

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5867248号
(P5867248)

(45) 発行日 平成28年2月24日 (2016. 2. 24)

(24) 登録日 平成28年1月15日 (2016. 1. 15)

(51) Int. Cl.		F I	
C O 8 L 89/00	(2006. 01)	C O 8 L	89/00
C O 8 K 3/22	(2006. 01)	C O 8 K	3/22
A 6 1 B 90/70	(2016. 01)	A 6 1 B	19/00 5 1 3
C 1 2 N 9/00	(2006. 01)	C 1 2 N	9/00

請求項の数 10 (全 19 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2012-82980 (P2012-82980)</p> <p>(22) 出願日 平成24年3月30日 (2012. 3. 30)</p> <p>(65) 公開番号 特開2013-213099 (P2013-213099A)</p> <p>(43) 公開日 平成25年10月17日 (2013. 10. 17)</p> <p>審査請求日 平成26年11月17日 (2014. 11. 17)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 311002067 J N C株式会社 東京都千代田区大手町二丁目2番1号</p> <p>(74) 代理人 110002000 特許業務法人栄光特許事務所</p> <p>(72) 発明者 清野 智史 大阪府豊中市新千里東町2丁目7番C14-108</p> <p>(72) 発明者 古賀 雄一 大阪府吹田市津雲台5丁目9番地D39-102</p> <p>(72) 発明者 中川 貴 大阪府箕面市西小路3丁目11-25</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

温度変化により凝集と分散の両状態の間で可逆的に変化する刺激応答性磁性粒子と好熱菌由来の酵素とからなり、温度応答性機能を持ち、且つ、貴金属を含まないことを特徴とする酵素複合体。

【請求項2】

前記磁性粒子が、カルボキシル基を有する有機高分子で被覆され、前記カルボキシル基と前記酵素のアミノ基または水酸基とが結合してなることを特徴とする請求項1に記載の酵素複合体。

【請求項3】

前記磁性粒子が、1 ~ 1000 nmの平均粒径の磁性粒子であることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の酵素複合体。

【請求項4】

酵素複合体の酵素を活性化する方法であって、
前記酵素複合体が、温度変化により凝集と分散の両状態の間で可逆的に変化する刺激応答性磁性粒子と好熱菌由来の酵素とからなる温度応答性機能を持つ酵素複合体であり、
前記酵素複合体を溶解させた溶液に、交流磁場を印加することにより前記酵素を活性化させることを特徴とする酵素の活性化方法。

【請求項5】

前記磁性粒子が、カルボキシル基を有する有機高分子で被覆され、前記カルボキシル基

と前記酵素のアミノ基または水酸基とが結合してなることを特徴とする請求項4に記載の酵素の活性化方法。

【請求項6】

前記磁性粒子が、1～1000nmの平均粒径の磁性粒子であることを特徴とする請求項4または請求項5に記載の酵素の活性化方法。

【請求項7】

温度変化により凝集と分散の両状態の間で可逆的に変化する刺激応答性磁性粒子と好熱菌由来の酵素とからなる温度応答性機能を持つ酵素複合体と、磁気発生装置とを備えることを特徴とする医療器具の洗浄装置。

【請求項8】

前記医療器具が、内視鏡手術器具、侵襲性手術器具および吸引カテーテルからなる群から選択される少なくとも1つであることを特徴とする請求項7に記載の洗浄装置。

【請求項9】

前記磁性粒子が、カルボキシル基を有する有機高分子で被覆され、前記カルボキシル基と前記酵素のアミノ基または水酸基とが結合してなることを特徴とする請求項7または請求項8に記載の洗浄装置。

【請求項10】

前記磁性粒子が、1～1000nmの平均粒径の磁性粒子であることを特徴とする請求項7～9のいずれか1項に記載の洗浄装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素複合体に関し、より詳しくは、熱により機能を発現する酵素と磁性粒子との複合体に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、タンパク質を対象とする研究が理学、農学、医学、薬学、工学、情報科学にまたがる多くの分野で行われている。中でも、高温領域で活性化される好熱菌由来の酵素は、特に医療分野、バイオテクノロジー分野、環境分野などで注目されている。しかしながら、好熱菌由来の酵素は反応至適温度が高いため、反応温度を高くしなければならず、生体系に用いる場合には、その安全性に十分な留意が必要となる。

【0003】

一方、タンパク質にバイオマテリアルを結合させたタンパク質ハイブリッド材料が種々提案されている。タンパク質ハイブリッド材料とは、主にタンパク質とタンパク質以外の物質、例えば合成高分子などを化学的に結合させた複合体のことである。このタンパク質ハイブリッド材料は、主に、タンパク質機能を制御するために用いられており、タンパク質機能を制御する材料としては主にナノテクノロジーを活用した微粒子材料が用いられる(例えば、非特許文献1参照)。

【0004】

また、近年の機器分析の発展により、サブミクロン粒子の構造や特性を正確に把握することが可能となったことから、種々の目的に応じたタンパク質ハイブリッド微粒子の開発が進められている(例えば、非特許文献2参照)。

その中でも注目を集めている分野が外部刺激によるタンパク質機能の制御であり、熱や光などの外部環境により、タンパク質が機能を発現する“場所”、“時間”、“強さ”をコントロールする方法である。中でも酵素、生理活性物質などのタンパク質と磁性体を用いてハイブリット化した磁性体ハイブリッド材料は、その磁気特性から外部応答によるタンパク質の機能制御が利用しやすい材料として注目されている。例えば、フェリ磁性体のマグネタイト微粒子をドラッグキャリアーとして用い、薬剤の患部への誘導を外部から磁氣的に制御する研究がある(例えば、非特許文献3参照)。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Dunnill, P. and Lilly, M.D.著、「Purification of enzyme using magnetic bio-affinity materials」、Biotechnol. Bioeng., 16、P.987-990、1974

【非特許文献2】川口春馬著、「バイオアフィニティ微粒子」、SEN'I GAKKAISHI (繊維と工業)、Vol.60、No.7、2004

【非特許文献3】Akihiko Kondo, Noriyuki Ohnishi著、「Development of Thermo-Responsive Magnetic Nano-Particles and Their Application to Biotechnology」、PHARM TECH JAPAN、Vol.19、No.10(2003)、P.1753-1762

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記したように、タンパク質の磁性体ハイブリッド材料において、種々の応用が期待されており、磁性粒子を用いた新たな酵素活性の機能制御技術が望まれている。

そこで、本発明は、磁性粒子と酵素とを結合させたハイブリット材料を用い、さらに磁力のエネルギーを付与することによる発熱現象を利用することで新たな磁性粒子の酵素活性の機能を制御することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは上記課題を解決するため、鋭意検討した。その結果、好熱菌由来の酵素と磁性粒子とを結合させた酵素複合体が、磁力のエネルギーの付与により低温環境下においても酵素を活性化させることができることを見出した。

20

【0008】

すなわち、本発明は下記の(1)~(7)により達成される。

(1) 磁性粒子と好熱菌由来の酵素とからなり、温度応答性機能を持つことを特徴とする酵素複合体。

(2) 前記磁性粒子が、カルボキシル基を有する有機高分子で被覆され、前記カルボキシル基と前記酵素のアミノ基または水酸基とが結合してなることを特徴とする上記(1)に記載の酵素複合体。

(4) 前記磁性粒子が、刺激を付与することにより凝集する刺激応答性磁性粒子であることを特徴とする上記(1)~(3)のいずれか1項に記載の酵素複合体。

30

(5) 上記(1)~(4)のいずれか1項に記載の酵素複合体の酵素を活性化する方法であって、

前記酵素複合体を溶解させた溶液に、磁力のエネルギーを付与することにより前記酵素を活性化させることを特徴とする酵素の活性化方法。

(6) 前記磁力のエネルギーが、磁場および電磁波からなる群から選択される少なくとも1つであることを特徴とする上記(5)に記載の酵素の活性化方法。

(7) 上記(1)~(4)のいずれか1項に記載の酵素複合体と、磁気発生装置とを備えることを特徴とする医療器具の洗浄装置。

(8) 前記医療器具が、内視鏡手術器具、侵襲性手術器具および吸引カテーテルからなる群から選択される少なくとも1つであることを特徴とする上記(7)に記載の洗浄装置。

40

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、酵素複合体に磁力のエネルギーを付与することで、磁性粒子の表面温度が上がり、磁性粒子近傍の温度が酵素の至適温度まで高くなるので、溶液の全体温度を上げずとも磁性粒子表面に結合した好熱菌由来の酵素を活性化することができる。

したがって、高温に処することのできない器具、例えば、内視鏡手術器具等に付着した異常プリオン等の悪性タンパク質の洗浄などに効果的に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

50

【図1】基質分解反応の検量線測定の結果を示すグラフである。

【図2】(A)は磁気発生装置(コイル)の斜視図であり、(B)は(A)のコイル線材の断面図である。

【図3】(A)はTherma-Max(登録商標)の発熱評価実験装置の概略図であり、(B)は(A)の発熱評価実験装置の磁気発生装置に断熱材を挿入して使用する使用形態を示す斜視図である。

【図4】Therma-Max(登録商標)の各磁場強度における発熱特性を示すグラフである。

【図5】(A)は低温測定におけるTherma-Max(登録商標)の発熱評価実験装置の概略図であり、(B)は(A)の発熱評価実験装置の磁気発生装置に断熱材を挿入して水を循環させて使用する使用形態を示す斜視図である。

10

【図6】4におけるTk-サチライシン・Therma-Max(登録商標) L C Carboxylic acid複合体の酵素活性の測定結果を示すグラフである。

【図7】25におけるTk-サチライシン・Therma-Max(登録商標) L C Carboxylic acid複合体の酵素活性の測定結果を示すグラフである。

【図8】各温度におけるTk-サチライシン・Therma-Max(登録商標) L C Carboxylic acid複合体の酵素活性の測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の酵素複合体は、磁性粒子と好熱菌由来の酵素とからなり、温度応答性機能を持つものである。本発明の酵素複合体は、本発明の効果を著しく損なうことがない限り、磁性粒子および好熱菌由来の酵素以外の成分を含んでいてもよい。

20

【0012】

(磁性粒子)

本発明に用いられる磁性粒子は、酸化鉄、またはフェライトからなる粒子でもよく、例えば多価アルコールとマグネタイトから製造した粒子のように、酸化鉄、フェライト、またはマグネタイトとその他の無機物、有機物とからなる粒子でもよい。

磁性粒子は、例えば、特表2002-517085号公報等に開示された方法によって製造することができる。すなわち、鉄(II)塩、または鉄(II)塩及び金属(II)塩を含有する水溶液を、磁性酸化物の形成のために必要な酸化状態下に置き、水溶液のpHを7以上維持して、酸化鉄、またはフェライト磁性体粒子を形成する方法である。また、金属(II)塩を含有する水溶液と鉄(III)塩を含有する水溶液をアルカリ性条件下で混合することによっても製造することができる。

30

【0013】

あるいは、磁性粒子は、多価アルコールとマグネタイトから製造することもできる。この多価アルコールは、構成単位に水酸基を少なくとも2個有し、鉄イオンと結合可能なアルコール構造体であれば、特に制限なく使用することができる。例えば、デキストラン、ポリビニルアルコール、マンニトール、ソルビトール、シクロデキストリンなどが挙げられる。例えば、特開2005-082538号公報に、デキストランを用いた磁性粒子の製造方法が開示されており、この方法によって製造することもできる。また、グリシジルメタクリレート重合体のように、エポキシ基を有し、開環後多価アルコール構造体を形成する化合物も使用できる。

40

【0014】

磁性粒子が、良好な分散性を有するためには、磁力のエネルギーを付与して凝集させる前の粒子の平均粒径が、1~1000nmであることが好ましく、良好な発熱特性を有するためには、1~500nmであることがより好ましい。特に、磁性粒子と酵素との反応性の向上および発熱効率の観点から、粒子の平均粒径が、3~200nmであることが更に好ましく、5~50nmが特に好ましい。具体的には、磁性粒子がマグネタイトからなる粒子の場合、15~20nm程度の平均粒径であると、100kHz~1MHzの交流磁場中において、良好に発熱させることができる。このような粒子径測定を行える機器と

50

しては、粒子径・粒度分布測定装置（Zeta Sizer Nano ZS、Malvern社製）や、透過型電子顕微鏡（日立透過電子顕微鏡 HT7700、株式会社日立ハイテクノロジー製）が挙げられる。また、これらの磁性粒子は溶液中で凝集体を形成していてもよい。

本発明において使用できる磁性粒子の市販品としては、例えば、Dynabeads（登録商標）、nanomag（登録商標）、destars、MACS（登録商標）などが挙げられる。

【0015】

また、磁性粒子は、外部環境から粒子を守るため、あるいは粒子表面を機能化するためなどの観点から、粒子表面に高分子などが修飾されていることが好ましい。使用する保護剤としては、PVAやデキストラン等の高分子や、シリカなどの無機材料といった様々な機能性材料が使用される。

【0016】

粒子表面が保護され機能化された磁性粒子の例として、例えば、JNC株式会社の「Therma-Max（登録商標）」（以下、「サーマックス」という場合がある。）、「Therma-Max（登録商標）LC Carboxylic acid」（以下、「TM-LC」という場合がある。）等が挙げられる。「Therma-Max（登録商標）」は、酸化鉄磁性粒子表面にN-イソプロピルアクリルアミド（以下、「NIPAM」という場合がある。）のポリマーが修飾されている。

本明細書において、単に「サーマックス」という場合は、磁性粒子を示しており、「サーマックス溶液」、「サーマックス原液」という場合は、磁性粒子にバッファー等を含んでいることを示している。

NIPAMのポリマー水溶液はポリマーの重合度により溶解・析出する温度（下限臨界共溶温度）を制御することができ、32 前後に下限臨界共溶温度を有し、この温度未満では水に分散するが、これ以上の温度では凝集し容易に磁気で回収できるようになる。

したがって、サーマックスは、その粒子表面を被覆しているNIPAMにより、溶液温度32 を境として凝集と分散の両状態の間で可逆的に変化する。そのため、粒子が均一に溶液中に分散している32 未満の分散状態では、磁気分離は容易ではないが、溶液温度を32 以上にすると磁性粒子は凝集塊を形成し始め、磁気分離が容易に可能となる。

【0017】

このように機能化された磁性粒子は、刺激を付与することにより凝集等の所望の形態とすることができるので、機能化された磁性粒子（刺激応答性磁性粒子）に外部刺激を付与することで、粒子の分散性を保ちながら酵素複合体の作製及び精製の効率を飛躍的に高めることができる。

【0018】

この刺激応答性磁性粒子に付与する刺激としては、例えば、温度変化、pH変化、光変化、イオン強度変化等が挙げられ、各刺激の条件は適宜調整すればよい。

【0019】

（好熱菌由来の酵素）

本発明に用いられる好熱菌由来の酵素は、温度変化により酵素活性値が変化するものであり、65 以上の高温領域で活性を有し、高温において平衡論的、速度論的、あるいはその両方で安定化しているという特徴を有するものである。

【0020】

好熱菌由来の酵素としては、例えば、一般名であれば、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、エステラーゼ、DNAポリメラーゼ、ヌクレアーゼ、ペルオキシダーゼ等が挙げられる。具体的には、TK-サチライシン、Tk-SP、Tk-GK、Tk-RNase H等が挙げられる。

【0021】

（磁性粒子と好熱菌由来の酵素との結合方法）

10

20

30

40

50

本発明の酵素複合体は、上記磁性粒子と上記好熱菌由来の酵素とを結合させて作製される。

本発明の酵素複合体を作製する方法としては、磁性粒子の表面の形態によって、磁性粒子と酵素との結合方法を適宜選択すればよい。結合方法としては、例えば、磁性粒子表面に酵素を直接結合させる直接法と、磁性体表面を被覆する有機高分子を介して磁性粒子表面に酵素を結合させる間接結合法が挙げられる。

【0022】

直接法は、磁性粒子に直接的に酵素を吸着させるものである。例えば、磁性粒子表面に吸着させた酵素をグルタルアルデヒドによってクロスリンクさせ、磁性粒子表面を被覆させる方法などが挙げられる。

10

【0023】

間接結合法は、磁性粒子に被覆した有機高分子を介して磁性粒子と酵素とを結合させる手法である。有機高分子を被覆させるには、粒子表面で重合反応を行わせるか、あるいは有機高分子を結合させる2種類の方法がある。代表的なものには、デキストランやメタクリル酸ポリマーでの被覆がある。被覆された磁性体を酵素と結合するには通常の化学修飾の手段を用いる。一般的にはアミノシラン化した表面や、カルボジイミドで活性化されたカルボキシル基を持つ表面による酵素複合体との結合が知られている。これらの反応は直接結合法より温和な処理であるとされており、直接法で作製した酵素に比べて、結合した酵素の活性を保持しやすい。

【0024】

本発明において、カルボジイミドを用いた縮合反応によって、サーママックスの表面に被覆されたカルボキシル基を有する有機高分子中のカルボキシル基に酵素を固定化させることが好ましい。カルボジイミドは、カルボキシル基とアミノ基または水酸基との間で脱水縮合反応を行わせる脱水縮合剤である。この反応により、酸アミドやエステル結合が形成される。

20

【0025】

(温度応答性機能)

このように作製された本発明の酵素複合体は温度応答性機能を有する。温度応答性機能とは、変動磁場に対する磁化応答の遅れにより磁性粒子に蓄積される磁力のエネルギーによって発熱し、磁性粒子の発熱により磁気粒子に固定された酵素が高温化され、酵素活性が発現することをいう。

30

【0026】

(磁気発生装置)

酵素複合体に磁力のエネルギーを付与する方法としては、特に限定されないが、例えば、磁場、電磁波、永久磁石等を利用することができる。中でも、取扱いが容易であり、磁力のエネルギーの強さを容易に変化させることができるという点から、交流電流によって磁気を発生させる磁気発生装置を用いて磁場を形成させることが好ましい。

【0027】

交流磁場を用いる場合は、付加する磁場の条件は、使用する酵素の種類に応じて適宜選択すればよいが、例えば、磁場強度0.1~2,000Oeとするのが好ましく、1~1,000Oeとするのがより好ましく、3~5,000Oeとするのがさらに好ましい。上記範囲とすることで、磁性粒子の発熱量を制御することができる。また、周波数は、1,000~15,000,000Hzとするのが好ましく、10,000~3,000,000Hzとするのがより好ましく、100,000~1,000,000Hzとするのがさらに好ましい。上記範囲とすることで誘電加熱の影響を低減し、磁性粒子のみを発熱させることができる。

40

【0028】

上記で説明した本発明の酵素複合体を溶解した溶液に、溶液の外部から磁力のエネルギーを与えることにより、酵素複合体の磁性粒子が発熱するため、この磁性粒子に固定された酵素の近傍の溶液温度が上昇する。酵素の至適温度にまで温度が上昇すると、酵素機能

50

が発現する。したがって、溶液全体の温度を上昇させることなく、温度応答性機能を持つ酵素の活性を上げることができる。したがって、例えば、高温領域での使用が制限される状況においても本発明の酵素複合体を用いることができる。

【0029】

例えば、本発明の酵素複合体と磁気発生装置とを備えて医療器具用の洗浄器具とすることができる。

内視鏡手術器具は、変性プリオン等の悪性タンパク質などが付着しやすいが、器具の材質上、高温消毒がしにくい。好熱菌由来の酵素であるTk - サチライシンはプリオンを分解する酵素であるため、Tk - サチライシンを固定した本発明の酵素複合体を用いて、磁気発生装置により内視鏡手術器具を洗浄すれば、洗浄液の温度を上げずともTk - サチライシンの活性を高めることができるので、確実に変性プリオンを分解・除去することができる。

10

【0030】

なお、医療用器具としては、上記した内視鏡手術器具のほか、メス、鋏、鉗子などの侵襲性手術器具、吸引カテーテルなどの体内に挿入して使用する器具および樹脂製手術器具などを例示することができる。

【実施例】

【0031】

次に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によってなんら限定されるものではない。

20

なお、本発明で用いた精製水は、Millipore製Direct-Q(商品名)で精製された比抵抗18M \cdot cm以上の超純水である。

【0032】

<酵素複合体：Tk - サチライシン・TM - LC複合体の合成>

磁性粒子としてTherma - Max(登録商標) LC Carboxylic acid(JNC株式会社製)を用い、酵素としてTk - サチライシンを用いて、以下のプロトコルに従って酵素複合体を作製した。

〔1〕1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド(以下、EDC)/N - ヒドロキシスクシイミド(以下、NHS)を用いたTM - LCの活性化

30

工程1) 500 μ lのTM - LCをマイクロチューブに分注し、4M NaCl水溶液を19.5 μ l加え混合した。

工程2) 混合液を恒温槽に入れ一分間加温した後、マイクロチューブを磁気分離装置(永久磁石(ネオジム磁石, 30 \times 10mm(丸型), 磁化方向: 厚み方向, 表面磁束密度: 445mT)に一分間静置し、TM - LCの凝集塊を磁気分離して上澄を除いた。

工程3) 25mM MESバッファ(in 50mM NaCl, pH4.75)(以下、Activation Bufferという)を500 μ l加え、氷浴中で分散させた。

工程4) 工程2と同じ操作を行った。

工程5) マイクロチューブにActivation Bufferを300 μ l加え、氷浴中で分散させた。

40

工程6) EDC 2mgとNHS 4mgを200 μ lのActivation Bufferに溶解させた。この調整液を工程5の溶液と混合し、1.5時間室温(約25 $^{\circ}$)で回転混合させた。

工程7) 工程2と同じ操作を行い、未反応のEDC/NHSを除いた。

工程8) 10mMアセテートバッファ(in 50mM NaCl, pH5.0)(以下、Binding Bufferという)を300 μ l加え、氷浴中で分散させた。

工程9) 工程7、工程8の操作をさらに2回行った。

〔2〕活性化TM - LCへのTk - サチライシンの固定化

工程10) 工程9の操作の後、粒子に0.1mg/mlのTk - サチライシン溶液300

50

μl (in 50 mM 酢酸バッファー、pH 5.0) を加え、氷浴中で分散させた後、4 で3時間回転混合を行った。

工程11) 工程2と同じ操作を行い、未反応のTk - サチライシンを除いた。なお、この磁気分離後の上澄は後のタンパク質定量のために保存した。

工程12) 50 mM Tris - HCl バッファー (pH 7.5) (以下、Reaction Stop Buffer という) を500 μl 加え、未反応の活性化基を反応停止させた。氷浴中で分散させた後、4 で30分間回転混合を行った。

工程13) 工程2と同じ操作を行った。

工程14) 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) (以下、酢酸バッファーという) を加え、氷浴中で分散させた。

工程15) 工程13、工程14の操作をさらに2回繰り返した。

工程16) 上記の酢酸バッファー500 μl の中で、Tk - サチライシン・TM - LC 複合体溶液を冷蔵庫で保存した。

【0033】

< 酵素複合体の評価 >

合成したTk - サチライシン・TM - LC 複合体について、ICP測定によるTk - サチライシン・TM - LC 複合体溶液中の酸化鉄濃度、差分法によるTk - サチライシンの酵素量の定量、そしてTk - サチライシン・TM - LC 複合体溶液のアゾカゼイン法による酵素活性の3つの指標を測定した。この3つの測定値から、Tk - サチライシン・TM - LC 複合体溶液中での、

- i. 粒子当りの酵素の質量 (酵素の質量 / 粒子の質量)、
- ii. 酵素当りの酵素活性値 (酵素活性 / 酵素の質量)、
- iii. 粒子当りの酵素活性値 (酵素活性 / 粒子の質量)

を算出し、Tk - サチライシン・TM - LC 複合体溶液の評価を行った。

【0034】

(ICP発光分析)

まず、 Fe^{2+} の標準溶液を希釈したもの (0、5、20 ppm) で検量線を作成し、それを基にTk - サチライシン・TM - LC 複合体中の鉄の含有率を決定した。

【0035】

サーマックス原液及びTk - サチライシン・TM - LC 複合体溶液中の酸化鉄粒子量は、それぞれの液に含まれる鉄原子量により評価した。その結果を表1に示す。

【0036】

【表1】

Therma-Max Fe濃度		
Sample	原液比	濃度(mg/ml)
原液	1.00	4.00
固定化後の溶液	0.35	1.38

【0037】

表1の結果より、サーマックス原液において、Fe濃度として4 mg/mlの鉄粒子を有していたものが、固定化後のTk - サチライシン・TM - LC 複合体溶液において、Fe濃度として1.38 mg/mlの鉄粒子を有していた。このことから、Tk - サチライシン・TM - LC 複合体溶液において、サーマックス原液に対して約35%の鉄粒子を有していることがわかった。

【0038】

(Tk - サチライシン・TM - LC 複合体中のTk - サチライシンの定量分析)

磁性粒子に固定化したTk - サチライシンの担持量を差分法により算出した。酵素と反

10

20

30

40

50

応する基質分子として、アゾカゼインを用いた。アゾカゼインは酵素により分解され、アゾ基を含む化合物が遊離される。このアゾ基を含む化合物は440 nmに吸収を持つため、その吸光度をUV - vis分光光度計（型番V - 650、日本分光社製）で測定することで定量できる。

UV - vis分光光度計での吸光度測定は試料溶液に光を入射し、透過光強度Iを測定し以下の式（1）より吸光度Aを算出した。

【0039】

なお、基質N - スクシニル - AAPF - p - ニトロアニリドから生成されるp - ニトロアニリドの吸光係数は $8900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、セル長1 cmで測定を行ったので、モル濃度cは、

$c = A_{440} / d = A_{440} / 8900$
で算出した。

【0040】

【数1】

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon c d \quad (1)$$

$$\left(\begin{array}{l} I_0 : \text{溶媒の透過光強度} \\ I : \text{溶液の透過光強度} \\ \varepsilon : \text{モル吸光係数} \\ c : \text{モル濃度} \\ d : \text{吸収層の厚さ} \end{array} \right)$$

【0041】

上澄に残ったTk - サチライシン濃度を定量的に評価するため、アゾカゼインを基質とした各Tk - サチライシン濃度におけるTk - サチライシンの酵素分解反応の測定を行い、作成した検量線を図1に示す。

【0042】

図1の結果から、測定濃度間においては、Tk - サチライシンに比例してアゾカゼインの基質分解反応が生じ、分解生成物由来の440 nm付近に見られるピークが増大していることがわかる。そこで、酵素固定化反応時に用いたTk - サチライシン溶液の原液と、反応終了後に回収したTk - サチライシン上澄溶液の二つの溶液でも、同様のアゾカゼインの基質分解反応実験を行い、その吸光度から溶液中のTk - サチライシン濃度を算出した。その結果を以下の表2に示す。

【0043】

【表2】

表2 固定化反応後の溶液上澄の酵素の定量評価

	Abs.(440nm)	検量線から算出される酵素濃度	標準偏差(酵素濃度)
原液 (5倍希釈)	0.221	0.108 mg/ml	0.010
上澄 (5倍希釈)	0.211	0.103 mg/ml	0.007

【0044】

表2で算出された酵素濃度結果の差分を取ることによって、固定化されたTk - サチライシン濃度を算出した。その結果を以下の表3に示す。

【 0 0 4 5 】

【表 3】

Sample	原液比 (%)	濃度 (μg/ml)
反応前の酵素溶液濃度	100	107.5
固定化酵素の溶液濃度	4.7	5.0

【 0 0 4 6 】

10

表 3 の結果より、Tk - サチライシン溶液において、酵素濃度が $107.5 \mu\text{g/ml}$ であったものが、固定化後の Tk - サチライシン上澄溶液において、酵素濃度が $5.0 \mu\text{g/ml}$ であった。このことから、固定化の際に投入した Tk - サチライシンの原液の酵素濃度の 95.3% がサーマックスの表面に固定化されたことが確認された。表 3 の I C P 測定より得られた粒子濃度から、粒子の重量あたりの酵素量は、 $3.6 \mu\text{g/mg}$ であった。

【 0 0 4 7 】

(酵素活性分析)

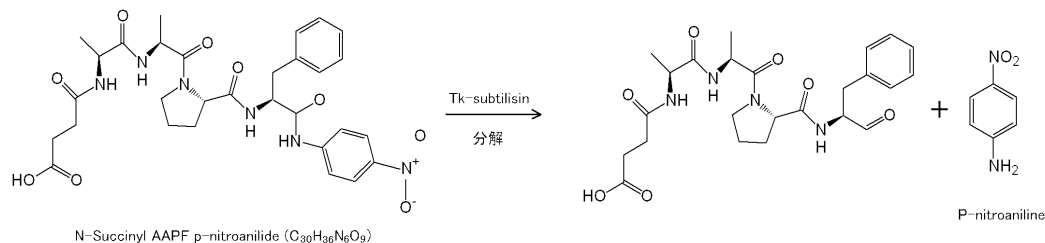
次に磁性粒子に固定化されていないフリーの Tk - サチライシンの酵素活性の測定と固定時との比較を行った。酵素活性測定には基質として N - スクシニル - A A P F - p - ニトロアニリドを用いた。N - スクシニル - A A P F - p - ニトロアニリドは、下記式 (A) に示すように、プロテアーゼによってペプチド結合が加水分解され、p - ニトロアニリンを生成する。

20

(式 A)

【 0 0 4 8 】

【化 1】



30

【 0 0 4 9 】

この p - ニトロアニリンの吸光度を測定することにより、分解物質の定量を行った。Tk - サチライシンを用いて基質 N - スクシニル - A A P F - p - ニトロアニリドの分解反応を行い、 410 nm の吸光度をプロットすることで、L a m b e r t - b e e r の法則式から、p - ニトロアニリンの生成量を算出した。なお、酵素活性はユニット (U) という評価指標を用いて評価した。本発明において、1 ユニットは 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の p - ニトロアニリドを生成する酵素量として定義している。

40

具体的な実験操作としては、 $0 \sim 5 \text{ mM}$ の N - スクシニル - A A P F - p - ニトロアニリド溶液を $95 \mu\text{l}$ ずつ用意し、そのそれぞれに酵素濃度 0.010 mg/ml の Tk - サチライシン・T M - L C 複合体溶液 $5 \mu\text{l}$ をそれぞれ添加し、 20°C で 5 分間酵素反応を行った。その後、 $10 \mu\text{l}$ の 5 重量% 酢酸水溶液を添加して酵素反応を停止させ、磁気分離カラム (M S C o l u m s 、ミルテニーバイオテク (株) 製) に二回溶液を通した後、上澄み溶液中の波長 410 nm での吸光度変化を U V - v i s 分光光度計 (V A R I A N 、C A R Y 5 0 P r o b e) を用いて測定を行い、 $8900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の吸光係数を用いて N - スクシニル - A A P F - p - ニトロアニリドから生成される p - ニトロアニリドの量として算出した。

50

【 0 0 5 0 】

また、固定化酵素の酵素濃度と同じ0.010mg/mlに調整したフリーのTk-サチライシンを用いて同様の実験を行った。得られた410nmの吸光度から酵素活性値(ユニット)を算出し、それぞれ値を比較することで、活性を保持している酵素の割合を評価した。

【 0 0 5 1 】

各基質濃度における、各410nmでの吸収スペクトル結果より、酵素活性指標であるユニットを算出し、酵素複合体に固定化された酵素がどの程度活性を維持しているのかを表4、表5に示す。

【 0 0 5 2 】

【表4】

表4 フリーの酵素活性測定結果

基質濃度[mM]	Abs.(410nm)	分解生成物量[μmol]	ユニット(U)
0	0.008	0	0
0.5	0.092	1.1	0.2
1	0.176	2.2	0.4
2	0.294	3.6	0.7
3	0.386	4.8	1.0
5	0.506	6.3	1.3

【 0 0 5 3 】

【表5】

表5 固定化酵素活性測定結果

基質濃度[mM]	Abs.(410nm)	分解生成物量[μmol]	ユニット(U)	活性保持率(%)
0	0.000	0	0	—
0.5	0.044	0.5	0.1	48
1	0.078	1.0	0.2	44
2	0.140	1.7	0.3	48
3	0.171	2.1	0.4	44
5	0.221	2.7	0.5	44

【 0 0 5 4 】

表5の活性保持率とは、固定化酵素とフリーの酵素とを比較し、どの程度の活性が保持されているかを表したものである。これは固定化酵素の活性値(U)をフリーの酵素活性値(U)で割ることにより算出した。表5より、平均して約46%の活性が保持されている。この値は酵素の構造や、アミノ基の含有量によっても酵素の固定化率は異なるが、従来のカルボジイミド法による酵素固定化量と比べ同程度の値となった。

【 0 0 5 5 】

以上の結果より、実施例のTk-サチライシン・TM-LC複合体溶液中に含まれる酵素量は、

(粒子濃度) × (体積) = 0.010 mg/ml × 5 μl = 0.05 μg = 5 × 10⁻⁵ mg

であることを踏まえ、酵素量 1 mg あたりの酵素活性 (比活性) を算出した。通常酵素の比活性を算出する場合は、基質濃度を増やしても吸光度が変化しない基質大過剰の際の値を用いる。今回の測定では基質濃度 5 mM から吸光度の上昇が見られないとみなせる。よってこの時の酵素活性値 (U) から本固定化酵素の比活性を算出した。その結果を表 6 に示す。

【0056】

【表6】

表6 固定化酵素活性測定結果

Sample	比活性 (U/mg protein)
Tk-subtilisin(free)	25.0
Tk-subtilisin(immobilized)	10.9

10

【0057】

表6の結果より、磁性粒子と結合していないフリーの酵素重量あたりの酵素活性値と比較しても、それ程遜色ない値を示しているといえる。

20

【0058】

<磁性粒子の交流磁場による発熱評価>

磁性粒子としてTherma-Max (登録商標、JNC株式会社製) を用い、交流磁場によるサーマックスの発熱挙動を評価するために、交流磁場印加試験を行った。

【0059】

(高周波磁気発生装置)

〔磁気発生装置〕

図2(A)および(B)に示す磁気発生装置10 (株式会社サムウエイ製) を用いた。磁気発生装置10は、内筒13の外周にコイル11を巻きつけて構成される。高周波磁場発生用のコイル11は、内径3mm、外径4mmで厚さ0.25mmの絶縁被覆11bを施した銅パイプ (コイル線材) 11aで構成されている。コイル11の内筒13はテフロン (登録商標) 製であり、内径58mm、外径70mm、高さ120mmであり、コイル11の巻き数は23ターンである。本発明で扱う磁場強度は、実効値 (O e - r m s) で表記する。また、測定中はコイル11の発熱を抑制するためにコイル11の銅パイプ中には20に制御された冷却水を流した。

30

【0060】

〔その他の実験機器の説明〕

(1) 高周波電源 (型式T162-6024AHE、株式会社サムウエイ製)

周波数可変型の高周波電源であり、周波数帯域は100~1999kHz、最大出力1000W/50である。

40

(2) マッチングボックス (株式会社サムウエイ)

コイルとコンデンサーが内蔵されており、それらのインダクタンスとキャパシタンスが付属のレバーに連動して可変となるように設計されている。それらのレバーを調節することで、実験用のコイルの共振点を見つけることができる。

(3) マッチングボックス用のチラー (型式TBG045AA、ADVANTEC社製)

(4) 光ファイバー式温度計 (型式Reflex-4、Neoptix社製)

測定可能温度領域は、-80度~250度。分解能は、0.1度である。

(5) オシロスコープ (型式TDS1000B、Tektronix社製)

高周波コイルに流れる電流値を測定するために用いた。

50

(6) ロゴスキーコイル(型式 Pearson, Electronics 社製)

交流磁界の測定の際、実験用コイルに流れる電流を検出するためのコイルであり、このロゴスキーコイルに発生する起電力をオシロスコープで検出し、換算された電流値が表示される。

【0061】

(Therma - Max を用いた断熱状態での発熱評価実験)

サーマックスが磁気発熱体として機能するかを検証するために、図3(A)および(B)に示す発熱評価実験装置を用いて、断熱状態における発熱を評価する実験を行った。以下に実験手順について説明する。

【0062】

[実験手順]

工程1) エッペンドルフチューブ15に粒子濃度2mg/mlのサーマックス溶液17を1ml入れる。

工程2) 光ファイバー温度計19をサーマックス溶液17の中ほどまで入れ、エッペンドルフチューブ15を発砲スチロール(断熱材)18で断熱し、高周波磁場発生コイルの中心に設置する。

工程3) 1MHz、各磁場強度における溶液温度の上昇を1000sモニタリングする。

【0063】

(サーマックスの交流磁場による発熱特性評価)

サーマックスを用い断熱状態で発熱を評価した実験結果を図4に示す。印加した磁場強度は30、40、および500eで行い、横軸は時間、縦軸は上昇温度 $T(\)$ として示した。

【0064】

図4に示された実験結果より、500eではサーマックス溶液が1000秒間で約5.5程度、400eでは約4.5程度の温度上昇を示していることがわかった(図4(a)、(b))。

また、交流磁場の強度を300eにすると、交流磁場による磁性粒子の発熱と、系全体での放熱とのバランスがとれ、温度上昇がほとんどみられないことがわかった(図4(c))。したがって本結果から、適切な強度の交流磁場をサーマックスに印加することにより、溶液温度は上昇させず、粒子近傍のみエネルギーを付与できることがわかった。

【0065】

(粒子表面の有機高分子の交流磁場による熱応答性評価)

交流磁場印加時にNIPAMのポリマーが熱応答し、サーマックスが凝集しているかを検証するため、低温3と室温付近の20で、磁場強度260eの交流磁場を印加し、印加前のサーマックスの平均粒径と、印加直後のサーマックスの平均粒径を測定した。

なお、本発明において、平均粒径は、動的光散乱法(DLS: Dynamic Light Scatteringの略)に基づく装置(Zeta Sizer Nano ZS、Malvern社製)で測定した値である。20での交流磁場の印加方法は上記[実験手順]に準じて行った。また、低温(3)時の交流磁場の印加は、図5(A)および(B)に示すように、発熱評価実験装置の磁気発生装置10内に4の水21を循環させる系を用いた。結果を表7に示す。

【0066】

10

20

30

40

【表7】

表7 各温度におけるサーママックスの交流磁場前後の平均粒径 ([d. nm])

	低温(3度)	室温(20度)
交流磁場印加前の平均粒径	273nm	279nm
交流磁場印加直後の平均粒径	760nm	6150nm

【0067】

10

表7の結果より、交流磁場印加によっても、外部温度の上昇時にみられたような粒子凝集が見られた。これらの結果から、交流磁場印加の際に生じる酸化鉄の発熱現象により、粒子表面のNIPAMのポリマーが熱応答し、凝集を引き起こすことが確認された。つまり、交流磁場のオン、オフにより、磁気粒子に固定した酵素にエネルギーを付与し、酵素活性を制御できることがわかった。

【0068】

<固定化酵素の交流磁場による活性評価>

交流磁場印加による固定化酵素の活性への影響を調べるため、以下の実験を行った。

【0069】

(温度変化による固定化酵素の酵素活性への影響)

20

各温度におけるTk - サチライシン・TM - LC複合体の測定を行い、外部温度による酵素活性値の変化を測定した。

まず初めに、N - スクシニル - AAPF - p - ニトロアニリドをDMSOで希釈し、200mMに調整した基質溶液10 μ lを、終濃度1mMとなるよう酵素活性用バッファ823 μ l(50mM Tris - HCl、pH8.0、1mM CaCl₂)と、Tk - サチライシン・TM - LC複合体溶液166 μ lを加え全量1mlとした。この溶液を4と25、45、65に一定となるようアルミブロック恒温槽(MG - 2200)を用いてそれぞれ加温し、10min反応させた。その後、100 μ lの5重量%酢酸水溶液を添加して酵素反応を停止させ、磁気分離カラム(MS Columns、ミルテニーバイオテク(株)製)を二回通し磁性粒子を完全に除去した。この上澄溶液の吸光度変化(410nm)をUV - vis分光光度計(V - 650、日本分光(株)製)を用いて測定を行い評価した。

30

【0070】

また、基質であるN - スクシニル - AAPF - p - ニトロアニリドと、サーママックスのどちらも低波長領域で吸収を持つために、400nm以下の波長領域の評価が困難である。そのため、コントロールとして、市販のサーママックス溶液に基質N - スクシニル - AAPF - p - ニトロアニリドを加えたサンプルを用意し、このスペクトルをバックグラウンドとして差し引くことで評価を行った。以下にこのバックグラウンド測定の詳細を述べる。

N - スクシニル - AAPF - p - ニトロアニリドをDMSOで希釈し、200mMに調整した基質溶液10 μ lを、終濃度1mMとなるよう酵素活性用バッファ823 μ l(50mM Tris - HCl、pH8.0、1mM CaCl₂)と、市販のサーママックス(原液、4mg/ml)66 μ lを加え全量1mlとした。そしてこの溶液を溶液温度25、磁場強度400e、1MHzで交流磁場を10分間印加した。なおその他の交流磁場の条件は、上記と同じに設定した。その後、100 μ lの5重量%酢酸水溶液を添加して酵素反応を停止させ、磁性カラムに二回溶液を通した後、波長410nmでの吸光変化をUV - vis分光光度計(CARY50 Probe、VARIAN社製)を用いて測定を行い評価した。

40

【0071】

(溶液温度4での交流磁場印加による固定化酵素活性への影響評価)

50

図5に示した冷却系のシステムを使用し、溶液温度4℃での交流磁場印加による固定化酵素活性への影響を評価した。サンプルは上記(温度変化による固定化酵素の酵素活性への影響)と同様に調製した酵素固定化酵素溶液1mlを使用し、4℃、磁場強度400e、1MHzで交流磁場を10分間印加した。なおその他の交流磁場の条件は、上記と同様に行った。交流磁場印加後、100μlの5重量%酢酸水溶液を添加して酵素反応を停止させ、磁気分離カラム(MS Columns、ミルテニーバイオテク(株)製)に二回溶液を通した後、波長410nmでの吸光変化をUV-vis分光光度計(CARY50 Probe、VARIAN製)を用いて測定を行い評価した。そして、得られた結果を(温度変化による固定化酵素の酵素活性への影響)での4℃における結果と比較した。交流磁場のオン、オフによる4℃での酵素活性変化を図6に示す。

10

【0072】

波長410nmでの吸光度で両者を比較したところ、溶液温度4℃において、基質分解生成物であるp-ニトロアニリンの生成量は、交流磁場を与えないもの(図6(b))に比べて交流磁場を印加したもの(図6(a))が約1.2倍増加することが確認された。

この結果より、低温度(4℃)領域において交流磁場による酵素機能の活性化が示され、活性増加が約1.2倍となることがわかった。

【0073】

(溶液温度25℃での交流磁場印加による固定化酵素活性への影響評価)

同様に、上記(温度変化による固定化酵素の酵素活性への影響)で調製した溶液について、溶液温度25℃での交流磁場印加による固定化酵素活性への影響を評価した。25℃で磁場強度400eの交流磁場を10分間印加した。交流磁場印加後、100μlの5重量%酢酸水溶液を添加して酵素反応を停止させ、磁気分離カラム(MS Columns、ミルテニーバイオテク(株)製)に二回溶液を通した後、波長410nmでの吸光変化をUV-vis分光光度計(CARY50 Probe、VARIAN社製)を用いて測定を行い評価した。そして、得られた結果を上記(温度変化による固定化酵素の酵素活性への影響)での25℃における結果と比較した。交流磁場のオン、オフによる25℃での酵素活性変化を図7に示す。

20

【0074】

波長410nmでの吸光度で両者を比較したところ、溶液温度25℃において、基質分解生成物であるp-ニトロアニリンの生成量は、交流磁場を与えないもの(図7(b))に比べて交流磁場を印加したもの(図7(a))が約1.6倍増加することが確認された。

30

この結果より、交流磁場印加により、固定化酵素近傍が温度上昇し、有意な差が見られたと考えられる。

【0075】

(交流磁場印加のオン、オフによる固定化酵素活性の評価)

上記(溶液温度4℃での交流磁場印加による固定化酵素活性への影響評価)および上記(溶液温度25℃での交流磁場印加による固定化酵素活性への影響評価)で得られた結果から、交流磁場による酵素近傍の温度上昇がそれぞれの程度もたらされているのか、交流磁場を印加せず測定した活性測定と比較することにより検証を行った。交流磁場を印加せずに測定した結果は上記(温度変化による固定化酵素の酵素活性への影響)で行った固定化酵素の酵素活性測定を使用し、交流磁場を印加したものは上記(溶液温度4℃での交流磁場印加による固定化酵素活性への影響評価)および上記(溶液温度25℃での交流磁場印加による固定化酵素活性への影響評価)で行った4℃と25℃のものを使用し評価した。その結果を図8に示す。

40

【0076】

図8の結果から、交流磁場を与えないもの(図8(b))に比べて交流磁場を印加したもの(図8(a))が酵素活性が高くなることが分かり、4℃時では、磁場有の酵素活性の結果は、無磁場時と比べ1.2倍程度であったが、これは無磁場時の約5℃での酵素活性値に相当することがわかった。一方で25℃時では、磁場有の酵素活性値は、無磁場時

50

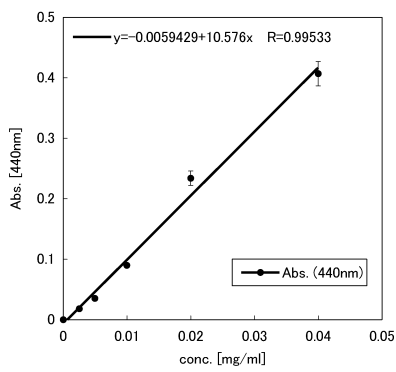
と比べ1.6倍を示しており、これは無磁場時より10 高い35 での酵素活性に相当することがわかった。したがって、より高温域で交流磁場を印加することにより、磁場応答性の良い機能発現を得ることが確認された。

【符号の説明】

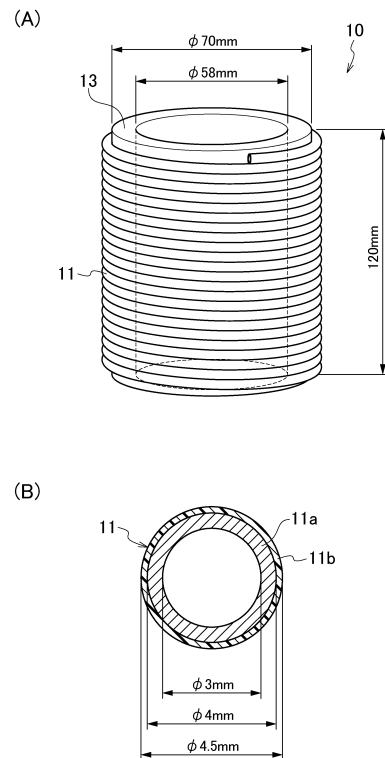
【0077】

- 10 磁気発生装置
- 11 コイル
- 13 内筒
- 15 エッペンドルフチューブ
- 17 サーママックス溶液
- 18 断熱材
- 19 光ファイバー温度計

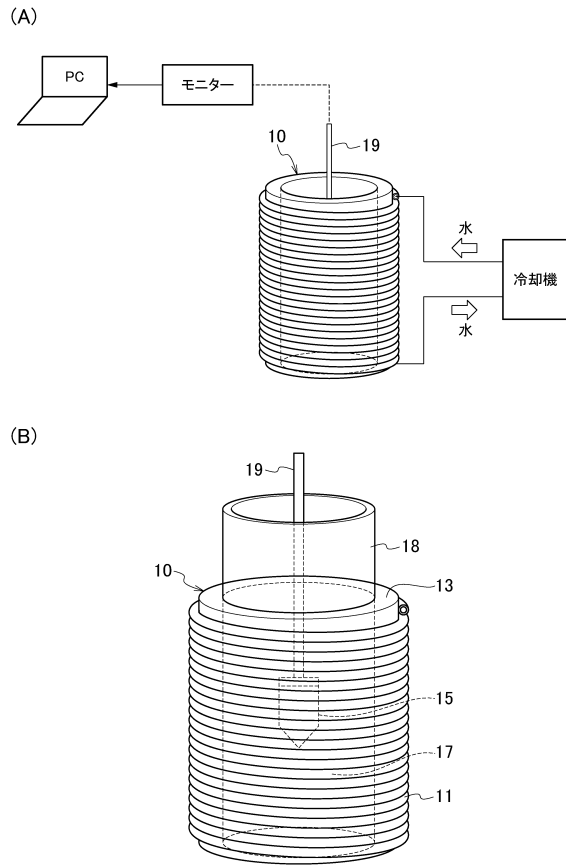
【図1】



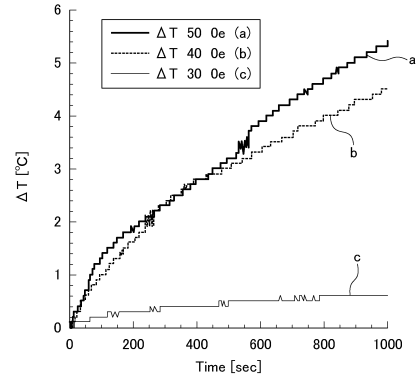
【図2】



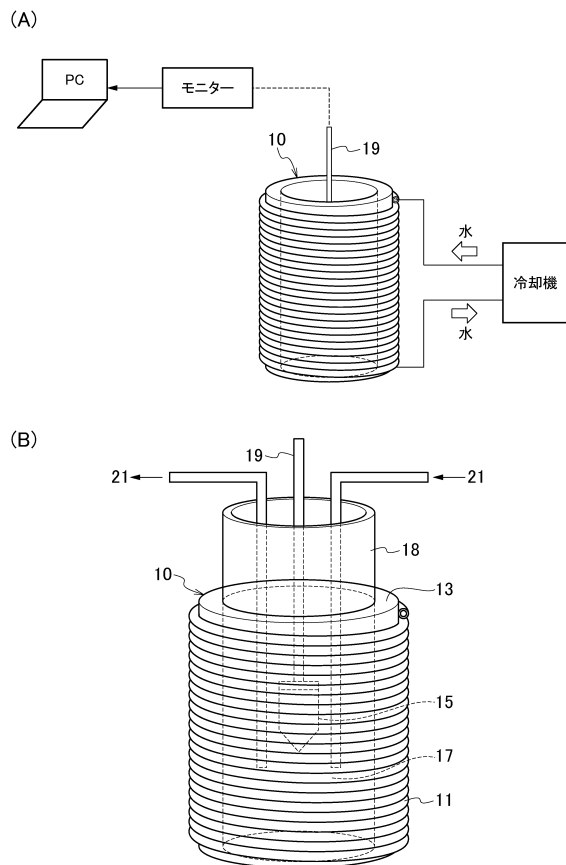
【 図 3 】



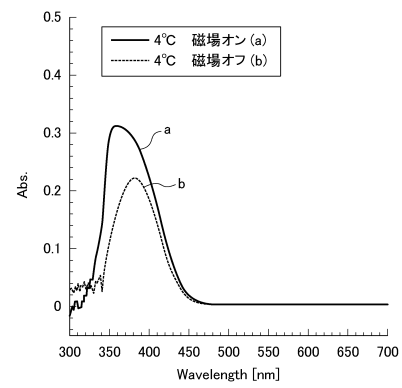
【 図 4 】



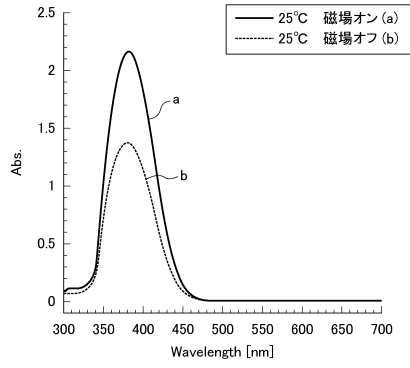
【 図 5 】



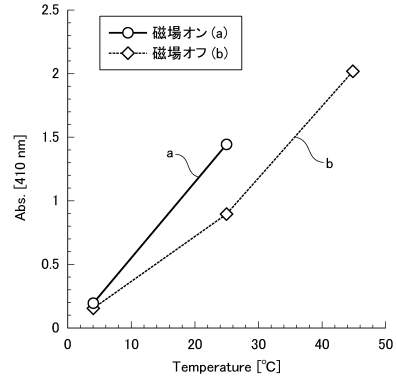
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

- (72)発明者 吉田 一成
大阪市東淀川区下新庄5 - 6 - 16 - 506
- (72)発明者 鹿倉 敏裕
大阪府羽曳野市西浦2丁目1720番14号

審査官 岡崎 忠

- (56)参考文献 特開2009 - 281728 (JP, A)
特開2010 - 062444 (JP, A)
特開2010 - 151528 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08L 89/00 - 89/06
A61B 19/00 - 19/08
C08K 3/00 - 3/40
C12N 9/00 - 9/99

专利名称(译)	酵素复合体		
公开(公告)号	JP5867248B2	公开(公告)日	2016-02-24
申请号	JP2012082980	申请日	2012-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	捷恩智株式会社		
申请(专利权)人(译)	家长株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	家长株式会社		
[标]发明人	清野智史 古賀雄一 中川貴 吉田一成 鹿倉敏裕		
发明人	清野 智史 古賀 雄一 中川 貴 吉田 一成 鹿倉 敏裕		
IPC分类号	C08L89/00 C08K3/22 A61B90/70 C12N9/00		
CPC分类号	A61B1/12 A61L2202/24 A61M2025/0019 C12N11/02		
FI分类号	C08L89/00 C08K3/22 A61B19/00.513 C12N9/00 A61B90/70		
F-TERM分类号	4B050/CC10 4B050/DD02 4B050/KK01 4B050/LL01 4B050/LL10 4J002/AD031 4J002/DE076 4J002/DE116 4J002/FB266		
其他公开文献	JP2013213099A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过使用其中结合有磁性颗粒和酶的混合材料并通过打开和关闭外部磁场利用发热现象来提供控制新磁性颗粒的酶活性功能的复合物。 解决方案：该酶复合物由磁性颗粒和来自嗜热细菌的酶组成，具有温度响应功能。 【选择图】无

(21) 出願番号	特願2012-82980 (P2012-82980)	(73) 特許権者	311002067
(22) 出願日	平成24年3月30日 (2012. 3. 30)		JNC株式会社
(65) 公開番号	特開2013-213099 (P2013-213099A)		東京都千代田区大手町二丁目2番1号
(43) 公開日	平成25年10月17日 (2013. 10. 17)	(74) 代理人	110002000
審査請求日	平成26年11月17日 (2014. 11. 17)		特許業務法人栄光特許事務所
前置審査		(72) 発明者	清野 智史 大阪府豊中市新千里東町2丁目7番C14-108
		(72) 発明者	古賀 雄一 大阪府吹田市津雲台5丁目9番地D39-102
		(72) 発明者	中川 貴 大阪府箕面市西小路3丁目11-25