

## 卵白タンパク質鑄型導入アクリルアミドゲルの調製およびその吸着能

日大生産工 (院) ○佐藤 佑樹

日大生産工 高橋大輔 和泉 剛

### 1. 緒論

分子インプリントの技術は任意の選択性を持った分子認識サイトを作り出す手軽な分離方法の一つである。分子インプリントポリマーはすでに様々な低分子のインプリントにおいて研究結果が報告されており、最近では生体高分子や特定のタンパク質の分離、酵素や抗体の模倣などの生体材料として利用されているため医療や環境分野など多方面で注目されている<sup>1)~4)</sup>。しかし食品分野、特にアレルギー原因物質の分子認識に関する報告はほとんどない。このアレルギー原因物質を除去できればアレルギーを持っている人や、乳幼児でも栄養価の高い食品を摂取することができると期待される。本研究では、卵アレルギーの原因タンパク質である卵白リゾチーム (Lyz)、オボアルブミン (OVA)、オボトランスフェリン (OTF) などの卵白タンパク質を取り除くことのできる分子鑄型導入アクリルアミドゲル (MIG) の調製を目的とし、アクリルアミドゲルに対するタンパク質吸着能を各タンパク質溶液の吸光度変化から評価した。

### 2. 実験方法

#### 2-1 N-(4-vinyl)-benzyl iminodiacetic acid

導入 Lyz 認識アクリルアミドゲルの調製

N-(4-vinyl)-benzyl iminodiacetic acid

(VBIDA) 導入 Lyz 認識アクリルアミドゲル (以下 MIGL-VB と略記する) を合成するために、アクリルアミド  $1.85 \times 10^{-2}$  mol, アクリル酸  $7.32 \times 10^{-5}$  mol, VBIDA 合成モノマー  $7.69 \times 10^{-6}$  mol, 架橋剤として *N,N*-メチレンビスアクリルアミド  $1.69 \times 10^{-4}$  mol,  $\text{CuSO}_4$   $8.3 \times 10^{-6}$  mol, 標的タンパク質である Lyz  $2.80 \times 10^{-7}$  mol を Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.0, I=0.05)  $12 \text{ cm}^3$  に溶かした。その後、重合開始剤として 20 % (wt/wt) 過硫酸アンモニウム  $450 \mu\text{l}$ , 重合促進剤として *N',N'',N''',N''''*-テトラメチルエチレンジアミンを  $30 \mu\text{l}$  入れ重合反応させた。反応終了後、調製したゲルを一定の型 (面積  $9.62 \text{ cm}^2$ , 厚さ  $0.17 \text{ cm}$ , 体積  $1.64 \text{ cm}^3$ ) で成形した。その後、1M の NaCl 溶液  $20 \text{ cm}^3$  と 0.2 M の EDTA 溶液  $20 \text{ cm}^3$  でそれぞれ  $10 \text{ min} \times 3$  回洗浄することによってゲル内部の  $\text{Cu}^{2+}$  と認識モノマーの配位結合を切断し Lyz を除去して MIGL-VB を得た。Lyz を導入してないコントロールゲルを上記と同じ分量で作製した。

#### 2-2 $\text{Cu}^{2+}$ を用いた MIGL-VB における Lyz 吸着実験

規定 Lyz 濃度 ( $6.43 \mu\text{M}$ ,  $5.12 \mu\text{M}$ ,  $4.99 \mu\text{M}$ ) と  $1.5 \text{ mg}$  の  $\text{CuSO}_4$  を添加した評価液  $10 \text{ cm}^3$  に MIGL-VB を浸漬させた。10 分毎にその上澄み液を採取し、Lyz の吸収極大

---

Preparation of the egg white protein imprinted acrylamide gel and evaluation of dsorption ability

Yuki SATOU, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

波長である 280 nm における吸光度を紫外可視 (UV-Vis) 吸光光度計を使って測定した。その後、評価液の Lyz 濃度減少から MIGL-VB への Lyz 吸着量を算出した。MIGL-VB に対する Lyz の特異的吸着能を評価するために Lyz と分子量も近く塩基性アミノ酸数も等しいリボヌクレアーゼ A (RNase) を用いて吸着実験を行った。

上記と同様に同じ卵白タンパク質である OVA, OTF を認識するアクリルアミドゲル (MIGOV, MIGOT) を調整しそれぞれ吸着実験を行った。

### 3. 実験結果および考察

Fig.1 に  $\text{Cu}^{2+}$  を用いた Lyz 吸着実験における Lyz 吸光度の経時変化を示す。その結果、MIGL-VB に対する Lyz の吸着量は、 $\text{Cu}^{2+}$  を用いた吸着実験がより Lyz を吸着することが分かった。

RNase を用いた吸光度測定において MIGL-VB はコントロールゲルと同様に变化しなかった。したがって、MIGL-VB は RNase ではなく Lyz のみを選択的に認識し吸着していることが分かった。

吸着量から MIGL-VB に対する Lyz の吸着様式を検討したところ、Freundlich 型吸着等温線に対して相関性が高いことが分かった。このことから MIGL-VB に対して Lyz は主に多層吸着していると推察することができる。

OVA 吸着実験において OVA の吸光度は減少し、OVA が MIGOV に対して吸着したことが分かった。同様に、OTF 吸着実験においても OTF の吸光度は時間経過に伴い減少し OTF が吸着したことが分かった。学術講演会では Lyz 吸着実験および OVA, OTF の吸着実験の結果を併せて報告する。

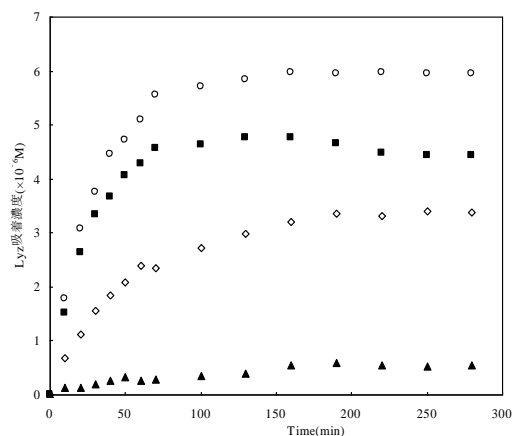


fig.1 Time Course Changes in the adsorbed amount of Lyz in adsorption experiment of lyz with  $\text{Cu}^{2+}$

Lyz ■  $4.99 \times 10^{-6}$  M +  $\text{CuSO}_4$  1.5mg (NaCl+EDTA洗浄) ◇  $5.12 \times 10^{-6}$  M (SDS洗浄)  
○  $6.43 \times 10^{-6}$  M +  $\text{CuSO}_4$  1.5mg (NaCl+EDTA洗浄) ▲  $4.90 \times 10^{-6}$  M (NaCl+EDTA洗浄)

### 4. まとめ

MIGL-VB の Lyz 吸着能について検討した結果、以下のことが明らかになった。

- $\text{Cu}^{2+}$  存在下で MIGL-VB に対して配位相互作用により Lyz の His 残基と  $\text{Cu}^{2+}$ -VBIDA モノマー複合体がキレート化しより多くの Lyz を吸着した
- MIGL-VB に対する Lyz の吸着様式は主に多層吸着であり、Lyz のみの特異的に反応する結合部位が存在する

### 5. 参考文献

- 1) Lei Qin, Wei-You Li, Macroporous Thermosensitive Imprinted Hydrogel for Recognition of Protein by Metal Coordinate Interaction *Anal.Chem.* 2009,81 7206-7216
- 2) S.H. Oua, M.C. Wu, T.C. Chou, C.C.Liu, *Analytica Chimica* 504(2004)163-166
- 3) Adil Denizli Iron removal from human plasma based on molecular recognition using imprinted beads *Materials Science and Engineering C* 25 (2005) 521-528
- 4) G.Wulff, A.Sarhan *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, 11,341 (1972)