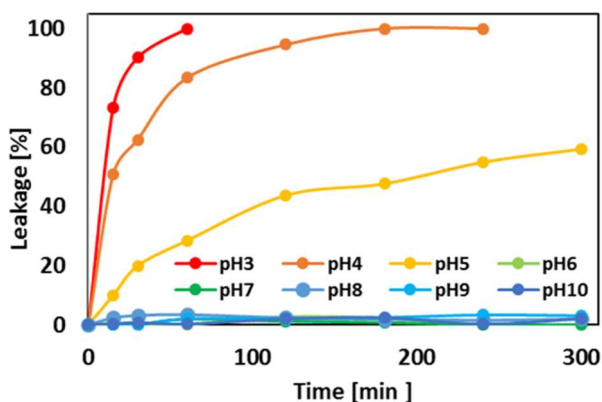


図 4 pH の異なる pH 緩衝液に浸漬した際の、内包固定化した蛋白質の漏洩挙動 (100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3~5)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 6~9)、100 mM 炭酸緩衝液 (pH 10))

所々で繊維同士に癒着が見られることも分かった (図 9 左にて後述する)。以上のことから、残念ながらこのままでは酵素固定化担体としては不十分であることが分かった。

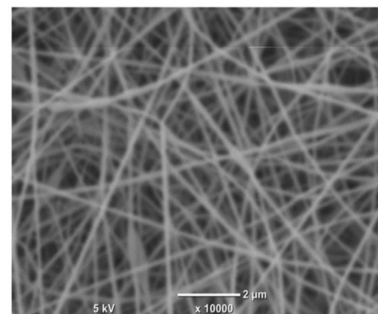


図 2 Poly(AA/DAAM)/ADH 不織布の SEM 画像 (加速電圧 5 kV、酸化オスミニウムをコートして測定)

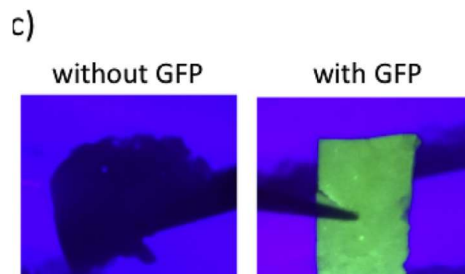


図 3 GFP を内包固定化した Poly(AA/DAAM)/ADH 不織布の蛍光発色挙動

一方で蛋白質の固定化担体としての産業利用を考えた時に、担体に固定化された酵素などの蛋白質が、浸漬した溶液に漏洩することは望ましくない。これは、酵素固定化担体の酵素活性の長期維持、漏洩した蛋白質による生体毒性の危惧などによる。そこでこの不織布担体の、異なる pH の緩衝液に浸漬にしたときの内包蛋白質の漏洩挙動に関して、次に検討を行った (図 4)。この結果、pH 6 以上の条件であれば、安定に保持できる一方で、pH 5 以下の弱酸性条件では、不織布の部材のそのものが溶解し、内包された蛋白質がすべてリリースされてしまうことが分かった。また SEM 測定により、バッファー浸漬後の構造変化を見たところ、

2. 3 コアシェル型の不織布の検討

全項での検討から、アクリルアミド系ポリマーである Poly(AA/DAAM)と ADH を組み合わせることで得られる架橋高分子は、蛋白質を内包固定化した不織布作製の部材として非常に優れていることが分かった。しかし一方で、水溶媒中での長期安定性に問題があった。そこでこの問題の解決法として、不織布のナノ繊維 1 本 1 本の表面を、疎水性の高分子でコートしコアシェル構造とする方法の検討を進めた。用いる疎水性高分子としては、電界紡糸が可能な高分子として知られるポリεカプロラクトン (PCL) を用いた。先程の、Poly(AA/DAAM)と ADH を組み合わせて作製する不織布の前駆体溶液をコア溶液、PCL の 8 wt% トリフルオロエタノール (TFE) 溶液をシェルの前駆体溶液とし、コアシェルスピナレット (図 5 左) という 2 つの前駆体溶液を二層構造にして同時に吐出可能なスピナレットを用いて電界紡糸を行った (図 5)。その結果得られた不織布の SEM 画像と、TEM 画像を図 6 に示した。こちらの結果より、Poly(AA/DAAM)と ADH の反応で得られる架橋高分子のナノ繊維を、疎水性の PCL でコートしたコアシェル型不織布が確かに作製できていることが確認された。そこで次に、このナノ繊維のコア部分への GFP の内包固定化と、異なる pH の緩衝液に浸漬した際の漏洩挙動に関して、次に検討を進めた。まず、図 7 に GFP をコア部分に内包したコアシェル型不織布の発色挙動を示したが、シェル部分を導入することで、内包されている GFP に対し特に目立った変性を及ぼすことはないことが分かった。次に、異なる pH の緩衝液に浸漬したときの内包蛋白質の漏洩挙動に関する結果を図 8 に示した。こちらの結果より、外側に疎水性の PCL をシェルとして加えることで、あらゆる pH において、内包された蛋白質の漏洩を完全に抑えることが可能となることが分かった。

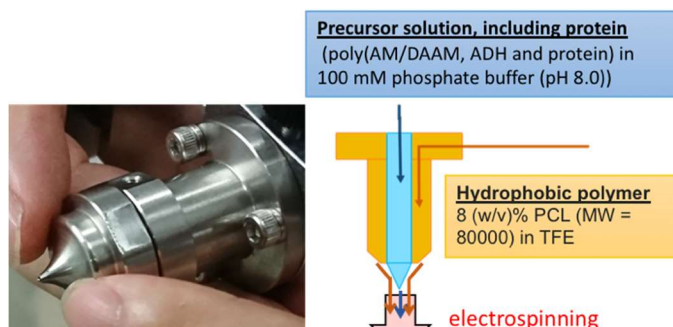
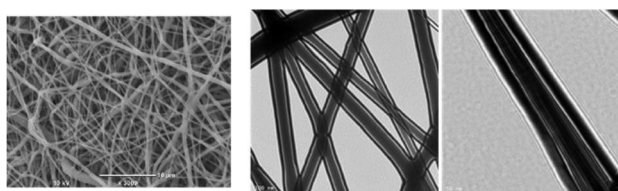
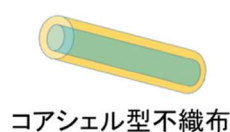


図 5 コアシェルスピナレットの構造 (左) と各前駆体溶液の吐出状態の模式図 (右)



520 ± 86 nm コアとシェルの厚みの比~5:1

図 6 コアシェル型不織布の SEM 画像と TEM 画像

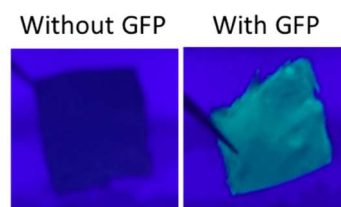


図 7 GFP をコア部分に内包したコアシェル不織布の蛍光発色挙動

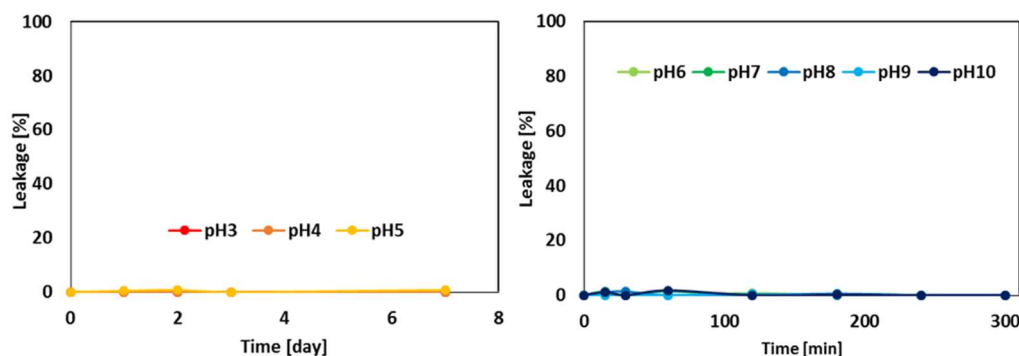


図 8 pH の異なる pH 緩衝液に浸漬した際の、内包固定化した蛋白質の漏洩挙動 (100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3~5)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 6~9)、100 mM 炭酸緩衝液 (pH 10))

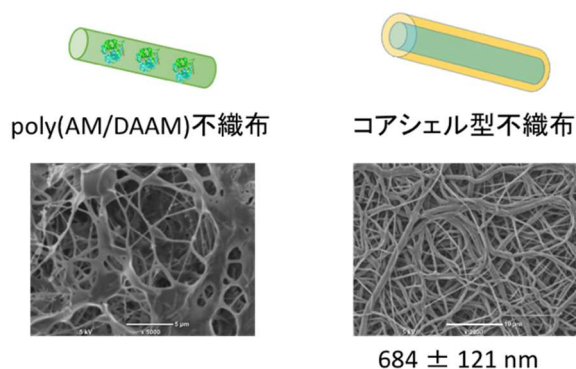


図9 pH緩衝液(pH 8)に6時間浸漬後の各不織布のSEM画像(左がPoly(AM/DAAM)不織布、右がコアシェル型不織布)

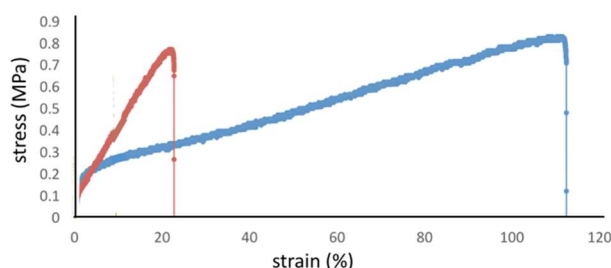


図10 Poly(AM/DAAM)不織布(測定できなかったためプロットデータはない)とコアシェル型不織布(茶色)、PCLのみからなる不織布(青色)の引張試験結果(50 μm程度の厚みのサンプルで比較を行った。Poly(AM/DAAM)不織布については、構造的に脆いために測定結果が得られなかった)

前項までの検討から、コア成分にPoly(AA/DAAM)とADHの反応で得られる架橋高分子、シェル成分にPCLを用いることで、蛋白質を変性させることなくコア部分に蛋白質を内包固定化したコアシェル型不織布の作製が可能となることが分かった。また、PCLでナノ繊維表面を覆うことで、広いpH範囲において繊維のナノ構造が安定化され、かつ十分な力学強度を持たせることも可能と分かった。そこで本項では、具体的にラクターゼを固定化した不織布の作製を行い、酵素活性の評価を行った。ラクターゼの基質にはラクトースの疑似基質となるp-ニトロフェニル-β-D-グルコシド(図11右)を用い、酵素反応の進行に伴い脱離するニトロフェノールの吸光度変化を追うことで、酵素活性の定量的評価を行った。得られた酵素活性を比較したデータを、表1にまとめた。酵素活性は、1 mgの酵素が1分間に分解できる基質分子のモル量(nmol)と定義し比較を行ったところ、ラクターゼを単にバッファー溶液に溶解した際に観測される酵素活性(7.73 nmol/(min•mg))の約86%に相当する5.38 nmol/(min•mg)の酵素活性が観測された。当初、PCLという疎水性のシェルで覆っていることで、基質分子のアクセスが大きく阻害され、結果的に大きな酵素活性の低下が危惧されたが、意外なことに高い基質浸透性に基づく、非常に高い酵素活性(正確には、内包固定化された酵素は変性していないため、見かけの酵素活性)の維持が見られた。このような現象が観測された原因としては、現在のところPCL部分の膜厚が20~50 nm前後と非常に薄いことが関係していると我々は考えている。

続いて、バッファー中での長期安定性と力学的強度に関して検討を進めた。その結果を図9、図10に示した。その結果、Poly(AM/DAAM)不織布については、6時間程度のバッファー浸漬で明らかな繊維同士の癒着が見られ始めたのに対し、コアシェル型不織布については1ヶ月以上のバッファー浸漬後においても、ナノ繊維構造が十分に維持されることが分かった(図9)。また興味深いことに、コアシェル型不織布についてはバッファー溶液浸漬前と比べて若干の繊維径増加が見られ、繊維内部へ溶媒が十分に浸透できていることも示唆された。またこれまでに言及してこなかったが、Poly(AA/DAAM)不織布は、引っ張った時に容易にちぎれてしまうという構造的な脆さに問題があったが(図10の測定において、測定値が得られなかった)、引張試験の結果より、PCLでコートしコアシェル型不織布としたことで、PCLのみで作製された同じ厚みの不織布までとはいかないまでも、十分な力学的強度を付与することにも成功した。

2.4 ラクターゼ固定化不織布の作製と酵素活性の評価

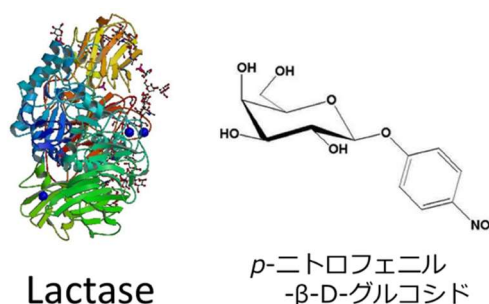


図11 ラクターゼの構造とラクトースの疑似基質として用いたp-ニトロフェニル-β-D-グリコシドの構造

表 1 ラクターゼの見かけの酵素活性の比較

	酵素活性 (nmol/(min.・mg))	Buffer に溶解した場合との 酵素活性の比較
In buffer	7.73	100
コアシェル型不織布	5.38	86

2. 5 コアシェル型不織布の生体毒性の評価

生体毒性の評価は、哺乳類細胞に対して細胞毒性が見られるかどうかにより判断を行った。PCL は細胞接着性のある高分子として知られており、もし今回検討しているコアシェル型の不織布に生体毒性がみられない場合には、不織布上に哺乳類細胞が十分に接着し、増殖することが予想された。用いる細胞には、骨芽細胞のモデル細胞として用いられるヒト骨肉腫由来の SAOS-2 細胞を用い、これを不織布サンプル上に播種後、1、3、5、7 日後の細胞数を MTT アッセイにより評価した。また、毒性を受けずに正常な形態で増殖が起こっているかの確認のため、増殖後の細胞について、アクチン繊維を FITC-ファロイジン、核を DAPI で染色後共焦点レーザー顕微鏡による観察も行った。その結果を図 1 2、図 1 3 に示した。図 1 2 では、PCL のシェル部分がない Poly(AA/DAAM) 不織布についても検討を行ったが、いずれも 7 日目にかけて細胞増殖が見られ、いずれの不織布についても、細胞毒性が見られないことが分かった。また、図 1 3 の共焦点レーザー顕微鏡観察画像からも、正常な形態での細胞の増殖が確認され、以上のことから、今回検討を行ったコアシェル型不織布は細胞毒性を持たないことが明らかとなった。

2. 6 まとめ

本来であれば、今回開発を行ったラクターゼ固定化不織布を牛乳などの乳製品に浸漬し、具体的にラクターゼ濃度がどの程度まで減少しているかの定量的な評価まで行うべきであったが、時間的にそこまでの検討には至らなかった。しかし、今回新たに開発を行った、後架橋可能なアクリルアミド系高分子 Poly(AA/DAAM) と ADH の反応により得られる架橋分子をコアに、疎水性高分子である PCL をシェルに用いたコアシェル型不織布が、あらゆる pH の溶液に浸透した際にも酵素を漏洩させることなく安定に保持できること、力学的に十分な強度を持つこと、繊維内部に固定化しているにもかかわらず、十分な酵素活性が維持されることなど、新規の酵素固定化担体としての有用性を見いだせたことは、今後の産業利用を十分に期待させる結果と自負している。今後の企業側からの、具体的な利用方法の提案に期待したい。

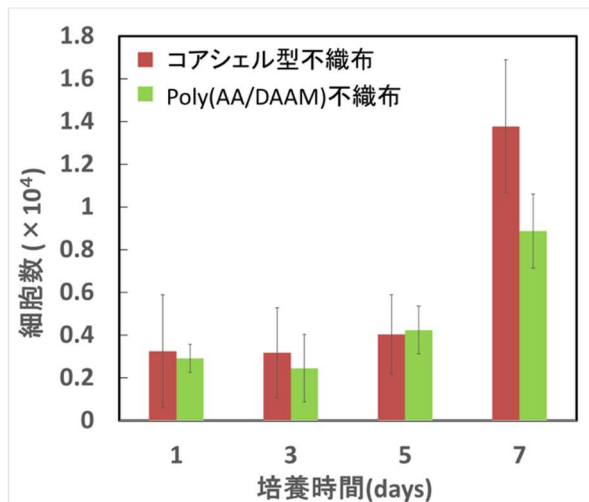


図 1 2 SAOS-2 細胞を各不織布に播種後の細胞数の変化 (培地 (DMEM 培地) は 3 日毎に交換を行った。各不織布を 18 mm のカバーガラスに両面テープで貼り付け、これを 24well プレートの底面に設置して評価を行った)

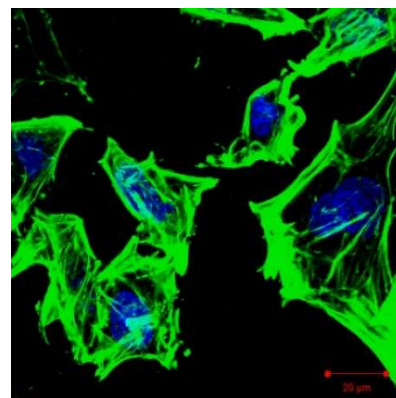


図 1 3 コアシェル型不織布上で増殖した SAOS 細胞の形態観察