

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

学位論文題目	せん断流によるリポソームの構造変化を利用した気泡塔内せん断速度の測定と酵素反応制御
--------	---

氏 名	夏目 友誉
-----	-------

脂質二分子膜小胞であるリポソームは、内部の微小液滴に酵素をはじめとするバイオ分子を可溶化できる。リポソームは生体膜と同じ基本構造をもつため薬物担体やバイオセンサー等への応用が期待されている。リポソームの重要な機能として、脂質膜の透過選択性が挙げられる。リポソーム内に構築された酵素反応系では、酵素活性の安定性が著しく増大する場合があるが、親水性基質に対する脂質膜の高い透過抵抗のため触媒反応速度が著しく低下する。これまでに、脂質膜の透過性を低濃度の界面活性剤やペプチドにより増大させる手法が報告されている。一方、超音波や液体せん断ストレスのような機械的ストレスを利用した膜構造・透過性の制御も報告されている。流体の流れの速度勾配に起因するせん断ストレスの発生はバイオリアクター等の実用反応器において不可避であり、これを利用したリポソーム系酵素反応の制御が実現すれば多様な応用が期待できる。本研究では、せん断ストレスに基づくリポソームの構造と機能の制御法について明らかにするとともに、それらを利用した反応器内流動特性の測定法の開発と合理的な触媒反応プロセスの構築を目的とする。具体的には、これまで報告例が著しく少ない比較的小さな粒子径をもつリポソームの構造・機能とせん断ストレスの関係を明らかにする。さらに、従来法では困難であった気泡塔内混相流のせん断速度の測定及びせん断ストレスに対する酵素分子とリポソームの構造変化を複合利用した高効率酸化反応系の構築について検討する。本論文は緒論と結論を含め5章で構成される。各章の内容は下記のとおりである。

第1章では、脂質膜と酵素封入りリポソームの基本的な特性、せん断ストレスに対する酵素分子と脂質膜の応答性に関する従来知見、気泡塔バイオリアクターの応用におけるせん断速度の重要性及び本研究の背景・目的と論文の構成について述べている。

第2章では、リポソームの膜透過性に及ぼす液体せん断ストレスの効果について述べている。親水性蛍光色素 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) のリポソーム膜透過性を40-55℃で負荷されたせん断ストレス条件下で実測した。定義されたせん断場を形成させるためにコーン・プレート型粘度計を使用した。温度、せん断速度、リポソーム径(101-323 nm)の各特性とCFの膜透過係数の関係を明らかにした。さらに、負電荷脂質を含有するリポソームをカルシウムイオン共存下でクラスター化させる手法を開発した。クラスター化リポソームは、せん断流中で柔軟に構造変化して、高い膜透過性を示すことを明らかにした。

第3章では、せん断ストレスに依存するリポソーム膜の透過性に基づいて、気泡塔内で発生するせん断速度を測定する方法について述べている。スケールと形状が異なる外部循環式エアリフト型気泡塔及び標準型気泡塔にCF封入りリポソームを懸濁して、CFの膜透過係数を実測した。この結果と第2章で明らかにしたせん断ストレスと膜透過係数

の関係に基づき、各気泡塔内のせん断速度の測定を行った。この測定に有用なリポソームとして、気泡との相互作用が小さい負電荷リポソームを提案している。この手法に基づき、ライザー/ダウンカマー断面積比と塔高が種々異なる 3 種類の外部循環式気泡塔内のせん断速度を合理的に測定した。特に、気泡塔内では、せん断速度の分布が存在して、ガス分散板近傍におけるせん断速度の寄与がきわめて大きいことを明らかにした。

第 4 章では、微小円管内で形成される層流場を利用した酵素封入リポソームの安定性と活性の制御について述べている。層流は $380\ \mu\text{m}$ 以下の内径をもつ円管中にグルコースオキシダーゼを内包させたリポソームの懸濁液を送液することで発生させた。この系では、第 3 章の気泡塔に比べて高いせん断ストレスが円管壁面近傍においてリポソーム膜に負荷される。その結果、脂質膜の著しい構造変化とリポソーム内包酵素の液本体への放出が起こることを明らかにした。さらに、リポソーム非共存下の層流において、酵素分子が構造変化して失活する傾向が認められたが、リポソームの共存下では静止液系よりも高い酵素活性が長時間維持されることを明らかにした。

第 5 章では、リポソームのせん断ストレス応答性に基づく気泡塔反応器内せん断速度の測定とリポソーム系酵素反応の連続的加速化に関する結論を述べている。本論文は、各種バイオリアクター内の流動特性を活性制御因子とする生体触媒の開発、せん断ストレスに対する細胞の応答機構の解明及び血流応答性の薬物担体の開発等につながる重要な知見を与えている。

【論文審査結果の要旨】

脂質二分子膜ベシクル（リポソーム）は、内水相に酵素を可溶化することができる。リポソーム内水相に可溶化された酵素の反応性は、基質分子に対する脂質膜の高い透過抵抗のため著しく低下する場合がある。これまでに、膜タンパク質、界面活性剤、ペプチド等により脂質膜の透過性を増大させる手法が報告されている。一方、液体せん断ストレスをはじめとする機械的因子に基づく透過性の増大も報告されている。せん断ストレスの発生は種々の反応器で不可避であり、これに基づくリポソーム系酵素反応の制御が実現すれば、新しい触媒の開発につながる。本研究では、せん断ストレスに基づくリポソームの構造と機能の制御法について明らかにしている。さらに、従来法では困難であった気泡塔内混相流のせん断速度の実測及びせん断ストレスに対する酵素分子とリポソームの構造変化を利用した高効率なグルコース酸化反応プロセスの構築について検討している。

第1章では、リポソームと酵素封入リポソームの特性、せん断ストレスに対する酵素分子と脂質膜の応答性に関する従来知見、気泡塔の応用におけるせん断速度の重要性とせん断速度を与える従来の実験・理論式の特徴及び本研究の背景・目的と論文の構成について述べられている。

第2章では、種々の条件下におけるリポソームの膜透過性に及ぼすせん断ストレスの効果について述べられている。このために、低分子量の親水性蛍光色素のリポソーム膜透過性を各温度で負荷されたせん断ストレス条件下で実測している。ここでは特に温度、せん断速度、リポソーム直径の各特性が色素の膜透過係数に及ぼす影響を明らかにしている。さらに、負に帯電させたリポソームをカルシウムイオン共存下でクラスター化させる手法を開発して現象を理論的に解析するとともに、せん断流中ではクラスターの最外層を構成するリポソームが更新され、各リポソームが高い膜透過性を示すことを明らかにしている。

第3章では、せん断ストレスにより脂質膜の透過性が增大する現象を応用して、各種気泡塔内の平均せん断速度を実測する方法について述べている。液体積、塔高、ライザー/ダウンカマー断面積比が異なる外部循環式エアリフト型気泡塔及び塔高が異なる標準型気泡塔に色素封入リポソームを懸濁して、膜透過係数を実測している。ここで得られた結果と第2章で明らかにしているせん断ストレスと色素の膜透過係数の定量的な関係に基づき、各気泡塔内の平均せん断速度を決定している。この方法に適合したリポソームとして、ライザー内の気泡群との相互作用が無視できる負に帯電させたリポソームを提案している。本手法に基づき、種々の外部循環式エアリフト型気泡塔内のせん断速度を合理的に測定している。また、比較的小スケールの気泡塔内では、せん断速度の分布が顕著に存在するとともに、ライザー底部のガス分散板近傍におけるせん断速度の寄与が大きいことを明らかにしている。

第4章では、微小円管内で形成される層流場を利用した酵素封入リポソームの物理的安定性と酵素活性の制御について述べている。層流場は微小内径をもち平行に4本設置した円管中にグルコースオキシダー

ゼ内包リポソーム懸濁液を送液することで形成させている。この系では、第3章の気泡塔内気液流動場に比べて高いせん断速度が円管壁面近傍において発生する。このような特殊な反応場において、脂質膜の局所的な構造変化が誘起されるとともにリポソーム内から液本体へ酵素の漏出が起こることを明らかにした。リポソーム非共存下のせん断流中では、せん断ストレスにより酵素分子が構造変化して失活したが、リポソーム膜を共存させた場合、酵素活性が維持されることを明らかにしている。

第5章では、せん断ストレス負荷条件下におけるリポソームの構造変化を利用した気泡塔内のせん断速度の測定と酵素封入リポソームに触媒される反応の連続的加速化に関する結論を述べている。

以上のように、本論文は、リポソームの局所的な膜構造がせん断ストレス負荷条件下で変化して、透過性の増大や変性酵素への結合をはじめとする種々のリポソーム膜機能の発現が誘導されることを示している。これらの知見は、各種実用反応器の流動状態に基づき活性が制御される新しい生体触媒材料の開発、生細胞が示すせん断ストレスに対する機能的な応答性の解明及び血管内流動を薬物放出因子とする薬物担体の開発等につながる有用なものである。

本審査会、公聴会における主な質問は以下の通りである。

- ・気泡塔のせん断速度と液深の関係は、実際にはガス分散板の効果であることを述べるべきではないか。
- ・将来的に考えられる気泡塔内の局所的せん断速度の測定法として示したものは、非現実的ではないか。
- ・せん断流中の酵素反応の加速化に関する模式図が分かりにくいので、過程毎に示すべきではないか。
- ・全般に内容が多い。専門外の聴講者にも分かり易く内容を精査すべきではないか。
- ・各種気泡塔内のせん断速度が異なるが、液流速と体積の相違の各寄与はどのように評価するのか。
- ・気泡塔内せん断速度の測定法は、特定の気泡塔特性を明らかにするものか、あるいは予測も可能なものか。
- ・リポソームに負電荷脂質を混合しているが、せん断ストレス応答性にはどのように影響するのか。
- ・せん断流中において酵素反応は脂質膜中と液本体のどちらで加速化されるのか。
- ・せん断ストレス負荷条件下におけるリポソーム膜と酵素の相互作用とは具体的にはどのようなものか。

これらの質問に対して、発表者より学位論文の内容に基づき、具体的、適切かつ明確な回答がなされた。また、本学位論文の知見を基にした気泡塔内せん断速度と気液流動特性の関係の解明及びせん断ストレスに対して高い応答性を示すリポソームの開発等に関して議論が交わされた。

以上より、本論文は独創的かつ信頼性と有効性にも優れた研究成果を報告したものであり、博士（生命科学）の論文に十分に値するものと判断した。