バイオ/カーボンナノマテリアル—メソポーラスカーボンへのリゾチームの吸着挙動—

宮原 雅彦^{*1}・Ajayan VINU^{*2}・中西 尚志^{*1,*2}・有賀 克彦^{*1}

(受付 2004 年 5 月 31 日・審査終了 2004 年 8 月 16 日)

要 旨 メソポーラスカーボン(MC)への lysozyme(Lz)の吸着挙動について, pH および孔径依存性を調べた. MC として CMK-3 を用い, pH を変えて(pH=6.5~12)吸着量を調べたところ, Lz の等電点(pI=10.8)付近で極大を示した. この結果は, Lz の MC への吸着には Lz 間および表面と Lz との間の疎水性相互作用が重要であることを示唆する. また CMK-3 よりも孔径の小さな CMK-1 を用いると, 吸着量が著しく減少する結果が得られ, 細孔の大きさの選択によりタンパク質の吸着を制御できることが明らかとなった. 吸着後の MC および Lz の構造を XRD, N₂ 吸着, IR により検討した. 吸着による MC 構造の変化や Lz の変性は無視しうることが確認できた.

1 結 言

近年, 環境を配慮したグリーンケミストリーに基づき, 化学合成における酵素・微生物などの生体触媒の利用, 均一系触媒から不均一系触媒(固体触媒)への置き換えなどが注目されている. また, バイオセンサー・疾病の診断などへの応用に対しても, 生体物質の固定化が重要視されている. これまでにゾル-ゲル法で得られるガラスなどの多孔性物質へのタンパク質の吸着^{1)~3)}が行われているが, 細孔のサイズ分布が不均質, コストが高いなどの問題点があった.

それに対し, ゼオライトに代表されるマイクロ細孔(直径 0.3~2 nm)型の多孔性材料は, 大きな比表面積, 均一な孔径および規則性の高い細孔配列を有し, 吸着材や触媒の担体として有望視されている^{4),5)}. しかしながら, これらの担体はタンパク質などの大きな分子の吸着固定には適さない. 一方, 1990 年代初頭に発見された^{6),7)}メソポーラスシリカ(MS)に代表されるメソポーラス物質も, 高い比表面積, 均一な孔径, 規則性の極めて高い細孔配列を兼ね備えている. 特に注目すべきことは, メソ細孔(直径 2~50 nm)内にはマイクロ細孔では吸着できないような大きな分子でさえも吸着できることである. たとえば Vinu ら⁸⁾は MS へのニワトリ卵白 lysozyme(Lz)の吸着を例示している. そこでは, pH が吸着量を制御する重要な要因であることが明らかにさ

れ, 吸着過程では Lz 間だけでなく固体表面と Lz との間の静電相互作用の寄与も示唆されている. 固定化担体との静電相互作用によるタンパク質の変性はしばしば問題となり, 上記の系ではその可能性を完全には排除できない. また MS は Si-O-Si 結合の加水分解のために水溶液中(特に高 pH)では不安定であり, MS はタンパク質の吸着材としては必ずしも適切とはいえない.

一方, メソポーラスカーボン(MC)は, メソポーラスシリカ(MS)を構造鋳型に用いて合成される⁹⁾. MC は大きな比表面積, 空孔体積, 均一な孔径, 高い電気伝導度などの特徴をもつことから, 触媒・吸着材・電極・コンデンサーなどへのさまざまな応用が期待される. しかしながら, MS においてすでに検討されているアミノ酸¹⁰⁾, ペプチド^{11),12)}, タンパク質^{13)~16)}などの生体物質の固定化担体としての利用は, その潜在能力の高さにもかかわらず MC については未開拓のままである. 特に, 表面にはほとんど解離基をもたない MC は, 吸着物質としてタンパク質や酵素を用いた場合でも, その静電相互作用に伴う変性の可能性は低い. 加えて, MC は MS のような加水分解を起こさないため, 種々の水溶液条件下での応用に適している.

上述の研究背景より, 本報では MC への Lz の吸着を検討した. ここでは吸着材 MC として CMK-1 と CMK-3 を用い, 特に Lz の吸着挙動の pH および孔径依存性を調べた. モデルとして用いる lysozyme(Lz)は加水分解酵素であり, その構造, 機能とともに最もよく知られているタンパク質の一つである¹⁷⁾. 概略としては, 分子量 14400 をもつ偏長球状(4.5×3×3 nm)のタンパク質であり, 内部の四つのジスルフィド結合のため固

^{*1} (独)物質・材料研究機構物質研究所(☎305-0044 つくば市並木 1-1)

^{*2} (独)物質・材料研究機構若手国際研究拠点(☎305-0044 つくば市並木 1-1)

く、また熱や pH に安定な酵素として知られる¹⁸⁾。Lz は糖鎖に対する加水分解活性をもち、メソポーラス物質に固定化することにより基質選択性の高いリアクターなどの新規ナノバイオマテリアルとしての応用も期待できる。

2 実 験

2.1 試料

バッファの調製に用いたリン酸カリウム、炭酸ナトリウム、塩化カリウム、水酸化ナトリウム(Wako Pure Chemicals Industries, Ltd. 製)および Chicken egg white lysozyme (E.C. 3.2.1.17) (Sigma 社)は、購入したものをそのまま使用した。今回用いた 2 種類の MC(CMK-1, CMK-3)は、それぞれ MS である SBA-15 および MCM-48 を鋳型に用いて合成した。MS の合成法^{19),20)} および MS を鋳型とする MC の合成法¹³⁾についてはすでに報告されている方法を用いた。

2.2 測定

lysozyme の吸着 Lz を 25 mM バッファ (pH = 6.5 リン酸カリウム, pH = 9.6, 11 炭酸ナトリウム, pH = 12 塩化カリウム)に溶解させ、種々の濃度 (17.4~139 $\mu\text{mol/L}$) の Lz 溶液を調製した。MC 20 mg に対し Lz 溶液 4 g を加え、吸着平衡となるまで (96 時間) 293 K に保ちながら振とうさせた。その後、遠心分離により MC を除いた溶液について UV (281.5 nm) の吸収を測定し、吸着した Lz の量を求めた。

吸着後の構造 Lz 吸着前後の CMK-3 に対し、粉末 X 線回折 (XRD)、窒素の吸着等温線測定および FT-IR 測定を行った。それぞれ装置として Siemens D5005 回折計 (Cu-K α 線)、Quantachrome Autosorb 1 sorption analyzer, Nicolet Nexus 670 を用いた。窒素吸着は 77 K において測定を行い、比表面積は BET 法により決定した。吸着後の試料としては、吸着量が十分に飽和している 69.5 $\mu\text{mol/L}$ の Lz 溶液 (pH = 11) による Lz 吸着実験後の CMK-3 を用いた。

3 結果および考察

3.1 Lz の吸着量

吸着実験前の CMK-1 および CMK-3 の細孔に関するパラメータを Table 1 に示した。両 MC ともに、細孔の

体積は約 1.1 cm^3/g であるが、孔径は CMK-3 が Lz の大きさと同程度の 3 nm に対し、CMK-1 はそれよりも小さな約 2 nm であった。

吸着実験より得られた、異なる pH における Lz の CMK-3 への吸着等温線を Figure 1 に示す。すべての pH において Langmuir 型の吸着挙動が見られた。Figure 1 における実線は、次式の Langmuir の吸着等温式により実験値のフィッティングを行った結果を示している。

$$n_s = \frac{Kn_m c}{1 + Kc} \quad (1)$$

ここで K は Langmuir 定数、 c は Lz 濃度、 n_m は単分子層の飽和吸着量、 n_s は吸着材への Lz の吸着量である。フィッティングにより得られた Lz の飽和吸着量 n_m は、pH 11 付近で最大値を示し、より低い pH 域や高い pH では吸着量の減少が見られた (Table 2)。Lz の等電点 pI

Figure 1. Adsorption isotherms of lysozyme on CMK-3 at various pH values: (●) 6.5, (○) 9.6, (■) 11, (□) 12.

Table 2. Amount of adsorbed of Lz at saturation ($\mu\text{md/g}$)

sample	pH condition			
	6.5	9.6	11	12
CMK-3	6.70	7.80	10.04	6.00
CMK-1	—	—	3.76	—

Table 1. Structural characteristics of the mesoporous carbons used in this study

sample	specific surface area (m^2/g)	specific pore volume (cm^3/g)	pore diameter $d_{p,BJH}^a$ (nm)	pore diameter $d_{p,NLDFT}^b$ (nm)
CMK-1	1675	1.05	2.3	2.3
CMK-3	1260	1.10	3.0	3.3

^{a)} Calculated from the adsorption branch of the isotherm. ^{b)} Pore sizes obtained from the N_2 isotherm on the basis of NLDFT (non-local density functional theory) analysis.

が $10.8^{21)}$ であることから、Lz 間の静電的斥力の抑制が吸着挙動の大きな要因になっているものと推測される。

今回の結果を、MS を用いた場合の Lz 吸着量の pH 依存性の結果⁸⁾と比較した。たとえば MS である SBA-15 を吸着材とした場合、今回の結果と同様に飽和吸着量 n_m は pI 付近で極大を示した。ただし、それ以外の pH 域での挙動に大きな差があった。Lz がカチオン性である pH=6.5 では MC では 30% もの吸着量の減少が見られるのに対し、MS では 15% 程度の減少にとどまった。これはアニオン性の MS と Lz の間に静電相互作用による吸着が少なからず寄与していることを示唆する。一方、Lz がアニオン性の pH 12 では MC で 40% 程度の吸着量の減少が見られるのに対して、MS では吸着量が半分以下になった。後者では静電反発が Lz の吸着を妨げているものと考えられる。この結果から、MS を吸着担体として用いると、MC に比べ固体表面とタンパク質との間の静電相互作用の寄与が大きくなると推測される。固定化タンパク質の変性の可能性を排除するという点では、MC の方が担体として優れていることがわかる。

次に、Lz 吸着量の孔径依存性を知るために、CMK-1 について吸着等温線を調べた。測定 pH は CMK-3 で吸着量が最も顕著であった pH=11 を採用した。得られた結果を CMK-3 のものと合わせて Figure 2 に示した。フィッティングにより得られた n_m を比較した場合、CMK-1 では $3.76 \mu\text{mol/g}$ (pH=11)、CMK-3 では $10.0 \mu\text{mol/g}$ (pH=11) となり、CMK-1 では CMK-3 に比べ Lz の吸着量の著しい減少が観測された。これは CMK-3 の孔径が Lz の大きさ (約 4~3 nm) と同程度であったのに対し、CMK-1 ではそれよりも小さな孔径であるため、吸着量が抑えられたと考えられる。

3.2 吸着後の MC の構造

MC への吸着の際、Lz が細孔内に吸着したのか、単なる表面に吸着したのかを調べるために吸着前後の CMK-3 について XRD 測定を行った。Figure 1, 2 において飽和吸着であると考えられる $69.5 \mu\text{mol/L}$ の Lz 溶液 (pH=11) を用いて吸着実験を行った。

Figure 3 にその結果を示す。吸着前後において確認される低角側の大きなピーク (100) と、より高角側の小さな二つのピーク (110) と (200) は CMK-3 のヘキサゴナル型のメソポーラス構造を反映している¹³⁾。吸着前後の d_{100} 値はそれぞれ 8.5 nm と 8.8 nm であり、MC の基本骨格は吸着前後で変化がないことがわかった。注目すべき変化はピーク強度に表れた。これらのピーク強度は、Lz の吸着により著しく減少した。これは空孔が Lz で充填されることで、空孔とカーボンの壁との間の電子密度差が減少したこと起因すると考えられる。すなわち、この結果は Lz の吸着が空孔で起こっていることを示唆している。細孔内への物質吸着による XRD 強度の減少

Figure 2. Adsorption isotherms of lysozyme on CMK-1 (●) and CMK-3 (○) at pH 11.

Figure 3. XRD powder patterns of CMK-3: (a) CMK-3 before protein adsorption, (b) CMK-3 after immersing in a lysozyme solution ($69.5 \mu\text{mol/L}$) for 96 h at pH 11.

はよく知られており、MS の細孔内へのタンパク質やポリマーの吸着によるものも報告されている^{14),22),23)}。

Lz の細孔内への充填は、吸着前後の CMK-3 についての N_2 吸着等温線の測定により明確に示すことができた (Figure 4)。つまり、Lz の吸着後には N_2 の吸着量は減少しており、メソ細孔内への Lz の吸着が確認された。また、二つが同じ形の吸着等温線となることから、CMK-3 の構造が Lz 吸着後も保たれていることがわかった。Lz 吸着後の CMK-3 の表面積および空孔体積は、 N_2 吸着等温線の解析から、 $1075 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 $0.944 \text{ cm}^3/\text{g}$ という値が得られた。Lz を楕円体と仮定して体積を求め ($2.12 \times 10^{-20} \text{ cm}^3$)、吸着した Lz が占める実際の体積を $n_m = 10.0 \mu\text{mol/L}$ より計算すると $0.13 \text{ cm}^3/\text{g}$ となった。これは Lz 吸着前の全空孔体積の 12% にあたる。一

Figure 4. Nitrogen adsorption/desorption isotherms of CMK-3 (open symbols, adsorption; closed symbols, desorption): (a) CMK-3 before lysozyme adsorption, (b) CMK-3 after immersing in a lysozyme solution (69.5 $\mu\text{mol/L}$) for 96 h at pH 11.

方, N_2 の吸着より得られる, Lz 吸着に伴う空孔体積の減少量は 15% ($0.16 \text{ cm}^3/\text{g}$) となり, 上で得られた値 (12%) とおおむね一致した. Lz が飽和吸着でありながら CMK-3 の細孔の 10% 程度にしか吸着していないのは, 孔径 (3.3 nm) が Lz の大きさに近いために, 孔の内部のサイトへの吸着が不十分であることを示している. しかしながら, レプリカを除いて作製される MC の構造は単純なものではなく, 吸着量と構造との相関に関してはさらに詳細な検討が必要である. これらの点については, 今後さまざまな大きさのタンパク質や孔径の MC を用いた実験により明らかになると考えられる.

CMK-3 と同程度の表面積 ($1212 \text{ m}^2/\text{g}$) および孔径 (3.1 nm) をもつ MS ($\text{C}_{12}\text{-MCM-41}$) に対しても同様の吸着実験が行われている⁹⁾. $\text{C}_{12}\text{-MCM-41}$ を用いた Lz の吸着実験から求められる空孔体積の減少率は 24% であった. 一方, N_2 の吸着からは 61% もの減少が見積もられた. この差は, Lz の吸着を行う際に MS が加水分解を受け細孔構造の一部が壊れてしまい, 細孔容量の大幅な減少をもたらしたためと考えられる. これらの結果の比較から, MC は MS に比べ耐水性の高い吸着担体であることが示唆される.

最後に吸着後の Lz の変性の有無を調べるために行った IR 測定の結果を Figure 5 に示す. 一般に, タンパク質の構造検証にはアミド I, II バンドが用いられており, 1650 cm^{-1} 付近のアミド I は $\text{C}=\text{O}$ の伸縮, 1550 cm^{-1} 付近のアミド II は $\text{N}-\text{H} \cdots \text{C}-\text{N}$ の屈曲・伸縮振動に由来している. 特にこのアミド II の $\text{N}-\text{H}$ 伸縮の消失はタンパク質の unfolding の検知に用いられている. Figure 5 で吸着前の Lz において見られる三つのバ

Figure 5. FT-IR spectra of the pure lysozyme (a) and lysozyme loaded on CMK-3 (b) at 69.5 $\mu\text{mol/L}$

ンド ($1657, 1527, 1454 \text{ cm}^{-1}$) は, 吸着後も同様の位置 ($1657, 1522, 1457 \text{ cm}^{-1}$) に存在することがわかった. また, 吸着前後のアミド I, II バンドの強度比 (I/II) は, それぞれ 1.3, 1.4 とほとんど変わっておらず, タンパク質の二次構造 (α ヘリックス, β シートなど) が吸着前後でほとんど変化しないことを示している. したがって, 吸着に伴うタンパク質の変性は起こっていないことがわかった. これは, Lz の活性を調べることでより明確になると期待される.

4 結 論

メソポーラスカーボン (MC) への lysozyme (Lz) の吸着挙動について pH および孔径依存性を調べた. MC として CMK-3 を用い, 吸着量の pH 依存性 ($\text{pH}=6.5\sim 12$) を調べたところ, Lz の等電点 ($\text{pI}=10.8$) 付近で極大を示した. この結果は, Lz の MC への吸着には Lz 間および表面と Lz との間の疎水性相互作用が重要であることを示唆する. また CMK-3 よりも孔径の小さな CMK-1 を用いると, 吸着量が著しく減少する結果が得られ, 細孔の大きさの選択によりタンパク質の吸着を制御できることが明らかとなった. Lz 吸着後の構造は XRD, N_2 吸着, IR により調べられ, Lz は変性することなく CMK-3 の細孔内に吸着していることがわかった.

今回の結果は, MC が Lz の吸着担体として利用可能であることを示している. 耐水性, 機械的強度, 酵素との静電相互作用の排除などの点で, MS に比べて有利な MC がタンパク質の吸着材として利用可能になれば, さまざまな条件下においてタンパク質がもつ触媒・認識などの機能を活用することができると期待される. また, ナノ構造体に固定化されたタンパク質は基質選択性や応機構において未知の機能や物性を示すかもしれない.

現在、酵素反応過程の詳細な解析を進めているところである。

文 献

- 1) B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine, and J. I. Zink, *Anal. Chem.*, **66**, 1120A (1994).
- 2) H. H. Weetall, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **41**, 157 (1993).
- 3) D. Avnir, S. Braun, O. Lev, and M. Ottolenghi, *Chem. Mater.*, **6**, 1605 (1994).
- 4) J. Weitkamp, *Solid State Ionics*, **131**, 175 (2000).
- 5) K. Meyer, P. Lorenz, B. Bohlkuhn, and P. Klobes, *Cryst. Res. Technol.*, **29**, 903 (1994).
- 6) T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda, and C. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 988 (1990).
- 7) C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, and J. S. Beck, *Nature*, **359**, 710 (1992).
- 8) A. Vinu, V. Murugesan, and M. Hartmann, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 7323 (2004).
- 9) R. Ryoo, S. H. Joo, and S. Jun, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 7743 (1999).
- 10) H. Nanba, Y. Ikenaka, Y. Yamada, K. Yajima, M. Takano, K. Ohkubo, Y. Hiraishi, K. Yamada, and S. Takahashi, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **6**, 257 (1999).
- 11) K. Ariga, *Chem. Rec.*, **3**, 297 (2004).
- 12) Q. Zhang, K. Ariga, A. Okabe, and T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 988 (2004).
- 13) A. Vinu, C. Streb, V. Murugesan, and M. Hartmann, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 8297 (2003).
- 14) K. Ariga, Q. Zhang, M. Niki, A. Okabe, and T. Aida, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **146**, 427 (2003).
- 15) J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, and B. K. Hodnett, *Catal. Lett.*, **85**, 19 (2003).
- 16) H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, and S. Inagaki, *Microporous Mesoporous Mater.*, **44**, 755 (2001).
- 17) C. C. F. Balke, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, *Nature*, **206**, 757 (1965).
- 18) D. P. Kharakoz and A. P. Sarvazyan, *Biopolymers*, **33**, 11 (1993).
- 19) M. Hartmann, S. Racouchot, and C. Bischof, *Microporous Mesoporous Mater.*, **27**, 309 (1999).
- 20) M. Hartmann and A. Vinu, *Langmuir*, **18**, 8010 (2002).
- 21) K. P. Wilson, B. A. Malcolm, and B. W. Matthews, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10842 (1992).
- 22) W. Hammond, E. Prouzet, S. D. Mahanti, and T. J. Pinnavaia, *Microporous Mesoporous Mater.*, **27**, 19 (1999).
- 23) M. Choi and R. Ryoo, *Nat. Mater.*, **2**, 473 (2003).

Bio/Carbon Nanomaterials—The Adsorption of Lysozyme on Mesoporous Carbon Molecular Sieves—

Masahiko MIYAHARA,^{*1} Ajayan VINU,^{*2} Takashi NAKANISHI,^{*1,*2} and Katsuhiko ARIGA^{*1}

^{*1}Advanced Materials Laboratory, National Institute for Materials Science (1-1 Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan)

^{*2}International Center for Young Scientists, National Institute for Materials Science (1-1 Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan)

The adsorption of lysozyme on mesoporous carbon, *i.e.*, CMK-3 and CMK-1, from buffered solutions of different pH (pH=6.5–12) has been studied. The amount adsorbed depends on the solution pH as well as on the pore size. The maximum adsorption was observed near the isoelectric point of lysozyme, suggesting that suppression of electric repulsion between the enzymes is an important factor in the adsorption process. The unaltered structural characteristics of the mesoporous adsorbents after the adsorption have been confirmed by physico-chemical characterization techniques such as XRD and N₂ adsorption. In addition, IR spectroscopic studies confirmed that the proteins used in this study are stable even after adsorption on the mesoporous carbon.

KEY WORDS Mesoporous Carbon / Lysozyme / pH Effect / Pore Size Effect / Stability / Adsorption /

(Received May 31, 2004; Accepted August 16, 2004)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **61**(12), 623–627 (2004)]