

Cholesterol 修飾による Trypsin の活性能への影響

日大生産工(院) ○滝田 喜一

日大生産工 高橋 大輔 和泉 剛

1. 緒言

現在, インフルエンザの世界的な流行が恐れられている。インフルエンザの原因であるインフルエンザウイルスは, 宿主細胞に感染する際ヘマグルチニンという糖タンパク質がレセプターとして大きな役割を果たしている。一般的にヘマグルチニンは不活性状態から宿主細胞内のトリプシン様プロテアーゼによって活性状態となり初めて宿主細胞に感染する。このためトリプシン様プロテアーゼの活性を制御することが出来れば, ヘマグルチニンの活性化の防止に利用できると考えられる。しかし, そのためには過酷な実験条件にも耐え得る構造の安定性を持たせる必要がある。

構造安定性が向上する新しい脂質修飾として分子内の疎水性相互作用が誘起される Cholesterol 修飾がある。

これより, 構造安定性が高く, 活性を有するトリプシン様プロテアーゼを合成できると考えられる。

本研究では Cholesterol を修飾した Trypsin を合成した。酵素活性測定により Trypsin の活性能への影響を評価した。

2. 実験方法および測定方法

2-1 試薬

Cholesterol修飾Trypsin (CHTrypsin)の調製には *N,N*-Carbonyldiimidazole (CDI), ウシ膵臓由来のTrypsin, Cholesterolを用いた。Cholesterolは水に不溶なため溶媒には Dimethylsulfoxide (DMSO)を用いた。試料中

のコレステロール結合数の算出には, 和光純薬工業(株)製のコレステロールE-テストワコーを使用した。 *N* α -ベンゾイル-DL-アルギニン-*p*-ニトロアニリド塩酸塩(BANA)を用いたTrypsinの酵素反応の停止剤として酢酸ジオキサン(酢酸:ジオキサン=3:7)を用いた。

Cholesterol修飾によるTrypsinの活性の変化を評価するために, 修飾されたCholesterolと相互作用する β -Cyclodextrin (β -CD)を添加剤として用いた¹⁾。

2-2 CHTrypsin の調製

Cholesterol 0.0965 g および CDI 0.0338 g を DMSO 80 cm³ に溶解し 50°C で 3 時間攪拌した。その後, Trypsin 0.5 g を添加し室温で 20 時間攪拌した。この反応液を Acetone に滴下し生成物を沈殿させた。得られた生成物を乾燥させ CHTrypsin を得た。

2-3 各種溶液の調製

DMSO 4 cm³, Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7.8) を用いて 0.01 g/dm³ の CHTrypsin 溶液を 50 cm³ 調製した。また, DMSO 4 cm³ と緩衝溶液を用いて 1 mmol/dm³ の BANA 溶液を 50 cm³ 調製した。

また, DMSO の Trypsin の活性能への影響を検討するため, Native Trypsin を DMSO 4 cm³ 中で 20 時間攪拌した溶液(Trypsin in DMSO)を調製した。

Influence to Activity of Trypsin containing Cholesterol Modification

Kiichi TAKITA, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

Table 1 Nativeに対する各溶液の活性値

	相対活性(%)
Native Trypsin	100
NativeTrypsin (in DMSO)	30.40
CHTrypsin	8.13
CD添加CHTrypsin	1.46

Cholesterol 修飾の Trypsin への活性の影響を β -CD 0.2 mmol/dm³ 溶液の添加によって評価した。CHTrypsin 溶液 1.2 cm³ に β -CD 溶液と緩衝液を 0.04 cm³ 混合し、 β -CD を添加した CHTrypsin 溶液を調製した。

2-4 CHTrypsin の活性能の評価

BANA 溶液と CHTrypsin 溶液をそれぞれ 1.2 cm³ ずつ混合し 5 分, 10 分, 15 分, 20 分反応後, 反応停止剤を 0.6 cm³ 加えた。紫外可視分光光度計でスペクトル測定を行い 410 nm における吸光度を評価した。吸光度の変化量を反応初速度とし, Native の反応初速度との比較から Cholesterol 修飾 Trypsin の酵素活性の評価を行った。

2-3 Trypsin に対する Cholesterol の結合数算出

コレステロールキットの発色試薬を同梱の緩衝溶液に溶解させ発色溶液を調製した。発色溶液 3 cm³ にそれぞれ 100 mg/dl の標準液を 0.02 cm³, 200 mg/dl の標準溶液 0.02 cm³, 0.04 cm³, 0.06 cm³ 添加した溶液を調製し, 吸光度を測定することにより検量線を作成した。発色溶液 3 cm³ に試料溶液をそれぞれ 0.02 cm³, 0.04 cm³, 0.06 cm³ 加え吸光度を測定し, 試料中の総コレステロール濃度を求めた。

3. 結果および考察

Table 1 に CHTrypsin, β -CD を添加した CHTrypsin および DMSO 中で 20 時間攪拌した Trypsin の相対活性を示す。これより, DMSO 中で攪拌した Trypsin の活性は Native と比較して低下したことがわかった。Lysozyme や RNaseA は DMSO 中でモルテングロビュール状態と考えられ, タンパク質内部の芳香族アミノ酸残基が部分的に表面に

露出すると予想される。よって Trypsin もモルテングロビュール状態であると考えられる。

CHTrypsin の活性は Native と比較して 8 % 程度に低下した。CHLysozyme および CHRNaseA の相対活性は各々 90 % および 80% 以上と高い活性を保持することが報告されている¹⁾。

CHLysozyme, CHRNaseA は Cholesterol を架橋点として凝集体を形成する。これに β -CD を添加することで CH 化合物中の Cholesterol と相互作用し会合体を崩壊させ, 活性を上昇させる可能性が示唆されている¹⁾³⁾。しかし, CHTrypsin 溶液に β -CD を添加しても活性を得られず, 凝集体は形成していないと考えられる。

4. まとめ

Cholesterol 修飾によって Native Trypsin の活性は著しく低下した。

5. 参考文献

- 1) 桂真治, “コレステロール修飾リゾチームの調製および構造, 機能についての検討” 修士論文(2007)
- 2) 曾我優, “Cholesterol の修飾によるタンパク質の酵素活性への影響” 卒業論文 (2007)
- 3) Y. Nomura et al. “Thermoresponsive controlled association of protein with a dynamic nanogel of hydrophobized polysaccharide and cyclodextrin: Heat shock protein-like activity of artificial molecular chaperone”, *Biomacromolecules*, 6, 477-452 (2005)