

医薬中間体製造に利用可能な不織布型の新規固定化酵素開発

名古屋工業大学大学院工学研究科工学専攻生命・応用化学系プログラム
水野 稔久

1. 緒言

医薬品中間体の化学合成において、酵素を利用することには一定の優位性があり、合成ルートの短縮や、合成収率の向上に寄与したとする報告がある。また指向性分子進化やAI技術の蛋白質設計への利用も相まり、今後様々な化学合成を触媒可能な酵素開発は、より一層進展が見込まれる。しかし一方でやはり酵素が高価で、構造的に脆い触媒試薬であることは否めず、まずは再利用性を高める技術開発を通して経済性を高めることは非常に大事である。現在酵素の再利用性を高めるための方法としては、何がしかの固定化担体に固定化して利用し、反応溶液から引き上げたものを再利用する、固定化酵素の形での利用が広く採用されている。しかし現在利用される大半の固定化酵素では、酵素は樹脂やセライトなどの粒子状材料表面に、吸着される形で利用される場合が多く、反応溶媒に常に晒された状態で利用されることから、変性失活を抑えた利用には制限があること、担体からの酵素離脱による活性低下が懸念されることなどで、改善の余地がある。また、固定化担体との相互作用により、そもそも酵素はある程度変性失活を受けるが、この影響は酵素の種類に依存するために、利用可能な酵素が限定されてしまう点にも改善の余地が考えられる。

一方で近年我々は、電解紡糸法で得られる不織布の繊維内部が、新たな包括型の酵素固定化担体として有効であることを明らかとし、報告をしている¹⁻⁷。酵素が常に溶媒に晒されることで変性失活が誘導されてしまう点は、固定化担体の表面ではなく、内部に固定化する解決法に合理性がある。しかし、内部に固定化する場合には、基質分子の酵素へのアクセスが極端に限定されるため、これを限りなく高められるような、材料側の形状・分子設計に関する工夫が大事となる。電解紡糸法で得られる不織布は、ナノ繊維が積層した空隙性の高い材料形態であり、材料が溶媒に接することが可能な、重さあたりの表面積が非常に高い。さらに、ナノ繊維部分に用いる樹脂に3次元架橋された高分子を用いることで、樹脂材料内部に固定化されつつも、同量の酵素を溶媒に単に溶かした場合と同程度、あるいは局所濃度の高まりから酵素活性が高まる傾向まで見られている⁶。これまで酵素を固定化する不織布の材料には、ポリアクリルアミド (poly(AM)) 系高分子を用いてきた。しかし架橋反応に、ヒドラゾン結合を用いているために、酸性側、あるいはアルカリ性側 pH に至適 pH を持つ酵素を用いた場合に、不織布そのものが崩壊してしまうという問題があった³。また親水性の高い基質であれば繊維内部に浸透可能であり、酵素と酵素反応を達成可能であるものの、ある程度疎水性の高い基質分子の場合には、繊維内部に浸透できず酵素活性の達成に限界があった。本研究ではこれらの問題の解決を目指し、新たにポリ(2-ヒドロキシプロピルメタクリルアミド) (poly(HPMA)) 系の高分子を不織布の部材として用いた、酵素固定化不織布の開発を行った。さらに、エステル化合物を医薬品合成の中間体と見越し、この加水分解反応を可能とする *Arthrobacter globiformis* 由来エステラーゼ⁸の固定化酵素を上記の不織布ベースに開発を行い、この機能評価を行った。

2. 実験方法

2. 1. N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA)の合成

2L ナスフラスコ内で 1-amino-2-propanol (35.9 mL, 0.457 mmol)と Triethylamine (115 mL, 0.831 mmol)を THF (950 mL)に溶解させ、氷浴によって 0°Cまで冷却した。その後、THF (50 mL)で希釈した Methacryloyl Chloride (40 mL, 0.416 mmol)を約 1 時間かけて滴下し、そのまま氷浴中で一晩撹拌した。反応後、反応液は白色沈殿と透明な溶液部分に分かれていた。反応溶液から桐山ロートを用いて沈殿を濾別し、エバポレーターによって濾液の溶媒の減圧留去を行った。溶媒留去後に残った結晶に対して少量の methanol を加え、完全に溶解させた。そこに diethyl ether を結晶が少量析出するまで加え、冷凍庫内で一晩静置し、再結晶を行った。その後、桐山ロートを用いて溶液と分離し、目的物である N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) (25.7 g, 39%)の白色結晶を得た。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, r.t.) 5.67, 5.42 (s, 2H, CH₂=C), 3.90 (m, 1H, -CH(OH)-CH₃), 3.23 (m, 2H, NH-CH₂-), 1.89 (s, 3H, CH₂C(CH₃)-CO-), 1.14 (d, 2H, -CH(OH)-CH₃).

2. 2. 3-アジドプロパン-1-アミンの合成

500 mL ナスフラスコに 3-クロロプロパン-1-アミン(40 g, 308 mmol)、アジ化ナトリウム(76 g, 1170 mmol)を量り取ってイオン交換水 300 mL に溶解させ、80°Cで Overnight 撹拌した。氷浴で 0°Cに冷却後、水酸化カリウム 44 g を添加して溶液を塩基性にした。分液ロートに移してジエチルエーテルで 3 回抽出後、硫酸ナトリウムで 30 分脱水した。エバポレーターで大まかに溶媒留去し、ロータリーポンプで真空乾燥して目的物である AzMA (26.5 g, 85.8%)の黄色オイルを得た。¹H-NMR (400 MHz, D₂O, r.t.) 3.36 (t, 2H, N₃CH₂-), 2.66 (t, 2H, NH₂CH₂-), 1.67 (quin, 2H, -CH₂CH₂CH₂-).

2. 3. N-(3-azidopropyl)methacrylamide (AzMA)の合成

1 L ナスフラスコに 3-アジドプロパン-1-アミン(20 g, 0.2 mol)、トリエチルアミン(36mL, 0.26 mol)、ハイドロキノン(78.9 mg, 0.71 mmol)を量り取って、ジクロロメタン(脱水) 400 mL に溶解させ、氷浴により 0°C に冷却した。50 mL のジクロロメタンに希釈した塩化メタクリロイル (40 mL, 0.4 mol)を、約 1 時間かけてゆっくりナスフラスコ中に滴下した。そのまま Overnight 撹拌を行った。反応溶液を分液ロートに移し 2M HCl, 2M NaOH でそれぞれ 2 回ずつ洗浄した後、イオン交換水で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムによって脱水した後、エバポレーターで溶媒留去し、薄ピンクオイルを得た。シリカゲルクロマトグラフィー(展開溶媒:DCM)によって精製後、目的物である AzMA のオイル(2.6 g, 19 %)を得た。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, r.t.) 6.36 (brs, 1H, -CONHCH₂-), 5.65, 5.29 (s, 1H, CH₂=C), 3.36 (tが重なる, 2H, N₃CH₂CH₂CH₂NH-), 1.91 (s, 3H, CH₃C(CH₂-), 1.80 (qvin, 2H, N₃CH₂CH₂CH₂NH-).

2. 4. poly(HPMA/AzMA)の合成

100mL シュレンク管に HPMA (8.5 g, 59.4 mmol)、AzMA (2.5 g, 15.3 mmol)、AIBN (1.74 mg, 10.6 μmol)秤量し、DMSO 30 mL に溶解させる。窒素バブリングを 30 分行った後、フリーズポンプソーを 3 回して最後に窒素置換した。90°C、5 時間加熱撹拌した。大気開放しクエンチ後、アセトン:ジエチルエーテル=3:1 の混合溶媒で再沈殿を 2 回行った。最後にイオン交換水に溶解させ、凍結乾燥で目的の Poly(HPMA/AzMA) の白色粉末を得た。合成確認と AzMA モノマーユニットの導入率は ¹H-NMR により行い、Mn、PDI はゲル濾過クロマトグラフィーにより分析を行なった。

2. 5. poly(HPMA/DAMA)への架橋剤 Bis-Alkyne-PEG0 (BP-1) 添加による高分子溶液のゲル化挙動の検討

1.5 mL エッペンチューブに Poly(HPMA/AzMA) 20mg を量り取り、100mM Tris-HCl(pH 7) 67 μ L に溶解させたのち、ここへ酵素を終濃度 0, 5, 10, 15, 20, 25 wt%となるように添加して溶解した。BP-1 (2.696M, in EtOH)、CuSO₄ · 5H₂O(100mM, in 100mMTris-HCl(pH 7))、アスコルビン酸ナトリウム(500mM, in 100mMTris-HCl(pH 7))を 5 μ L 順に添加し、各溶液添加後はボルテックスでよく混合した。溶液が動かなくなった時間を架橋終了時間と定め、その時間を計測した。

2. 6. *Arthrobacter globiformis* 由来エステラーゼを固定化した poly(HPMA/AzMA)-Nylon6 不織布の作製

30wt%の Poly(HPMA/AzMA)バッファー溶液 (100mM Tris-HCl(pH 7)) 1 mL を準備し、BP-1(2.696M, in EtOH)を 11.5 μ L 溶解後、エステラーゼを添加する場合にはここへ終濃度 10wt%となるようにエステラーゼを添加した。CuSO₄ · 5H₂O(80mM, in 100mMTris-HCl(pH 7))、アスコルビン酸ナトリウム(400mM, in 100mMTris-HCl(pH 7))を 5 μ L 順に添加したのち 1 mL のディスポシリンジに移し、シリンジポンプ 1 にセットした (コア前駆体溶液の準備)。一方で Nylon6 の 15w/v% TFE 溶液を準備し、これを 5 mL のディスポシリンジに移し、シリンジポンプ 2 にセットした (シェル前駆体溶液の準備)。コア前駆体溶液、シェル前駆体溶液それぞれを、テフロンチューブを介してコアキシャルスピナレットに繋ぎ、押し出し速度 0.2 mL/hr、0.8 mL/hr で溶液を押し出しつつ、20 kV の印加電圧で電解紡糸した。なお、スピナレットの先からコレクターまでの距離は 15 cm とした。得られた不織布のナノ繊維積層構造の確認は、オスミニウムコート後の SEM 測定 (JSM-7800F、日本電子社) により確認した。

2. 7. *Arthrobacter globiformis* 由来エステラーゼ固定化不織布の各種ニトロフェニルエステル基質に対する酵素活性の評価

5 mL の 50 mM Phosphate buffer (pH 7)/EtOH =1/1 に各種エステラーゼ固定化不織布を 1, 3, 5 mg 浸漬した。その後、ここへ各種ニトロフェニルエステル (pNP-Ac, pNP-Bu, pNP-Hx) の EtOH ストック溶液 (300 mM) を 50 μ L ずつ添加し (終濃度は 3 mM)、20°C で 1 時間反応させた。リファレンスとして、不織布を添加せず各種ニトロフェニルエステル (pNP-Ac, pNP-Bu, pNP-Hx) の EtOH ストック溶液 (300 mM) を 50 μ L ずつ添加し (終濃度は 3 mM)、20°C で 1 時間反応させたサンプルも評価した。406 nm の吸光度を測定することで、各々のエステラーゼ固定化不織布から得られる酵素生成物の量を見積もった。酵素量に対して、酵素生成物量をプロットすることで、不織布に内包固定化された酵素のみかけの酵素活性 ($\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) を算出した。

2. 7. エステラーゼ固定化不織布をカラム管に充填した酵素カラムを用いた、加水分解活性の評価

電解紡糸された不織布 50 mg をほぐし、5 mm ϕ のガラスビーズと共にカラム管 (バットボリウム 5 mL, FliQ FPLC Columns, Protein Ark 社) に充填した。ペリスタポンプを用いて、流速 1.75 mL/min で 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7) 10 mL を循環後、カラム管をアルミ製ビーズの充填されたホットプレートにセットし 40°C で温めた。そのまま基質として Phenolphthalein dibutyrate (終濃度 50 μ M, Sigma-Aldrich 社) が溶解された 200 mM Glycine-NaOH バッファー (pH 10) 溶液 10 mL を、ペリスタポンプを用いて一定流速 (1.75 mL/min) で循環させながら、60 分、40°C で反応をさせた。10 分ごとに基質溶液の分析を行うことで、基質の加水分解量の時間変化を評価した。

3. 実験結果

3. 1. 不織布作製のための高分子 poly(HPMA/DAMA)の合成と GPC、¹H-NMR による分析

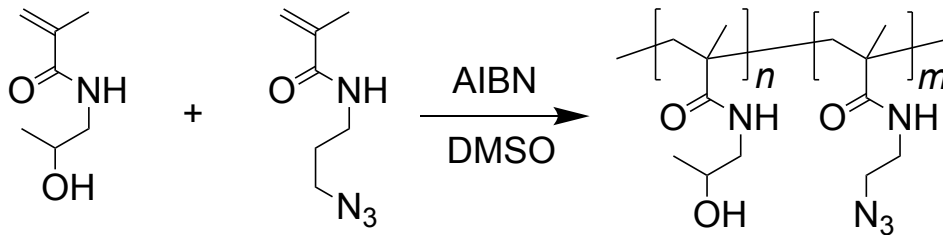


図1 poly(HPMA/AzMA)の合成

後架橋可能な poly(HPMA)系の水溶性高分子 poly(HPMA/ AzMA)は、HPMA と AzMA のフリーラジカル重合で合成は行った (図1)。¹H-NMR による分析から、架橋点となるアジド基を含むモノマーユニット AzMA のモノマー分率は 25%であった。GPC 分析によりこの高分子の分子量評価を行ったところ、 $M_n = 60 \text{ kDa}$ 、 $PDI = 2.22$ であることがわかった (図2)。また本実験でのリファレンス化合物となる polyAM 系の水溶性高分子 poly(AM/DAAM) (図3) は、アクリルアミド AM、ジアセトンアクリルアミド DAMA の RAFT 重合により行ない、 $M_n = 60 \text{ kDa}$ 、 $PDI = 2.22$ であった。

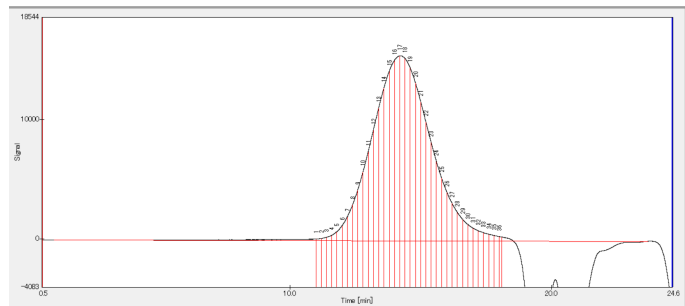


図2 poly(HPMA/AzMA)の GPC チャート

3. 2. poly(HPMA/DAMA)へのビスアルキリンカー-Bis-Alk-PEG1 の Huisgen 環化付加反応を介した高分子溶液のゲル化挙動の検討

poly(HPMA/AzMA)が、ビスアルキリン構造を持った BP-1 を添加し Cu^{2+} +アスコルビン酸を触媒として添加することで、高分子鎖同士が架橋されて水和ゲルが得られるか評価した。また、この過程がエステラーゼのような酵素添加をしたときに影響を受けるか評価した。図4(a)は左から、酵素濃度 0, 5, 10, 15, 20, 25wt%添加してゲル化を行ったサンプルの状態であるが、いずれも水和ゲルの形成が可能であった。またゲル化が進行し poly(HPMA/AzMA)溶液が硬化するまでの時間を評価したところ、酵素の添加により硬化するまでの時間は若干遅くなる傾向がみられたが、20wt%程度までの添加濃度であれば、その硬化速度は大きくは影響を受けないことが分かった。我々が編み出した酵素を繊維内部に固定化した不織布作製手法 (*In situ* Crosslinking during Electro-Spinning (SCES) 法)¹⁻⁷では、電解紡糸の途上で酵素を含んだ高分子水溶液

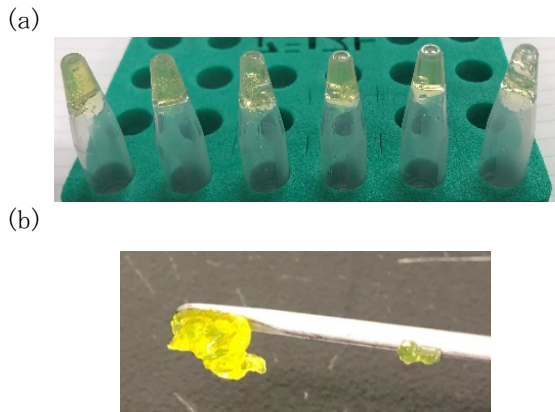


図4 (a) 架橋剤の反応により得られた poly(HPMA /AzMA)の水和ゲル(左から、酵素濃度が 0, 5, 10, 15, 20, 25 wt%添加したサンプル)、(b)チューブから取り出した水和ゲルの様子

表1 poly(HPMA /AzMA)のゲル化速度への酵素添加濃度の影響評価

酵素濃度 (wt%)	0	10	15	20	25
硬化までの時間(min)	93	217	247	217	137
硬化時間の低下割合(%)	---	233	266	233	147

をゲル化させながら電解紡糸をする必要があり、従来の poly(AM/DAAM) を架橋剤添加によりゲル化可能な高分子として用いて酵素固定化不織布を作成する場合、酵素添加濃度を高められないという問題があった（酵素を高濃度で添加したとき硬化までの時間が短くなり、電解紡糸ができない問題があった）。しかし本研究で開発を行った poly(HPMA/AzMA) を部材に用いることで、この問題の解消が可能となった。

3. 3. エステラーゼを繊維内部に固定化したコアシェル不織布の作製、電子顕微鏡観察によるナノ構造の評価

不織布の作製は、図5に示すようなコアシェル型の不織布作製が可能となるコアキシャルスピナレットを用いて紡糸した。エステラーゼをコア成分の前駆体溶液に終濃度 10wt% となるように添加し、不織布作製を行った。シェル部分には、基質分子の効果的な浸透性は維持しつつ、不織布に実用的な機械的強度を付与可能と以前の研究から分かっている、

Nylon6 を用いた⁶。得られた不織布が、エステラーゼの添加後も、ナノ繊維積層構造が維持できているか、SEM 測定により評価を行った。その結果を図6に示した。これらの結果より、まず以前に報告をしていた poly(AM/DAAM) /Nylon6 不織布⁶ と同様な、電解紡糸で得られる不織布に特徴的な 300 nm 程度の繊維径からなるナノ繊維積層構造が poly(HPMA/AzMA) /Nylon6 不織布でも観測され、これらの高分子部材の組み合わせでも均一な不織布作製が可能であることが確認された。さらに、poly(HPMA/AzMA) に対して 10wt% の重量比になるようにエステラーゼを添加して作製された不織布についても、エステラーゼを添加していない不織布と同様な、ナノ繊維積層構造が観測されたことから、不織布の繊維内部への高濃度な酵素の固定化を、不織布の形状への影響を抑えて可能となることも確認された。

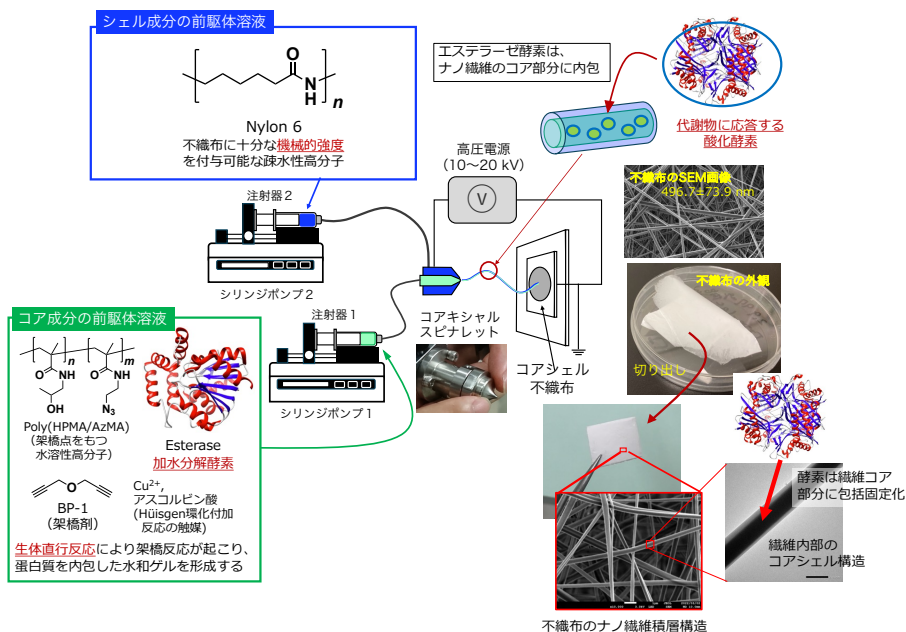


図5 コアシェル電解紡糸法を用いた不織布作製装置のセットアップ

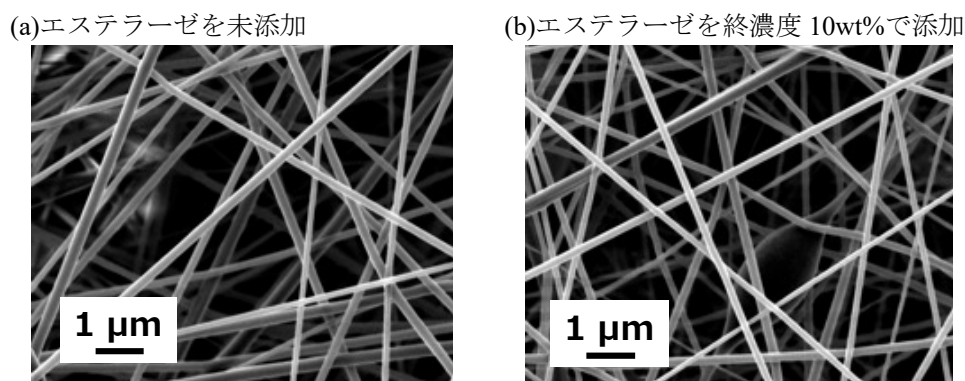


図6 エステラーゼを固定化した poly(HPMA/AzMA) /Nylon6 不織布の SEM 画像 ((a) エステラーゼ未添加、(b) エステラーゼを 10wt% 添加)

3. 4. poly(HPMA/AzMA)不織布の pH 変化に対する安定性評価

酵素の至適 pH は全ての酵素が中性付近にあるわけではなく、酸性側にあるもの、あるいは塩基性側にあるものも存在する（本研究で検討を行う *Arthrobacter globiformis* 由来のエステラーゼは、至適 pH が pH10 にある）。一方でこれまでに検討を行ってきた poly(AM/DAAM)不織布をベースとしたコアシェル不織布では、pH 5 以下の pH 領域、あるいは pH10 以上の領域では、高分子間の架橋構造が壊れて不織布が崩壊してしまう問題があった³。一方で今回共有結合型の架橋形式で水和ゲルを形成する poly(HPMA/AzMA)をベースとした不織布とすることで、この問題が解決可能か検討を行った。作製された poly(HPMA/AzMA)不織布を、pH2、pH5、pH10 のバッファー溶液中に 3 日間浸漬後の不織布の状態を比較した（図 7）。

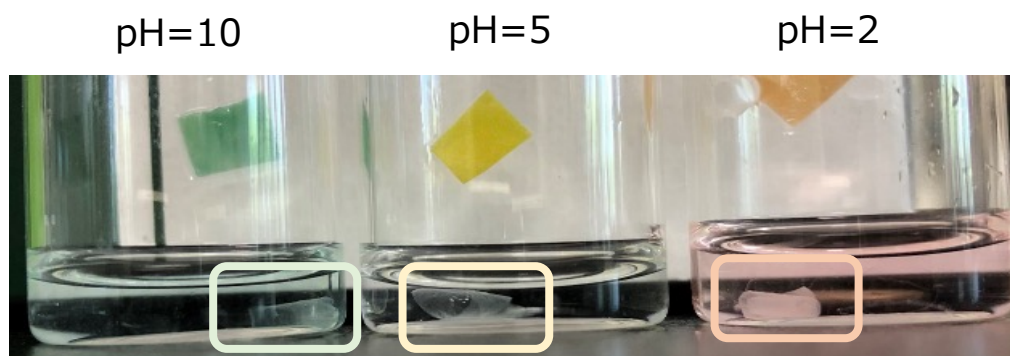


図 7 各 pH における Poly(HPMA/AzMA)不織布の浸漬後の様子(3 日後)

その結果、期待したように、酸性側、塩基性側のいずれの pH のバッファー溶液に浸漬した場合にも、不織布の構造崩壊は見られなかった。この結果は、我々の編み出した SCES 法に基づく酵素固定化手法の欠点であった、用いられる酵素の至適 pH が中性付近にあるものしか利用できない制約が、poly(HPMA/AzMA)をベース高分子として用いた不織布とすることで解消可能であることを示した。

3. 5. エステラーゼを固定化した poly(HPMA/AzMA)/Nylon6、poly(AM/DAAM)/Nylon6 不織布の加水分解活性の比較

我々が検討を行っている不織布型の酵素固定化担体では、固定化する酵素蛋白質の材料中での安定性向上をはかるため、酵素は網目構造を形成する水溶性高分子のネットワークの中に閉じ込め、これを、コアシェル構造を持った不織布ナノ繊維のコア部分に利用している。これまでにコア繊維部分にポリアクリルアミドベースの poly(AM/DAAM)、シェル部分に Nylon6 を用いたコアシェル不織布を用いた検討から、水溶性の高い基質であれば、この水和ゲルからなるコア繊維部分に基質が浸透可能であり、溶液中に単に酵素を溶解した場合に匹敵する酵素活性が発揮可能とわかっている⁶。一方でエステルなどの比較的疎水性の高い基質の場合には、親水性の高いコア繊維部分に浸透しづらく、こ

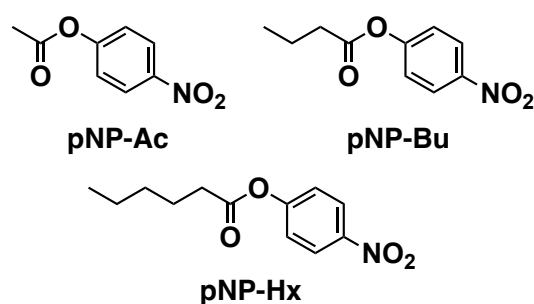


図 7 アルキル鎖長の異なるエステル基質

表 2 酵素活性 (nmol ug⁻¹ min⁻¹) の比較

エステル基質	エステラーゼ固定化 poly(HPMA/AzMA)/nylon 6 不織布
pNP-Ac	357.4
pNP-Bu	~0
pNP-Hx	~0

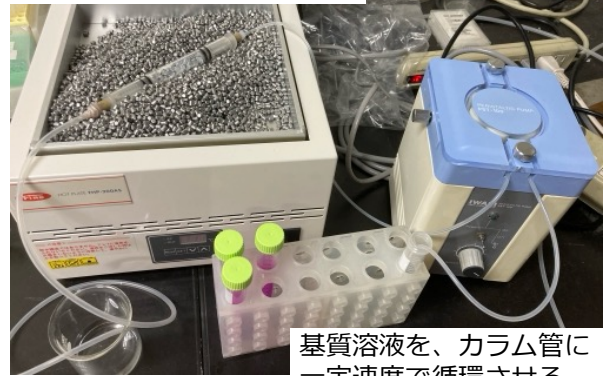
れにより反応性が上がらない問題があった。それを踏まえて、従来用いていた poly(AM/DAAM)からなるコア繊維部分を含む poly(AM/DAAM)/nylon 6 不織布から、本研究で検討を行う疎水度の高まった poly(HPMA)系のコア繊維部分を含む poly(HPMA/AzMA)/nylon 6 不織布になることで、図 10 に示す疎水度の異なる基質の加水分解をさせた場合に、poly(HPMA/AzMA) /nylon 6 不織布に優位性が見られるか、評価した。基質と

して疎水度の異なるエステル化合物を基質分子として選び、pH 7 のリン酸緩衝液中での加水分解反応の評価を行った。その結果を表 2 に示したが、残念ながら pNP-

エステラーゼ固定化不織布を解して、ガラスビーズの入ったカラム管に充填



一定温度 (40℃) で不織布を充填したカラム管を保持



基質溶液を、カラム管に一定速度で循環させる

Bu 程度の疎水性分子であっても、

図 8 カラム管に充填されたエステラーゼ固定化 poly(HPMA/AzMA)/Nylon6 不織布と、これを連続流路系にセットした反応系の構築

poly(HPMA/AzMA)/nylon 6 不織布では、基質の浸透量増加と、それに伴う酵素反応性の改善は見られなかった。poly(AM/DAAM)と poly(HPMA/AzMA)は共に水溶性であるが、一方で poly(HPMA/AzMA)は DMSO や DMF など疎水性の高い溶媒にも溶解可能である。これにより疎水性の基質に対する浸透性の向上が得られると期待されたが、こちらは今後さらに検討を進めていきたい。

3. 6. 不織布のカラム管への充填、連続流路系での反応評価

最後に、エステラーゼ固定化不織布の工業的な利用のデモンストレーションとして、エステラーゼ固定化不織布を充填したカラム管を用いたエステル基質の加水分解反応の検討を行った。残念ながら、当初研究目的としていた菊酸エステルの加水分解反応への利用は検討が間に合わなかったため、ここでは *Arthrobacter globiformis* 由来エステラーゼの活性評価法として報告のある Phenolphthalein Dibutyrate を基質分子として用いた活性評価を行った⁸。エステラーゼを固定化した poly(HPMA/AzMA)/Nylon6 不織布 50 mg をほぐし、5 mmφ のガラスビーズと共に、ベット体積 5mL のカラム管に充填した (図 8 左下)。ガラスビーズと共に充填するのは、不織布をそのまま充填してしまうと、送液によってカラム内の圧力が高くなり、一定流速での送液ができなくなってしまう

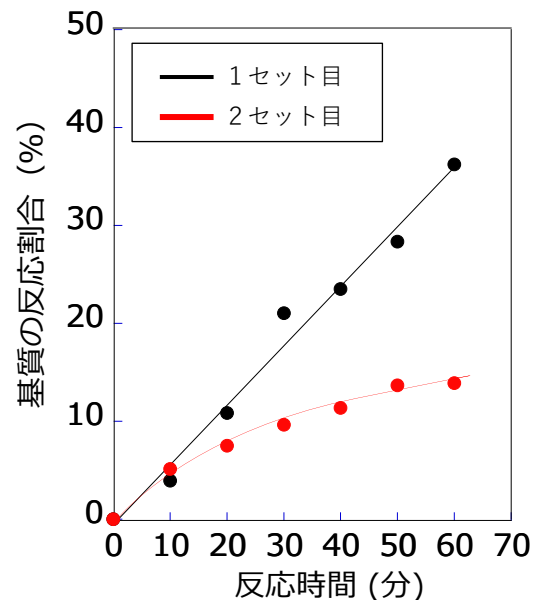


図 9 エステラーゼ固定化不織布を充填したカラム管に、基質となる Phenolphthalein Dibutyrate (50 μM) を溶解した 200 mM Glycine-NaOH バッファー (pH 10) 溶液を、一定流速 (1.75 mL/min) で循環させて 40℃ で反応させた時の、基質の反応割合の反応時間依存性

まうためである。さらにこれを、4 0°Cのホットプレート上でアルミビーズ内に埋める形でセットし、基質となる Phenolphthalein Dibutyrate (50 μ M) を 200 mM Glycine-NaOH バッファー(pH 10)に 10 mL 溶解し、一定流速 (1.75 mL/min) で循環させて 4 0°Cで反応させた (図 8 右)。送液される溶液内での、基質の反応割合を 1 0 分ごとに調べた結果を、図 9 に示した。6 0 分間での連続的な送液反応を 1 セットとして検討した結果、1 セット目では反応時間の上昇に対して直線的に生成物の生成量の増加が見られ、エステラーゼ固定化不織布が管型反応器への利用に有効であることが示唆された。一方で、6 0 分間の 1 セット目の反応後に反応溶液を取り除き、新たな基質溶液を循環して 2 セット目を反応させた結果も図 9 に示した。その結果、2 セット目の反応では反応時間の上昇とともに、基質反応割合に明らかな低下が見られた。今回用いた *Arthrobacter globiformis* 由来のエステラーゼは至適 pH が 10 にあると知られているが、工業的な菊酸エステルの加水分解反応では、再利用はされていない。したがって、至適 pH を塩基性側に持っている一方で、この pH での構造安定性は必ずしも高くない酵素であることも考えられた。本研究で開発を行った poly(HPMA/AzMA)をベースとした不織布によって、エステラーゼの再利用性がどの程度高められるかに関しては、異なる活性の比較を通したもう少し慎重な検討は必要に感じている。

4. 結論

本研究では、医薬品中間体製造に利用可能な不織布型の新規固定化酵素開発ということで、我々がこれまでに検討を進めてきた不織布型の酵素固定化担体を、*Arthrobacter globiformis* 由来のエステラーゼに利用し検討をおこなった。塩基性条件下 (pH10) でも安定な不織布型の固定化担体を poly(HPMA/AzMA) をベースに新たに開発することで、至適 pH を pH10 に持つ *Arthrobacter globiformis* 由来エステラーゼにも利用可能な固定化酵素の開発が可能となり、これをカラム管に充填した形でも利用できることが分かった。残念ながら、不織布型の固定化担体を利用することで、*Arthrobacter globiformis* 由来エステラーゼに対して再利用性が劇的に向上することまでは達成できなかったが、我々の検討を進めてきた不織布型の酵素固定化担体の工業的な活用に向けて、大きな進展が得られた。

5. 参考文献

1. A. Obata, S. Ito, N. Iwanaga, T. Mizuno, J. R. Jones and T. Kasuga, *Rsc Adv*, 2014, **4**, 52491-52499.
2. S. Koeda, K. Ichiki, N. Iwanaga, K. Mizuno, M. Shibata, A. Obata, T. Kasuga and T. Mizuno, *Langmuir*, 2016, **32**, 221-229.
3. Y. Ido, A. L. B. Maçon, M. Iguchi, Y. Ozeki, S. Koeda, A. Obata, T. Kasuga and T. Mizuno, *Polymer*, 2017, **132**, 342-352.
4. K. Mizuno, S. Koeda, A. Obata, J. Sumaoka, T. Kasuga, J. R. Jones and T. Mizuno, *Langmuir*, 2017, **33**, 4028-4035.
5. Y. Tanikawa, Y. Ido, R. Ando, A. Obata, K. Nagata, T. Kasuga and T. Mizuno, *B Chem Soc Jpn*, 2020, **93**, 1155-1163.
6. T. Ishiguro, A. Obata, K. Nagata, T. Kasuga and T. Mizuno, *Rsc Adv*, 2022, **12**, 34931-34940.
7. Y. Kato, S. Iwata, Y. Nasu, A. Obata, K. Nagata, R. E. Campbell and T. Mizuno, *Rsc Adv*, 2023, **13**, 29584-29593.
8. M. Nishizawa, H. Gomi and F. Kishimoto, *Biosci Biotech Bioch*, 1993, **57**, 594-598.

謝辞

本研究の進行にあたり、天野工業技術研究所研究助成金のサポートを頂き、心から感謝申し上げます。