

パパイン認識物質を導入したインプリントゲルのパパイン認識能の評価

日大生産工(院) ○小田部 伸大

日大生産工 高橋 大輔 和泉 剛

1. 緒言

近年、ライフスタイルの西洋化に伴い、生活水準は向上した。しかし、生活習慣病患者も増加傾向にあり、中でも、食生活の多様化に比例して食物アレルギー患者が急増している。そのため、食物アレルギーの原因タンパク質を認識・除去する方法が検討されている¹⁾。

現在、特定物質の認識方法として、鋳型重合法の一つである分子インプリント法が注目されている。この方法により調製されたポリマーは分子インプリントポリマー(MIP)と称される。MIP は最初に鋳型物質とゲル化剤を共重合した後、鋳型物質を除去することで得られる。得られたポリマーは鋳型物質と同じ型を内部に持つため、鋳型物質のみを選択的に認識・除去することができる²⁾。

以上の利点から、食物アレルギーの原因タンパク質を鋳型物質とした MIP を調製することにより、アレルギー疾患の制御・抑制につながることが期待される。

本研究では、パパイヤ中に存在し、口腔アレルギーの原因となるシステインプロテアーゼのパパイン(PA)を鋳型物質とした。また、PA 認識物質としてチオール基を有するシステイン(Cs)、ホモシステイン(h-Cs)、 α -チオグリセロールおよびフェニル基を有するベンジルアミンを MIP に導入した。調製した PA-MIP の PA 認識能を吸光度の変化から評価した。

2. 実験

2-1. 試薬

MIP の調製にはアクリルアミド(AAm)および PA 認識物質である Cs, h-Cs, α -チオグリセロールにビニル基を付加した化合物をモノマーとして用いた。また、架橋剤として *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(BIS)、重合開始剤として過硫酸アンモニウム(APS)、重合促進剤として *N,N,N',N'*-テトラエチルメチレンジアミン(TEMED)を用いた。また、PA の洗浄液として 2 % のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液を用いた。PA-MIP の PA 認識能評価のため、PA とプロテアーゼ様式の異なるリゾチーム(Lyz)を用いた。

2-2. PA-MIP の調製

モノマー化した認識物質、AAm を 12 cm^3 のリン酸緩衝液(pH 6.5, I=0.05)に総濃度が 1.52 M となるよう溶解させた。その後、BIS を $1.4 \times 10^{-2}\text{ M}$ 、PA を $2.4 \times 10^{-4}\text{ M}$ 、5 % APS を 0.45 cm^3 、TEMED を 0.16 cm^3 添加し共重合した。2 % SDS 溶液を用いて共重合したゲルから PA を溶出除去し、PA-MIP を調製した。

2-3. PA-MIP の PA 認識能の評価

調製した円柱状(5.6 cm^3)の PA-MIP を、 $2.4 \times 10^{-4}\text{ M}$ の PA 溶液 30 cm^3 に浸漬させた。時間毎に PA 溶液の吸光度(280 nm)を測定し、変化量から PA-MIP への PA 吸着量を評価した。

また、Lyz と PA の各濃度が $2.4 \times 10^{-4}\text{ M}$ の混合溶液 30 cm^3 に PA-MIP を浸漬させた。*N* α -ベンゾイル-DL-アルギニン-*p*-ニトロアニリド塩酸塩および *Micrococcus lysodeikticus* を PA および Lyz の基質として、各時間における混合溶液の活性測定

Evaluation of papain recognition ability for imprinted gel consists of monomer containing thiol and phenyl residue

Nobuhiro OTABE, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

Tab. 1 Association constant and adsorption rate of PA for PA-MIP containing PA recognition residue

	Association constant (M^{-1})	Adsorption rate (%)
Cs	7.03	50.46
h-Cs	1.03	12.96
α -Thioglycerol	5.81	45.73
Bza	1.09	13.68
Cs+Bza	1.22	15.07

を行い、Native に対する相対活性から PA-MIP の PA 認識能を評価した。

3. 結果および考察

Fig. 1 に PA-MIP への PA 吸着量の経時変化を示す。導入したチオール基の種類により吸着量に違いが見られた。PA にはジスルフィド結合の形成に関与しない遊離な Cys-25 が存在する³⁾。そのため、PA 中の Cys-25 とチオール基間でジスルフィド結合が形成されと考えられる。すなわち、ジスルフィド結合を形成させやすい構造を持つチオール基含有物質の導入により、PA-MIP への PA 吸着量が上昇したと考えられる。

一方、Bza 導入 MIP(PA-MIP(Bza))への PA 吸着量はチオール基導入 MIP と比較して低い傾向にあった。また、PA に対して分子量の小さい Lyz の PA-MIP(Bza)に対する吸着量は PA より大きな値を示した(データ未掲載)。Bza のようなフェニル基を持つ物質は His 保護基として用いられ、Bza は PA 中に存在する His-81, His-159 を引き寄せる。しかしながら、フェニル基と His の結合力は環同士の相互作用であり小さいため、チオール基より吸着量が小さくなったと考えられる。

Tab. 1 に種々の PA 認識物質を導入した MIP への PA の結合定数および吸着率を示す。PA-MIP(Bza)およびCs と Bza の両方を導入した MIP の結合定数は h-Cs 導入 MIP と同様に小さかった。これは、PA の立体構造において Cys-25 と His-159 は非常に近接した位置にあるため、Cs と Bza 間の立体障害が大きく、PA 吸着を阻害したと考えられる。以上から、PA 認識物質としてチオール基単体が有効であることが示唆された。

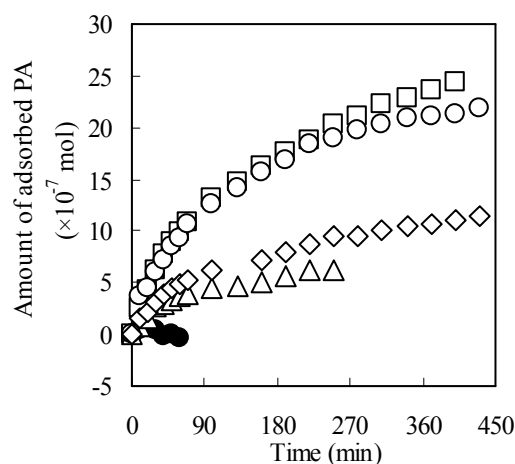


Fig.1 Changes in amount of adsorbed PA to PA-MIP with time
● Control, □Cs, △h-Cs, ○ α -Thioglycerol, ◇Bza

Lyz-PA 混合溶液にゲルを浸漬させた結果、Cs 導入 MIP において PA の活性は 72 %と大きく減少した。一方、Lyz の活性は 91 %とあまり減少しなかった。よって、ゲルが Lyz より PA を優先的に認識していると考えられる。講演会ではチオール基導入 MIP と PA-MIP(Bza)の PA 認識能について併せて報告する。

3. まとめ

PA 中のチオール基とジスルフィド結合を形成しやすい構造のチオール基含有物質を導入することで、高い PA 認識能を持つ MIP が得られた。

4. 参考文献

- 1) Stephan C. Bischoff, Friedericke A. Ulmer, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 22, 455-479 (2008)
- 2) Laura Guardia et al, *Biosensors and Bioelectronics*, vol 23, 1101-1108 (2008)
- 3) 生化学データブック I 第 5 刷, 日本生化学会, 株式会社 東京化学同人, 218-219