

アクリルアミドゲルに固定化されたヒト血清アルブミンの L-トリプトファン認識能

日大生産工(院) ○中村 圭介

日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

1. まえがき

近年, 様々な病気に対する薬剤は多く開発されてきている。この薬剤を人間の身体に投与する方法は主に経口投与, 静脈投与が存在する。だが, 投与方法が違っても薬剤は血流に乗って患部に運ばれる。そこでは, 血清タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)が薬剤と結合し運搬される。中でも必須アミノ酸である L-トリプトファンは HSA のドメイン I B によって特異的に認識され運搬される¹⁾。このような機能から HSA を主原料とした薬剤も開発されている。しかし, 血清アルブミンも複数回結合する事によって結合能力が低下する。以上の事から, タンパク質の構造および変性に関する研究は多く報告されてきている。これまで, 我々の研究グループではポリエチレングリコールと血清タンパク質の水素結合性複合体を形成させ, ワルファリンを用いて結合能について検討を行っている。動的光散乱, 円偏光二色性測定を用いて複合体の形成やタンパク質の構造について検討を行った結果, タンパク質の機能を保持しながら複合体を形成することに成功した³⁾。しかし, 溶媒などの影響や様々な環境において構造が保持できない可能性も示唆される。このことより, 我々は HSA の特有な構造を維持させる方法として分子インプリント法を注目した。分子インプリント法はターゲット分子と非共有結合を有する機能性モノマーで複合体を形成させる。その後, 機能性モノマ

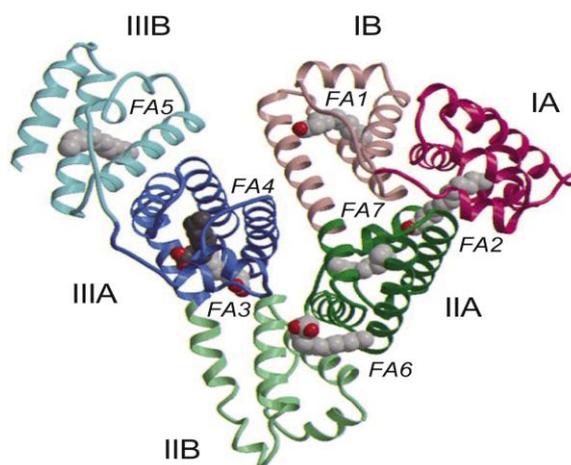


Fig. 1 Structure of human serum albumin (PDBj No. 1e7g)

を重合させ, ターゲット分子と特異的に結合する空間を持った高分子を形成される²⁾。この手法を用いて固定化された HSA のトリプトファン認識能を維持できると考えた。以上から, 本研究では分子インプリントゲルによって固定化された HSA の L-トリプトファン認識能を評価し, 過去に報告されている固定化された HSA の L-トリプトファン認識能⁴⁾と比較する事を目的とし, HSA 認識アクリルアミドゲルの調製を行った。

2. 実験

<HSA インプリントゲルの調整>

溶媒として Tris / HCl 緩衝溶液(pH 7.4, 0.05 M)を用いた。この溶媒にモノマーとして, 1.00 M のアクリルアミド(AAm), ターゲット分子と

**L-tryptophan recognition ability of human serum albumin in immobilized acrylamide gel
Keisuke NAKAMURA, Daisuke TAKAHASHI, and Tsuyoshi IZUMI**

Table 1. Amount of adsorbed HSA molecules into HSA imprinted gels with the functional monomers.

Sample No	Monomer	Functional Monomer	Functional Monomer / Protein	q ($\mu\text{g/g}$)
1		-	-	1.45
2		AAc	500	-1.45
3	AAm	Mac	500	1.04
4		APTMAC	500	1.45
5		AC	500	2.28

して、 1.50×10^{-7} M の HSA を添加し、複合体を形成させた。AAm の他に、機能性モノマーとして、アクリル酸(AAc), メタクリル酸(MAA), 塩化アクリロイル(AC), (3-アクリルアミドプロピル)トリメチルアンモニウムクロリド (APTMAC)をそれぞれ加えた。その後、架橋性モノマーとして、 2.50×10^{-2} M の N, N' -メチレンビスアクリルアミド、重合促進剤である N, N, N', N' -テトラメチルエンチルジアミンを 3.35×10^{-2} M をそれぞれ添加し十分に攪拌した。重合開始剤として 0.44 M 過硫酸アンモニウム水溶液を添加し、重合を開始した。25°C に設定し恒温槽内で 6 時間重合反応した後、HSA インプリントゲルを内径 6mm, 高さ 3mm の円柱に成型した。Tris / HCl 緩衝溶液 (pH 7.4, 0.05 M) および塩酸を用いて HSA および低分子化合物を除去し、吸光度測定により HSA の溶出の有無を測定した。洗浄終了後の HSA インプリントゲルをナス型フラスコに移し、氷およびアセトンによって凍結させ、HSA インプリントゲルの凍結乾燥を行った。

<HSA 吸着測定>

Dry HSA インプリントゲル 0.100 g を Tris / HCl 緩衝溶液 (pH 7.4, 0.05 M) 5.00 cm^3 を用いて膨潤させた。膨潤後、Tris / HCl 緩衝溶液 (pH 7.4, 0.05 M) 5.00 cm^3 に 1.50×10^{-6} M の HSA を添加し、外液の全量を 10.0 cm^3 に調製した。外液の吸光度の経時変化より HSA インプリントゲルへの HSA の吸着量を算出した。Table 1 に

記した q ($\mu\text{g/g}$) は Dry HSA インプリントゲル 1.00 g に対する HSA の吸着量を示す。

3. 結果および考察

<各種モノマーを導入したアクリルアミドゲルへの HSA 吸着の評価>

Table 1 に調製したそれぞれの HSA 分子インプリントゲルへの HSA 吸着量を示す。Sample No.1 は負の電荷を持った機能性モノマー (Sample Nos. 2, 3) よりも高い吸着量が見られた。しかし、正の電荷を持った機能性モノマー (Samples Nos. 4, 5) は No. 1 より高い吸着量を示した。これは、pH 7.4 の溶媒下では HSA は見かけ上負の電荷を帯びているため、ゲル内に存在する正の電荷を帯びている機能性モノマーとの静電的相互作用により吸着量が増加したと考えられる。

4. 参考文献

- 1) 渡邊明治, 「臨床アルブミン学」メディカルレビュー社, (1999), pp. 24-27
- 2) 軽部征夫, 「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典」松井淳編「分子インプリント高分子」株式会社テクノシステム, (2007), pp.63-69
- 3) 本多卓也 平成 17 年度修士論文
- 4) M.C. Millot, Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. Journal of Chromatography B, 797(2003)131-159