# 非水系のナノ集合体と生体分子の融合による新機能創製

一非水媒体中におけるナノ集合体とバイオ分子の融合による機能変換と制御一

「変換と制御」領域 後藤 雅宏

#### 要 旨

界面活性剤で形成させたナノ集合体を利用し、酵素やタンパク質、DNA といった生体分子を非 水系の溶媒に可溶化すると、水中と大きく異なる様々な興味深い現象が観察された。本研究では、 ナノ集合体を用いることによって、非水溶媒における複合酵素系の電荷リレー反応をはじめて達成 できた。また、ナノ集合体の閉ざされた空間がタンパク質の自己再生を促進することを明らかにし た。さらに、ナノ集合体中における DNA の特異現象を利用した遺伝子診断法を開発することに成 功した。

## 1. 研究のねらい

生体分子は、当然のことながら水中で効率よく機能するように作られている。本研究では、この ような生体分子に、非水媒体という新たな機能発現の場を与えることがねらいである。通常、生体 分子は、非水溶媒中では高次構造を保持できず、その機能を失うことが多い。このため非水系で生 体分子の機能を引き出すためには、何らかの工夫が必要となる。本研究では、生体分子の機能発現 のために非水系で熱力学的に安定に形成されるナノ集合体を利用した。

非水系における代表的なナノ分子集合体を、逆ミセル

(Fig. 1) と呼ぶが、逆ミセルは、非水系にナノオーダー の安定な微水環境を与えることができる。タンパク質や 核酸 (DNA) に代表される生体分子は、おおむねナノオ ーダーの大きさを有しているため、生体分子をその殻の 中に安定に保持できる。本さきがけ研究では、このナノ 集合体が形成する特異なナノ空間を、積極的に生体分子 の機能発現の場として利用した。これらナノ集合体が作 り出す特異環境はバルクの水のそれと大きく異なるため、 取り込まれた酵素やタンパク質、DNA といった生体分子 が、これら制限されたナノ空間で特異な挙動を示すこと を期待した。



Fig.1 ナノ集合体逆ミセルの模式図

## 2. 研究成果

#### 2. 1 ナノ集合体を利用した酵素の新機能発現

酵素は高選択的・高効率的な物質変換を常温・常圧条件下において可能とする生体触媒である。 近年、遺伝子工学技術の発展により機能改変酵素の創出も可能となり、多岐にわたる分野で生体触 媒の高度利用を目指した研究が展開されている。しかしながら、難水溶性物質の変換反応には非水 溶媒(特に有機溶媒)を用いる必要がある。酵素反応を非水系に展開し、生体触媒を脂溶性・難水 溶性物質の変換反応に利用する技術の開発は、今日の化学工業分野において最も重要な課題の一つ である。

本プロジェクトでは、種々の酵素をナノ分子集合体逆ミセル中に包括し、有機媒体中における生 体触媒の利用へ向けた一連の研究を展開した。

#### 2. 1. 1. 非水系における一電子酸化酵素の機能発現

ペルオキシダーゼやラッカーゼなどの酸化酵素は、種々の芳香族性環境汚染物質を酸化的に分解 し、バイオレメディエーションへの利用が期待される。我々は、すでにペルオキシダーゼが逆ミセ ル中で機能発現しうること、また、界面活性剤により被覆されたペルオキシダーゼが有機溶媒中で 活性を示すことを明らかとした。

一方、ラッカーゼはペルオキシダーゼと同様に種々の化学物質の一電子酸化反応を触媒する。過酸化水素に依存的なペルオキシダーゼ反応とは異なり、ラッカーゼは分子状酸素を利用して酸化反応を触媒する点で特徴的である。また、耐熱性などに優れたラッカーゼも天然界に見いだされており、酵素の安定性やコストの面からペルオキシダーゼよりも工業的利用価値が高い酵素である。本研究では、耐熱性に優れた担子菌ラッカーゼに着目して詳細な検討を行い、有機媒体中での環境汚染物質分解システムの構築を試みた。

構造の異なる 10 種類の界面活性剤から、ラッカーゼの包括に最も有効な界面活性剤(ジ-2-エチル ヘキシルスルホコハク酸ナトリウム, AOT; *n*-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド, CTAB)をスクリーニングした。これらを用いて調製される逆ミセルに包括されたラッカーゼは有機 溶媒中で酵素活性を発現し、環境汚染物質(o-クロロフェノール)の酸化分解を可能とした(Fig. 2)。 また、AOT および CTAB 逆ミセルに包括されたラッカーゼの安定性および反応特性を比較検討す ることで、界面活性剤と酵素分子間に生じる静電的相互作用が機能発現に重要な役割を果たすこと を見出した。ラッカーゼはタンパク質表面において負電荷を生じており、タンパク質-界面活性剤間 の相互作用を緩和するアニオン性界面活性剤(AOT)においてより良好な酵素活性が得られた(Fig. 2)。

逆ミセルに包括したラッカーゼを用 いて 6 種類のフェノール性環境汚染物 質の分解反応を検討した結果、1~3 塩 素置換されたクロロフェノール類が速 やかに分解を受けることを明らかにし た(Table 1)。また、メディエーター化合 物を共存させることで分解効率を大き く向上させることが可能であった(Table 1)。さらに、反応産物を同定することで、 一連の変換反応が脱塩素反応を伴って 進行することを明らかとした。クロロフ ェノール類の毒性は脱塩素により低下 することから、生体触媒を用いた環境浄 化システムの構築が期待される。



Fig. 2 逆ミセルに包括したラッカーゼ によるo-クロロフェノールの分解

Substrate	Conversion (%)				
	Lac	Lac + ABTS	Lac + HBT	Lac + VIO	Lac +NNDA
o-chlorophenol	86.7	100	99.7	100	90.8
<i>m</i> -chlorophenol	4.2	91.5	62.2	74.6	54.3
<i>p</i> -chlorophenol	86.6	100	94.3	95.5	99.2
2,4-dichlorophenol	79.9	97.5	96.5	99.7	99.7
2,4,5-trichlorophenol	8.8	97.3	78.6	81.9	85.9
2,4,6-trichlorophenol	69.1	99.6	90.4	100	100

Table 1 ラッカーゼによるクロロフェノール類の分解とメディエーターの影響

Abbreviation used: Lac, laccase; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazolin-sulfonic acid); HBT, 1-hydorozybenzotriazole; VIO, violuric acid; NNDA, 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid

#### 2. 1. 2. 逆ミセルを用いた酸素添加酵素の機能発現

シトクローム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) は多岐にわたる化合物への酸素添加反応を触媒 する。P450 による酸素添加反応は位置・立体選択的に進行し、有用物質の合成を可能とするため、 多岐にわたる分野での利用が試みられている。しかしながら、P450 の多くは脂溶性化合物を基質と することから、効率的な反応システムを水系媒体中に再構築することは困難である。本研究では、 逆ミセルを利用して P450 反応システムを有機溶媒中で機能化し、高効率な酸素添加反応システム の構築を目指した。これまで、シトクローム P450 の機能を有機溶媒中で発現させた例は報告され ていない。

Pseudomonas putida に由来するカンファー水酸化酵素(P450cam)をモデル酵素として一連の検討 を開始した。P450cam モノオキシゲナーゼシステムはプチダレドキシンレダクターゼ (PdR)、プチ ダレドキシン(Pdx)および P450cam をコンポーネントとする多成分酵素系である。これらのタンパ ク質を種々の逆ミセルに包括し、スペクトル的解析を行ったところ、アニオン性界面活性剤(AOT) およびノニオン性界面活性剤(Tween85)を混合して調製されるハイブリッド逆ミセル中でタンパク 質が安定に存在しうることを見出した。ハイブリッド逆ミセルを用いて P450 反応を追跡したとこ ろ、NADH 依存的にカンファー水酸化反応が進行し、P450 モノオキシゲナーゼ反応を有機溶媒中 に構築することが可能であった

(Fig. 3)。また、P450 反応がタン パク質間電子移動を必要とする ことから、逆ミセル中において タンパク質間での電子伝達が進 行したことを示した。逆ミセル に包括されたプチダレドキシン レダクターゼおよびシトクロー ムb5間での電子移動反応を追跡 し、速度論的解析を行うことで、 タンパク質間電子移動がミセル 間で進行することを世界ではじ めて明らかとした(Fig. 4)。



Fig. 3 逆ミセル中における P450cam モノオキシゲナーゼ反応産物の GC-MS 分析 P450 反応は 2 μM P450cam, 10 μM Pdx, 1 μM PdR and 2 mM KCI を溶解した逆ミセ ル溶液に NADH (A, 2 mM or B, 0 mM) を添加して反応を開始し、37°C にて1時間反応 を行った。反応1時間後の逆ミセル溶液に 2 mM *n*-dodecane を内部標準として添加し、 GC-MS 分析に供した。 *Inset*:反応産物(5-exo-hydroxycamphor)のマススペクトル



Fig. 4 逆ミセル中における P450 反応と電子移動経路

本研究より、電子伝達反応を伴うシトクローム P450 モノオキシゲナーゼシステムを有機溶媒中 に再構築することに成功した。逆ミセル間でのタンパク質-タンパク質相互作用および電子伝達反応 は、P450 モノオキシゲナーゼのみならず多岐にわたる多成分酵素系利用を可能にすると期待される。

#### 2. 1. 3. 有機溶媒中における補酵素再生系の構築

酸化還元酵素は優れた反応特性を有し、多岐にわたる反応を触媒することから、工業的な利用が 期待される酵素である。しかしながら、多くの酸化還元酵素は高価な補酵素(NADHおよびNADPH) を必要とすることから、コスト高の克服など様々な課題も存在する。一方、様々なデヒドロゲナー ゼと安価な犠牲基質を用いた補酵素再生システムが考案されている。酵素的補酵素再生システムは、 穏和な反応条件において NAD(P)H の継続的な供給を可能とする。本研究では、非水媒体中での酸 化還元酵素の高度利用を目指し、有機溶媒中における補酵素再生系の構築を試みた。

GLD はグリセロールの酸化反応に共役して NAD<sup>+</sup>の還元反応を触媒する (式-1)。グリセロールは 種々の酵素に対して安定化作用を示すことから、GLD を基盤とした補酵素再生系に興味が持たれる。 一方、STH は NAD(P)<sup>+</sup>および NAD(P)H 間の水素転移反応を触媒し、犠牲基質を添加することなく 補酵素再生を可能とする(式-2)。本研究では、GLD および STH を利用した補酵素再生を目指し一連 の研究を遂行した。

> Glycerol + NAD<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{GLD}}$  Dihydroxyacetone + NADH  $(\overrightarrow{\mathbb{R}}-1)$ NADP<sup>+</sup> + NADH  $\xrightarrow{\text{STH}}$  NADPH + NAD<sup>+</sup>  $(\overrightarrow{\mathbb{R}}-2)$

種々の界面活性剤より調製される逆ミセルを用いて GLD 反応を検討したところ、AOT 逆ミセル 中において効率よく NADH を再生しうることが示された(Fig. 5)。また、AOT 系逆ミセルに包括し た STH を用いて NADPH 再生反応を追跡したところ、NADH の添加に依存して NADP<sup>+</sup>を NADPH にすることが可能であった (Fig. 6)。さらに、NADPH の再生反応は GLD 反応に共役して進行する ことも明らかとなり、GLD および STH が有機溶媒中で効率よく補酵素を再生しうることが示され た。有機溶媒中における GLD および STH の利用は、安価なグリセロールを用いた補酵素再生を可 能とし、種々の酸化還元酵素反応に共役した反応システムの構築が期待される(Fig. 7)。



**Fig. 5 逆ミセル溶液中における NADH の再生** 補酵素(A and C, 100 µ M NAD<sup>+</sup>; B, 100 µ M NADP<sup>+</sup>)、 グリセ ロール (A and B, 2.16 mJ; C, 0 mM),を含む AOT-逆ミセルに GLD (5 µg/mL) を添加して反応を開始し、340nm の吸光度変化 から還元型補酵素の再生を追跡した。Inset;反応開始後のペ クトル変化を1分間隔で追跡した。



Fig. 6 逆ミセル溶液中における NADPH の再生 NADH (100  $\mu$  M)、thio-NADP\* (100  $\mu$  M)を含む AOT 逆 ミセルに STH (A, 1  $\mu$  g/mL; B, 0  $\mu$  g/mL) を添加し て反応を開始した。Inset; thio-NADPH の生成と NADH の減少の経時変化.



Fig. 7 逆ミセル溶液中における補酵素再生システムの概念図

## 2.2 ナノ集合体による変性タンパク質の活性回復

バイオテクノロジー技術の発展により、外来の遺伝子を別種の発現媒体(宿主)へ組換えること により、目的タンパク質の発現を簡便に行うことが可能となったが、この異種タンパク質発現系に おいてしばしば問題とされるのが、不溶でかつ不活性なタンパク質凝集体、インクルージョンボデ ィ(封入体)の蓄積である。このため、インクルージョンボディを本来の活性を有するタンパク質 へと高効率で再生(リフォールディング)する技術が求められている。インクルージョンボディは、 共雑タンパク質に比べ目的タンパク質が極めて高濃度に含まれることから、再生操作後のタンパク 質の精製が容易に行えるという利点がある。従って、インクルージョンボディからのタンパク質の 機能回復は工学的に極めて重要となる。

#### 2.2.1 なぜ逆ミセルのナノ空間で変性タンパク質は再生するのか?

逆ミセル(Fig. 1)の微小水滴空間は内水相(water pool)と呼称され、様々な水溶性物質を可溶化することが可能である。逆ミセルはその大きさより、内水相にタンパク質を1分子しか可溶化することができない。実は逆ミセルのこの特徴が、タンパク質を再生する鍵となる。逆ミセル法は、逆ミセル内水相に変性タンパク質を個々隔離することによって、活性回復時におけるタンパク質同士の相互作用を最大限に軽減する手法である。つまり、逆ミセルの閉ざされたナノ空間に自己再生の場を提供することでタンパク質のリフォールディングを促進しようという手法である(Fig. 8)。



Fig. 8 逆ミセルによるタンパク質リフォールディングの模式図

本法は、変性タンパク質を逆ミセルに取り込む「可溶化」、変性タンパク質のリフォールディン グが行われる「再生」、そして逆ミセルから再生タンパク質を回収する「逆抽出」の3つのステッ プより成る。我々は、逆ミセルへの可溶化率を大幅に向上する手段として、固体変性タンパク質を 用いた逆ミセル溶液への固液抽出法を確立した(Fig. 9)。これは、あらかじめ調製した AOT 系逆ミ セル溶液に、固体状態の変性 RNase A を直接添加し、超音波照射により変性 RNase A を逆ミセル中 に溶解するという手法である。固液抽出法により可溶化した変性 RNase A は逆ミセル内で完全に再 生し、希釈法よりも高濃度でのリフォールディングを達成した。同様の手法により cytochrome c の リフォールディングも可能であった。



Fig. 9 逆ミセルによるタンパク質粉末の有機溶媒への直接可溶化 (左)逆ミセル溶液 (右)イソオクタン純溶媒 有機溶媒:イソオクタン、界面活性剤: A0T50mM、タンパク質チトクロームC

## 2.2.2.分子シャペロンは逆ミセルのナノ空間で機能するか?

生体内でフォールディングを補助するタンパク質である分子シャペロンは、生体外においてもその効果を持つことが知られている。中でもよく知られている分子シャペロンの一つである GroEL は、分子量 57000 のサブユニット7つからなるリング状の巨大タンパク質の複合体が二つ重なった 14 量体構造を取る。GroEL は工業的に用いるにはまだ非常に高価であるので、少量を有効に用いる手段を開発することが重要である。逆ミセルは微量の水中でリフォールディングが可能であることから、バルク水中で用いるよりも少量の GroEL でその効果を得ることが期待できる。そこで、AOT 系において、ATP、MgCl<sub>2</sub>、GroEL を溶解した緩衝液を、界面活性剤を含むイソオクタン溶液に添加する微量注入法により、GroEL 内包逆ミセル溶液を調製し、固体変性 RNase A を可溶化した。その結果、GroEL を添加することによって、大幅な RNase A 再生率の向上が確認され、逆ミセル内の特異空間で GroEL がフォールディングを効率的に補助していることが示された。また、GroEL のフ

ォールディング補助効果を誘引するための必須因子(ATP、MgCl<sub>2</sub>)のいずれが欠損しても、この 補助効果が見られないことから(Fig. 10)、GroEL はバルク水中と同様の機構でタンパク質のフォー ルディングを補助しているものと推察された。



 Fig. 10
 逆ミセルに溶解したGroELに対する駆動因子の添加効果

 (+:添加、-:非添加)

# 2.2.3.インクルージョンボディがナノ集合体中で活性を回復する

実際に生細胞内で生じた RNase A インクルージョ ンボディを出発物質として用いることは、逆ミセル 法をより実際的な高効率リフォールディング法とし て確立する上で重要である。そこで、大腸菌を宿主 細胞として牛膵臓由来 RNase A を大量発現すること により RNase A 封入体を調製し、これをリフォール ディング対象として実験を行った。

逆ミセル法と希釈法による RNase A 封入体のリフ オールディング挙動の違いを経時的に調べた結果、 逆ミセル法による操作では約 18 時間で完全に活性



Fig. 11 逆ミセル法び従来法(希釈法)によるRNaseA
 インクルージョンボディのリフォールディング
 (三角:逆ミセル法、丸:希釈法)

が回復することが明らかにされた。一方、希釈法では再生率は40%程度にとどまり(Fig. 11)、凝 集体の形成が目視により確認されたことから、大部分は水溶液中に不活性型として蓄積されたこと が示唆される。すなわち、逆ミセル系は、実際に大腸菌で発生させたインクルージョンボディに対 しても有効に機能することが示された。

## 2.3. 逆ミセルのナノ空間を利用した遺伝子変異の検出

逆ミセルのナノ空間に取り込まれた DNAは、水中とは大きく異なるハイブ リダイゼーション挙動をとることが明 らかとなった。アニオン性の界面活性剤 AOT を用いて形成した逆ミセル中に、 種々の遺伝子サンプル(20mer程度) を取り込ませ、ハイブリダイゼーション を行った。その結果、変異(ミスマッチ 部位)を有する遺伝子サンプルのハイブ リダイゼーションが、逆ミセル中で大き く抑制されることが示された。この性質 を利用すると遺伝子サンプルのハイブ リダイゼーション速度を測定すること によって、遺伝子の変異の有無を検出す ることができる(Fig. 12)。その結果の一 例を(Fig.13)に示す。変異が、最末端に 一カ所見られる場合でも、ハイブリダイ ゼーションの速度は大きく抑制され(6 8%)、中心付近に変異がある場合、そ のハイブリダイゼーション速度は、正常 遺伝子のそれに比べて10分の1以下 に低下した。これより、遺伝子の配列に 変異がある場合、逆ミセルのナノ空間で







Fig. 13 逆ミセル中でのハイブリダイゼーション速度 イソオクタン、AOT50mM、DNA濃度 1µM 、温度288K

起こる二重らせんの形成が著しく抑制されることが明らかとなった。

塩基の配列にも依るが、水相中で極めて低濃度(1µM以下)のDNAに対しては、二重らせん の形成が起こりにくい。しかしながら、逆ミセル中では、通常、水相の割合が1-2%であるため、 DNAは、50-100倍程度に内殻水相に濃縮される。また、逆ミセルのナノ空間に遺伝子を取 り込みそれぞれを隔離することによって、その二重らせん形成の速度を制御することが可能となる。 実際に、ハイブリダイゼーションの速度は、温度、界面活性剤濃度、塩の種類とその濃度に大きく 依存し、遺伝子変異の存在をナノ集合体中でのハイブリダイゼーション挙動を通して検出すること に成功した。

## 3. 今後の展望

逆ミセルは、非水媒体中に熱力学的に安定に形成される特異なナノ分子集合体である。酵素やタンパク質といった生体分子とほぼ同一の大きさを有していることから、生体分子の新たな機能発現の場として注目されてきた。最近では、さらに分子設計されたナノ集合体を用いることによって、 機能改変素子としての利用に関心が寄せられている。これまで、生体分子は水相中で機能するもの と考えられてきたが、逆ミセルのナノ空間を利用することによって、非水媒体中における生体分子 の新たな応用が期待される。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂いた一瀬博文博士(現JST研究員)、迫野昌文博 士(現理研研究員)、朴連春博士(現フロリダ州立大博士研究員)、道添純二氏(現博士課程3年)、 河嶋優美氏に感謝致します。

# 研究成果リスト (発表論文)

- Catalytic oxidation of o-phenylendiamine by cytochrome c encapsulated in reversed micelles J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 11, 955-959 (2001), T. Ono, K. Kawakami, M. Goto, S. Furusaki
- Preparation and Catalytic Performance of Surfactant-Manganese Peroxidase-MnII Ternary Comple in Organic Media, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 329-332 (2001)
   S. Okazaki, M. Goto, S. Furusaki, H. Wariishi, H. Tanaka

#### 3. Chataritic Performance of Lignine Peroxidase Alip-P3 in reversed Micelles

Biochemical Engineering J., Vol.8, No. 2, 129-134 (2001)

J. Michizoe, S. Okazaki, M. Goto, S. Furusaki

4. Catalytic Activity of Laccase Hosted in Reversed Micelles

J. Bioscience and Bioeng., Vol.92, No.1, 67-71 (2001), J. Michizoe, M. Goto, S. Furusaki

5. Complex Formation of Cytochrome c with a Calixarene Carboxylic Acid Derivative:

A Novel Solubilization Method for Biomolecules in Organic Media

Biomacromolecules, Vol. 3, No. 3, 438-444 (2002), T. Oshima, M. Goto, S. Furusaki

 Remarkably Enhanced Inhibitory Effects of Three-Component Hybrid Liposomes Including Sugar Surfactants on the Growth of Lung Carcinoma Cells *Chem. Pharm. Bull.*, 50(4), 563-565 (2002)

R. Ueoka, Y. Matsumoto, S. Hirose, K. Goto, M. Goto, S. Furusaki

- Enantioselective Polymer Prepared by Surface Imprinting Techniques *Anal. Chimica Acta*, Vol. 469, No.2, 173-181 (2002), K. Araki, M. Goto, S. Furusaki
- Polyethylene Glycol-Lipase Complex That is Catalytically Active for Alcoholysis Reactions in Ionic Liquids

Biotechnology Letters, 24, 1341-1345 (2002), T. Maruyama, S. Nagasawa, M. Goto

- A Molecularly Imprinted Polymer that shows Enzymatic Activity Biochem. Eng. J. 14, 85-91 (2003), T. Eiichi, K. Uezu, M. Goto, S. Furusaki
- Oxidation of Bisphenol A Catalysed by Laccase in Reversed Micelles in Organic Media *Enzy. Microb. Technol.*, 31, 227-232(2002)
   S. Okazaki, J. Michizoe, M. Goto, S. Furusaki, H. Wariishi, H. Tanaka
- Enzymatic Synthesis of Sugar Amino Acid Esters in Organic Solvents
   *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 94, No. 4, 357-361(2002), T. Maruyama, S. Nagasawa, M. Goto
- DNA Hybridization in Reverse Micelles and its Application to Mutation Detection *Analyst* 128(2), 161 - 165(2003), Lian-Chun Park, T. Maruyama, M. Goto
- Hypotlycemic effect of surfactant-coated insulin solubilized in a novel (S/O/W) emulsion Int. Pharm. Chem.Vol. 252, 271-274 (2003), E. Toorisaka, N. Kamiya, H. Ono, M. Goto
- Control of water content by reverse micellar solutions for peroxidase catalysis in a waterimmiscible organic solvent

```
J. Biosci. Bioeng., Vol. 95, No. 4, 425-427(2003), J. Michizoe, T. Maruyama, M. Goto 15. Use of ionic liquids in a lipase-facilitated supported liquid membrane.
```

Biotechnol. Lett. 25, 805-808, (2003), E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto

- 16. Discriminate surface molecular recognition sites on a microporous substrate: A new approach Macromolecules, 36 (12): 4472-4477 (2003), Han MN, Kane R, Goto M, Belfort G
- Protein Refolding in Nanostructured Reversed Micelles Including a Molecular Chaperone J. Biosci. Bioeng., Vol. 96, No. 3, 275-278(2003), M. Sakono, H. Ichinose, M. Goto
- Liquid membrane transport of amino acids by a calyx[6]arene carboxylic acid derivative J. Membrane Sci., Vol. 217, 87-97(2003), T. Oshima, K. Inoue, S. Furusaki, M. Goto
- Simple detection of point mutations in DNA oligonucleotides using SYBR GreenI Biotechnol. Lett. 25, 1637-1641 (2003), T. Maruyama, T. Takata, N. Kamiya, M. Goto
- 20. Can lipases hydrolyze peptide bond?
  - Enz. Microb. Technol., Vol. 32, 655-657(2003), T. Maruyama, M. Nakajima, M. Seki, M. Goto
- 21. Transport of Organic Acids through a Supported Liquid Membrane Driven by Lipase-Catalyzed Reactions

J. Biosci. Bioeng., 96(4), 370-374 (2003), E. Miyako, T. Mayuyama, N. Kamiya, M. Goto

- 22. Enzymatic degradation of p-chlorophenol in a two-phase flow microchannel system. *Lab. on a Chip*, 3, 315-319 (2003), T. Maruyama, J. Uchida, T. Ohkawa, M. Goto
- 23. Enantioselective transport of (S)-ibuprofen through a lipase-facilitated supported liquid membrane based on ionic liquids. *Chem. Commun.*, 2926-2927(2003)
  E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto
- Activation of manganese peroxidase in an organic medium using a mediator.
   *Biochem Eng J*, Vol. 19 (1), 43-46(2004), J. Michizoe, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto,
- 25. DNA hybridization in nanostructural molecular assemblies enables detection of gene mutations without a fluorescent probe.
  - Biomacromolecules, 5, 49-53 (2004). T. Maruyama, L.C. Park, T. Shinohara, M. Goto,
- Poly(ethylene glycol)-lipase complexes catalytically-active in fluorous solvents.
   Org. Biomol. Chem. 2, 524-527 (2004). T. Maruyama, T. Kotani, N. Kamiya, M. Goto,
- First application of calixarenes as extractants in room-temperature ionic liquids. *Chemistry Lett.* Vol.33, No. 3, 320-321(2004), K. Shimojo, M. Goto,
- 28. Dominant factors affecting extraction behavior of amino compounds by a calyx[6]arene carboxylic acid derivative , *Anal. Chim. Act.*, 509, 137-144(2004)
  T. Oshima, K. Inoue, K. Uezu, M. Goto

- Refolding of denatured carbonic anhydrase B by reversed micelles formulated with nonionic surfactant. *Biochem. Eng. J.*, 19, 217-220 (2004), M. Sakono, N. Kamiya, M. Goto
- Poly(ethylene glycol)-lipase complex highly active and enantioselective in ionic liquids.
   *Org. Biomol. Chem.*, 2(8), 1239-1244 (2004). T. Maruyama, T. Kotani, N. Kamiya, M. Goto
- 31. Electron-transfer reactions and function of Cytochrome P450cam monooxygenase system in reverse micelles. *Langmuir* 20, 5564-5568 (2004)
  H. Ichinose, J. Michizoe, T. Maruyama, N. Kamiya and M. Goto,
- 32. Factors affecting the oxidative activity of laccase towards biphenyl derivatives in homogeneous aqueous-nonaqueous systems. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 98, No. 1., 14-19 (2004)
  J. Tominaga, J. Michizoe, N. Kamiya, H. Ichnose, T. Maruyama, M. Goto
- Liquid membrane operations in a microfluidic device for selective separation of metal ions. *Anal. Chem.* 76, 4495-4500 (2004).

T. Maruyama, H. Matsushita, J. Uchida, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto

- Solvent extraction and stripping of silver Ions in room-temperature ionic liquids.
   *Anal. Chem.* 76, 5039-5044 (2004), K. Shimojo, M. Goto
- Calix[6]arene acetic acid extraction behavior and specificity with respect to nucleobases.
   Anal. Chim. Acta., 521, 163-171 (2004), K. Shimojo, T. Oshima, M.Goto
- 36. Highly enantioselective separation using a supported liquid membrane encapsulating surfactant-enzyme complex. J. Am. Chem. Soc. 126, 8622-8623 (2004)
  E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto

# 学会発表

国際学会32件、国内学会112件

# 受賞

2001年 日本膜学会 奨励賞「逆ミセルの生物工学的応用における新展開」
2004年 日本生物工学会 論文賞「Protein Refolding in Nanostructured Reversed Micelles Including a Molecular Chaperone」