放射線重合を利用した酵素の固定化

嘉 悦 勲*

1. 緒 言

酵素の固定化は、1960年代から活発に研究され始め、現在各国で盛んに研究が進められている。1969年には日本で、固定化アミノアシラーゼによる DL-アミノ酸の光学分割が工業化されており、近年実用化の試みも活発になっている。千畑らの定義によれば¹⁾、固定化酵素とは、ある一定の空間内に閉じ込められた状態にあり、連続的に酵素反応を行ない、かつ反応後酵素を回収して再利用できる状態にある酵素のことであり、これは包括型酵素と結合型酵素に分類される。前者は包括法（酵素を水に不溶性の高分子などの担体によって包み込み閉じ込める方法）によって作られ、後者は担体結合法（酵素を水に不溶性の担体に、共有結合やイオン結合によって化学的に結合したり吸着させたりする方法）で作られる。

固定化の技術で最も重要な問題になるのは、いかにもとの酵素の活性を損なわずに、かつその持続性（安定性）が大ききように固定化するかという点である。担体結合法、特に共有結合法は固定化効果の持続性が大きいので熱心に試みられているが、固定化条件の設定がむずかしいといわれている。一方、包括法は、酵素を物理的に閉じ込める方法なので、担体の構造を工夫すれば比較的高い活性を保って強固に固定化することも困難ではない。酵素以外の有効な補助成分を酵素とともに包括して活性を高めたり、複数成分より成る比較的複雑な酵素反応系をそのまま固定できる可能性があることも包括法の魅力である。包括の方法としては、これまで格子型とマイクロカプセル型が知られており、それぞれ網目構造化した高分子ゲルおよび高分子のマイクロカプセルの中に酵素を閉じ込める方法である。これらの方法は、重合・橋かけなど高分子化学の諸技術を適用する余地の大きいものであり、現在種

々の新しい試みが流動的に発展途上にあって、後述するようにすでに格子法などの概念からは、かなり隔たった技術に発展を遂げていると考えられる。また近年、この分野への放射線や光の利用が試みられるようになった。放射線などの手段によれば、比較的低温でも橋かけや重合反応を行なうことができ、一般に酵素は熱に不安定なものが多いことを考えると有力な方法と思われる。本稿では、包括法による酵素の固定化に話題を限定して、筆者らが行なっているガラス化性モノマーを用いた低温放射線重合による固定化法を中心に、放射線反応を利用した固定化の研究の現状と問題点にふれてみたい。

2. 均質ゲルによる包括固定化（格子型包括法）

均質なポリマーゲルの網目構造の中に酵素を閉じ込める方法として、橋かけ法（酵素と水溶性ポリマーの混合液を作りポリマーを橋かけする）と重合法（酵素と水溶性モノマーの混合液を重合させる）とが知られている。重合法で早くから行なわれた方法は、アクリルアミドと橋かけ剤である多官能性モノマー（メチレンビスアクリルアミドなど）を酵素水溶液に溶解してレドックス触媒により重合させる方法である。

1963年に Bernfeld ら²⁾が最初にキモトリプシン、パペインなどの固定化について、この方法を試み、1960年代末に千畑らがアミノアシラーゼについてこの方法で工業化を達成している。これらの方法ではレドックス系開始剤を用いるので、常温でも重合が可能であるが、その後より低温で固定化して酵素の活性収率（もとの酵素の活性を100として固定化酵素がその何%の活性を示すかという値）を高めようとして放射線重合が試みられた。すなわち1970年に Dobo³⁾がアクリルアミド-ビスアクリルアミドとトリプシンの混合水溶液に0°CでX線を照射して固定化したのが最初であり、その後、前田ら⁴⁾、川嶋ら⁵⁾によってガンマ線照射による固定化の研究が行なわれた。しかしながら、モノマー系を低温に凍結すると、水やモノマーの結晶化が起こりやすい。アクリルアミドの場合

* Isao KAETSU 日本原子力研究所 高崎研究所 (370-12 群馬県高崎市綿貫町 1233) 開発試験場 第3開発室長代理

Immobilization of Enzymes by Radiation-Induced Polymerization

—20°C 以下の結晶状態では照射中の重合（インソース重合）はほとんど起こらず、照射後反応系を昇温した時に照射中に蓄えられた活性点によって後効果重合が起こる。酵素活性に対する照射の影響を少なくするには線量が少ないことが望ましいが、後効果重合では重合速度や橋かけ密度が不足し、酵素を有効に固定できない場合が多い。こうした場合、固定化酵素を用いて酵素反応を多数回あるいは長期間繰り返しているうちにポリマーの溶解や膨潤が進み、担体からの酵素の離脱が著しく起こるようになる。このため、川嶋ら⁹⁾によってアクリルアミドと多くのモノマーとの多元共重合が探索され、改善された系が見いだされているが、触媒法による包括固定化物の活性（活性収率 50～60%）を顕著に凌駕するものは得られるに至っていないようである。福井ら⁷⁾は、ポリエチレングリコールジメタクリレート系統の光硬化性変性モノマーのオリゴマーと、酵素や菌体との混合液に光を短時間照射して固定化する方法を提案しているが、詳細は明らかでない。

橋かけ法に関しては、前田・山内ら⁸⁾によりポリビニルアルコールとグルコアミラーゼ・インペルターゼなどとの混合水溶液にガンマー線や電子線を照射して、ポリマーを橋かけさせ、固定化する方法が研究されている。酵素の散逸や脱離は少ないが、重合法に比べ比較的大きい照射線量を必要とするので、放射線による失活を防ぐことが今後の課題であろう。

岡村ら¹⁰⁾は、可溶化処理を行なったコラーゲンとβ-チロシンナーゼ菌体の水溶液にガンマー線を照射してコラーゲンを橋かけさせ、チロシンナーゼを固定化している。これらの橋かけ反応は、いずれも常温でポリマーの水溶液を照射することによって行なわれているが、これを低温で凍結して（水の一部を結晶化させて）

橋かけすればどうなるかは興味深い。酵素が低温ほど放射線により失活しにくいこともある。しかしさらに重要な理由がある。一般に均質ゲルによる格子型包括法の欠点は、基質がポリマーゲルの格子内部に閉じ込められている酵素のところまで拡散しなければならないので、これが酵素反応の律速段階になり、反応を促進するには試料を粉碎、皮膜化など何らかの形で処理して基質拡散のための表面積を増加させてやらねばならないことである。しかるに前述の包括法のうち低温重合による方法では、水やモノマーの結晶化のため重合相はすでに不均一相化しており、生成した重合体には凍結した成分の融解などによって著しい多孔質構造が賦与されている。この多孔質構造が基質の拡散に好都合な表面積を提供していることは明らかである（第1図）。低温重合によれば、酵素をより安定に固定化できることはもとより、相構造の工夫設計によってみかけの酵素反応性を高める効果が期待できる。これは放射線を用いないと有効に研究できない分野であろう。これまでの方法では、この放射線の特徴と利点をまだ十分にいかしきっていないと感じられる。その主たる原因は、低温でモノマーが結晶化して十分な重合反応性が与えられないことにあると考えられる。このような問題点を解決する方法として、筆者らはガラス化性モノマーを用い、低温過冷却状態で酵素の固定化の研究を進めているので、これについて紹介してみたいと思う。

3. 不均質ゲルによる包括法固定化

ある種のモノマーは、低温で結晶化しにくく、容易に安定な過冷却状態になり、ガラス転移点（ T_g ）以下ではガラス状態となる。実際には、主鎖にエーテル結合を含んでいたたり、側鎖に比較的高いエステル残

(A) 300 倍

(B) 3,000 倍

モノマー：ヒドロキシ
エチルメタクリレート
30% 濃度
酵素：グルコースイソ
メララーゼ
照射条件： 1×10^6 レン
トゲン， -78°C

第1図 水溶性ガラス
化性モノマーの低温ガ
ンマー線重合により得
られた固定化物の多孔
性構造
(走査型電顕写真)

基をもっているアクリレートやメタクリレートの多くがこのようなモノマーに属し、筆者らはこれをガラス化性モノマーと呼んでいる。筆者らが行なった基礎研究の結果¹⁰⁾、ガラス化性モノマーの特徴は、 T_g に近づくにつれ、指数函数的にモノマーの粘度が増大することであり(T_g では非晶性の固体になる)、そのため低温で重合させると停止反応が著しく抑制されて、低温にもかかわらず大きな重合速度と高い分子量が得られることが見いだされた。 T_g 近傍では成長反応が抑制されるためインソース重合の速度は低下するが、活性点の寿命は長いので後効果重合性も非常に大きい。

筆者ら¹¹⁾は、まず水溶性のガラス化性モノマーとしてヒドロキシアルキルメタクリレート、ポリエチレングリコールジアクリレート、メトキシポリエチレングリコールメタクリレートなどを選び、低温ガンマー線重合によって、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースイソメラーゼ、セルラーゼなどの固定化を試みた。示差熱分析の結果によれば、低温でのモノマーと酵素水溶液の混合物の相構造は、水の大部分が結晶化し、モノマーの大部分は過冷却状態で存在する一種のサスペンションであることがわかった。このような系での酵素の所在については放射化分析などの方法で解明を検討中であるが、酵素は氷から遊離して、一部は水とともにモノマーの過冷却相に溶解し、一部は分散媒であるモノマーの表面に分散していると推定される。このような状態で放射線重合を行なうと氷が占めていた空間部分が空孔になり、モノマーと水の組成比にしたがって多孔性構造が変化する。すなわち、モノマー濃度が小さい場合はポリマーはきわめて多孔性に富んでおり、最初の酵素反応では活性が大きい、反応を繰り返すにつれて酵素の脱離が起こって活性がしだいに低下する。モノマー濃度が増加すると多孔性は減少し、活性そのものは低くなるが、経時的な活性の低下はほとんど起こらなくなる。このように、基質の拡散のための表面積を大きくすることと、包括されるものの固定を強固にすることの間に矛盾する要素があるが、マトリックスポリマーの多孔性構造は、凍結速度を変えたり、水の一部を溶媒で置き換えたり、マトリックスポリマーの水あるいは溶媒との親和性を共重合によって変化させたりして、高分子化学の手法を駆使することにより調節することができる。この方法で適当なバランスを設定された固定化組成物は、触媒法や従来の放射線包括法で得られたものより、優れた活性やその持続性を示すことが認められた(第2図)。これは、ガラス化性モノマーの優れた低温重合性と、ガラス化性モノマーが低温で高粘度の連続分散媒あるいは液滴になり、結晶状態のモノマーに比べ酵素を捕

酵素： α -アミラーゼ，モノマー：ヒドロキシエチルメタクリレート，30% 濃度

線量率= 1×10^6 r/hr

●照射温度： -24°C

○照射線量： 1×10^6 レントゲン

第2図 低温ガンマー線重合による固定化の照射条件と得られた固定化物のみかけの活性収率との関係

捉しやすいことによるものと考えられる。

ここで重要なことは、このような固定化方法は、包括法として出発しながら、もはや格子型包括法概念とは著しく異質の技術になってしまったことである。サスペンションに近い不均一状態の重合で固定化するので、酵素は均質なマトリックスゲル内部の格子あるいは網目構造の中に閉じ込められるのではなくて、空孔表面積に富むマトリックスポリマーの表面に捕捉される場合が多いと考える方が自然である。マトリックスとしては、ポリアクリルアミドなどに比べてはるかに親水性の小さい材料(モノマーでは水に溶けるがポリマーは水から析出する)が選ばれており、極端に言えば網目構造はマトリックスにとって必要ではない。このような考え方を徹底させてゆくと、これまでの酵素の包括では常識になっていた親水性ポリマーや水溶性モノマーを材料として用いなければならないという制限は必要条件ではなくなってくる。モノマーと酵素水溶液を混合する時は均一溶液であっても、凍結する時はモノマーと水はほぼ完全に相分離してしまうので、モノマー系を均一系に設計することはそれほど意味がない。このような観点から、筆者らは疎水性のガラス化性モノマーを用いて酵素水溶液とのサスペンションを作り、これを凍結して低温放射線重合により有効に固定できるかどうかを調べた。

酵素：グルコースイソメラーゼ，
照射条件： 1×10^6 レントゲン， -78°C
酵素反応条件： 65°C ，1時間
モノマー：

- ブチレングリコールジメタクリレート
(疎水性) 30% 濃度
- ブチレングリコールジメタクリレート
(疎水性) 15% 濃度
- △ ヒドロキシエチルメタクリレート (親
水性) 30% 濃度
- ▲ ヒドロキシエチルメタクリレート (親
水性) 10% 濃度

第3図 低温ガンマー線重合により得られた固定化酵素のみかけの活性収率と繰り返す酵素反応回数との関係

4. 疎水性モノマーを用いた固定化

疎水性モノマーの種類は水溶性モノマーのそれよりもはるかに多いので、低温重合による固定化を疎水性モノマーに拡張できれば、固定化方法としての一般性が大きくなると考えられる。筆者ら¹²⁾はグリンジルメタクリレート、ベンジルメタクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、疎水性のヒドロキシアルキルメタクリレート、ポリエチレングリコールジメタクリレートなどを用い、グルコミラーゼ、グルコースイソメラーゼなどのサスペンションを凍結状態で重合させて固定化の効果を調べたところ、水溶性モノマーを用いて固定化を行なった場合よりもはるかに優れた活性を示すことがわかった。活性収率は80~90%以上に達するが、特に顕著な特徴は、水溶性モノマーによる固定化の場合には、モノマー濃度が低い時、酵素反応の繰り返しによる経時的な活性低下が認められたのに対し、疎水性のガラス化性モノマーによる固定化の場合にはモノマー濃度のいかんにかかわらず経時的な活性の減少はほとんど認められないことである(第3図)。重合物は100~200 μ の粒子状ポリマーとし

て得られ、水溶性モノマーを用いた場合の固定化物のようなスポンジ状の多孔性ゲルではない。活性が高いのは表面積が顕著に増加したためと考えられるし、経時的な活性低下がほとんどないのは多孔性構造が少ないので空孔に遊離した酵素の脱離がないためと考えられる。現実には高い活性が保たれていることから、酵素はこのような疎水性ポリマー微粒子の表面に捕捉されていると考えざるをえない。固定化の機構については水溶性モノマーによる固定の場合と併せて今後解明していきたいが、固定化物の表面積を問題にするなら、懸濁重合は最も好適な手法の一つといえよう。要は酵素をいかに均一にかつ捕捉されやすい形状で分散媒であるモノマーに接触させるかがポイントであろうと考えられる。場合によって、酵素自体を分散あるいは捕捉されやすいようにあらかじめ修飾しておく(予備的担体に吸着あるいは凝集するなど)ことも有効な方法であろう。

5. 結 言

高分子による広義の固定化技術は、今後の興味ある研究分野と考えられるが、酵素の固定化の場合、包括される酵素の溶出(脱離)は禁物であり、基質および生成物の拡散のみが要求される。これに対し薬用物質や生理活性物質などを固定化する場合は、包括されるものの適当な速度での溶出が必要とされる。後者では格子型包括が適当と思われるが、前者では本稿で述べてきたように、格子型包括はむしろ適当でなく、もっぱら表面積を大きくする包括技術が重要であろう。

本稿では、固定化に当たっての酵素化学的な要件にはほとんどふれていない。もともと包括法が物理的に酵素を閉じ込めるだけの固定化方法であるため、ここまでは酵素化学的な側面に立ち入ることなく高分子の技術のみで問題を解決することができた。しかし、緒言でもふれたように、包括法の特徴は、補酵素や安定剤などを取り入れてもとの酵素以上の活性を賦与したり、多元酵素系や生体内の複雑な生化学的機能システム(例えばオルガネラなど)を高分子担体の中に取り込むことが、他法に比べ比較的实现しやすいのではないかという期待がもたれるところにある。包括技術が立体的な構造効果を含めてより精緻なものになれば、固定化によって基質特異性・耐熱性などを有利に変えうることも考えられる。そのへんからが高分子化学と酵素化学の実際的な境界領域になるので、種々の分野の専門家が話し合う場がますます必要になってくるであろう。

筆者は、包括法を中心にした広義の固定化技術は、モノマー系やポリマー系の相構造と材料の機能性と

関係を追求してゆくことができるので、低温・固相重合の応用に関する好個のテーマと考えている。本稿では割愛したが、担体結合法による固定化の分野では、放射線を利用した方法として、合成高分子の幹に酵素と反応しやすい官能基をもったモノマーをグラフトし、これに酵素を結合させる方法があり、Hoffmanら¹³⁾、Gaussensら¹⁴⁾によって研究が進められている。包括法と並んで今後の研究の進展が期待される。

文 献

- 1) 千畑一郎編：固定化酵素，講談社（1975）
- 2) P. Bernfeld, J. Wan: *Science*, **142**, 678 (1963)
- 3) J. Dobo: *Acta. Chim. Acad. Sci. Hung.*, **63**, 453 (1970)
- 4) K. Kawashima, K. Umeda: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 609 (1974)
- 5) 前田英勝，山内愛造，鈴木英雄：日本農芸化学会昭49年度大会講演要旨集，p 137
- 6) K. Kawashima, K. Umeda: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 599 (1975); K. Kawashima, K. Umeda: *Agr. Biol. Chem.*, **40** [6] 1143 (1976)
- 7) 福井三郎，田中渥夫，飯田高三：日本農芸化学会昭51年度大会講演要旨集，p 410
- 8) H. Maeda, H. Suzuki, A. Yamauchi: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 607, 827 (1973)
- 9) 日野常稔，岡村誠三：未発表
- 10) I. Kaetsu, H. Okubo, A. Ito, K. Hayashi: *J. Polymer Sci., A-1*, **10**, 2203 (1972); *J. Polymer Sci., Polymer Chem. Ed.*, **11**, 1149 (1973)
- 11) 吉田 勝，熊倉 稔，嘉悦 勲：日本農芸化学会昭51年度大会講演要旨集，p 384, 385
- 12) 嘉悦 勲：第10回反応工学講演会講演要旨集，高崎（1976年10月）
- 13) S. Venkataraman, T. A. Horbett, A. S. Hoffman: *J. Molecular Catalysis*, in press
- 14) K. O. Tran, J. Berthet, G. Gaussens: unpublished data

（187 頁より続く）

5. お わ り に

以上の解析結果をまとめたものが第2表であるが，常温塑性加工に適した材料とはどのような変形特性を持つものか，という問いに対して，不十分ながら答えていると思う。一方，ではこのような変形特性を持つプラスチックとはどんな構造のものか，それをどうやって作るのかという問題に対しては著者は答を持ち合わせていない。

文 献

- 1) 例えば，塑性加工研究会プレス便覧編集委員会，プレス便覧，丸善（1958）
- 2) 日本塑性加工学会 プラスチックの塑性加工分科会：塑性と加工，**17**, 253 (1976)
- 3) 石黒省爾，馬場秋次郎：第22回塑性加工連合講演会論文集，61 (1971)
- 4) 例えば，R. Hill：塑性学，鷺津久一郎，山田嘉昭，工藤英明訳，培風館（1954）
- 5) 牧野内昭武：機械学会誌，**75**, 568 (1972)
- 6) 牧野内昭武，前田禎三，藤原国生：塑性と加工，**11**, 332 (1970)
- 7) 楯列俊夫，戸上久和，斉藤浩一：同上，**17**, 271 (1976)
- 8) D. R. Mears, K. D. Pae: *J. Polymer Sci., B*, **7**, 349 (1969)
- 9) 上野昭一，大江 武，山崎博章，伊藤勝彦：材料，**15**, 254 (1966)
- 10) 前田禎三，大塚宣夫，牧野内昭武：塑性と加工，**10**, 598 (1969)
- 11) 牧野内昭武，前田禎三：同上，**10**, 656 (1969)
- 12) 牧野内昭武，前田 禎三，吉田 清太：第20回塑性加工連合講演会論文集，153 (1969)
- 13) 牧野内昭武：塑性と加工，**17**, 140 (1976)
- 14) 牧野内昭武：同上，**17**, 282 (1976)