

氏 名 (本籍)	お 小 川 和 義 (岐 阜 県)
学 位 の 種 類	博 士 (生物工学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 2004 号
学位授与年月日	平成 16 年 2 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	酵素を固定化した高分子電解質ゲルのバイオケモメカニカル特性に関する研究

主 査	筑波大学教授	工学博士	國府田 悦 男
副 査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副 査	筑波大学教授	農学博士	富 田 文一郎
副 査	筑波大学教授	農学博士	佐 藤 誠 吾

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

高分子ゲルは、架橋された高分子鎖の三次元網目の間に多量の溶媒が保持された状態をとり、ゲルをとり囲む外部環境の微小な変化に応答して可逆的に膨潤・収縮する。この現象はゲルの体積相転移と呼ばれ、高分子ゲル系で見られるユニークな物性の一つである。特に、僅かな温度変化によって体積相転移を行う N-イソプロピルアクリルアミド (NIPA) 系の高分子ゲルは、基礎と応用の両面から多くの研究が行われている。その一例として、ゲルに酵素を包括させ、固定化酵素反応により体積相転移を誘起する方法が提案されている。このゲル包括酵素系は、ゲルの伸び・縮み（体積相転移）を通して、生物化学反応（酵素反応）のエネルギーを力学エネルギーに変換可能な材料系であり、バイオケモメカニカルシステム (BCMS) と呼ばれている。

本論文は、ウレアーゼやグルコースオキシダーゼ (GOD) の様な pH 変化を促す酵素を固定化した NIPA 系高分子電解質ゲルを用い、酵素反応による pH 変化で伸び・縮みする BCMS について研究したものである。主たる研究目的は、BCMS の膨潤・収縮速度を速めるための手法の開発にあり、併せてゲル相内の pH 分布に関する基礎的知見を得ることも重要な課題とした。実験方法と研究結果の概要は以下の通りである。

- (1) ゲルの体積相転移速度は、そのサイズが小さいほど大きくなるという事実に着目して、直径が 200nm 程度の NIPA/ ビニルイミダゾール (VI) 共重合体網目から成るゲル微粒子に、ウレアーゼを包括固定する方法を確立した。この BCMS 微粒子は、基質である尿素を添加した場合に、酵素反応による pH の上昇で顕著な収縮が起こることを、動的散乱実験から明らかにした。さらに、その時の収縮速度は、サブミリメートルの大きさを有するバルクゲルの BCMS に比べて、非常に早いことを示した。この結果に着目して、BCMS 微粒子をメンブランフィルターの細孔内に物理的に充填し、その膨潤・収縮により細孔内を通る液体の透過が on/off 制御できる“バイオケモメカニカルバルブ”の構築に成功した。
- (2) GOD を用いた BCMS は、グルコースの酸化による pH 低下を駆動力とする。しかしながら、グルコースの酸化生成物は  $\delta$ -グルコノラクトンであり、グルコン酸への加水分解は非酵素的に進行する。そのため pH 低下が遅く、これが BCMS の収縮（又は膨潤）速度を遅くする原因であった。そこで、 $\delta$ -グルコノラクトンの加水分解を触媒するグルコノラクトナーゼ (GdLase) を *Aspergillus niger* から単離し、GOD

と共に包括固定化した BCMS の作成を試みた。その結果、GOD/GdLase 系 BCMS の収縮速度は、GOD のみを用いた BCMS に比べ、十倍以上速くなることがわかった。

- (3) 本研究で対象とする BCMS は、ゲル相内での基質と生成物（酸又は塩基）の拡散の違いにより pH 勾配が形成し、BCMS の膨潤・収縮速度が変化する。そこで、NIPA/VI 系高分子電解質ゲルにウレアーゼを固定化した小さな円筒状 BCMS（直径 290 ～ 640 $\mu\text{m}$ ；長さが約 2000 $\mu\text{m}$ ）を用い、顕微鏡下で収縮時の位置依存性を経時的に観察した。さらに、無限長円柱の反応拡散モデルを用いた数学的シミュレーションを行い、固定化酵素反応によりゲル相内に形成される pH 勾配を計算した。その結果、シミュレーションと実験の結果は良く一致し、ゲル相内の pH 勾配による不均一な電荷分布が BCMS の膨潤・収縮特性に重要な役割を演じることを明らかにした。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

高分子電解質ゲルを用いた BCMS の構築に関しては、1990 年代初期に提案されており、その後幾つかの研究例が報告されている。しかしながら、酵素反応に誘起される BCMS の膨潤・収縮を速度論的に研究した例は見当たらず、さらにゲル相内での生成物（酸又は塩基）の分布と BCMS の膨潤特性を関係付けた解析は全く行われていない。本論文の著者は、以上の点に注目し、酵素反応による pH 変化で伸び・縮みする BCMS の体系的な研究を行った。その結果、以下の点で重要な科学的知見を得ている。①熱収縮する NIPA 系ポリイオンを用いたことで、直径が約 200nm のゲル微粒子に酵素を包括固定する方法を確立し、膨潤・収縮速度が極めて早い BCMS の構築に成功した。②この BCMS を膜細孔内に充填し、酵素反応によりポアチャンネルを生成させて液体の透過制御が出来ることを実証した。③ GOD/GdLase から成る複合酵素系を用いた BCMS を構築し、酵素化学的手法によって膨潤（収縮）を速めることに成功した。④ゲル相内に形成される基質と生成物の分布を反応拡散モデルを用いた数学的シミュレーションによって予測し、この予測が正しいことを実証した。これらの成果は、高分子化学や生物工学分野のみならず、両分野の境界領域として発展している生体模倣化学の分野に於いても高く評価できる。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。