

分子鑄型を導入したアクリルアミドゲルの卵白タンパク質吸着能

日大生産工（院）○佐藤 佑樹

日大生産工 高橋大輔 和泉 剛

1. まえがき

高分子ポリマーはその高分子内に分子鑄型を作ることによって標的物質を分子認識し吸着する（図1）。そのため、この技術は医療や環境分野など多方面で注目されている<sup>1)</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ことと期待される。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）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を行った。

2. 実験方法

2-1 卵白 Lyz 鑄型導入アクリルアミドゲルの調製

卵白 Lyz 鑄型導入ゲル（以下 MIGL と略記する）を合成するために、アクリルアミド  $1.85 \times 10^{-2} \text{mol}$ 、アクリル酸  $7.32 \times 10^{-5} \text{mol}$ 、架橋剤として *N,N*-メチレンビスアクリルアミド  $1.69 \times 10^{-4} \text{mol}$ 、標的タンパク質であ

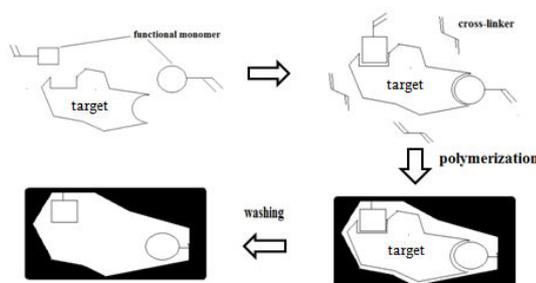


fig.1 Principle of molecular imprint method

る Lyz  $2.80 \times 10^{-7} \text{mol}$  を Tris/HCl 緩衝液（pH 7.5, I=0.05） $12 \text{cm}^3$  に溶かした。その後、重合開始剤として 20%（v/v）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  $25 \mu\text{l}$  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。2%（v/v）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液  $20 \text{cm}^3$  で一日、Tris/HCl 緩衝液（pH 7.5, I=0.05） $50 \text{cm}^3$ 、 $10 \text{min} \times 3$  回洗浄してゲル内部の Lyz を溶出除去することで、MIGL 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 MIGL の吸着実験

MIGL を規定 Lyz 濃度（ $5.20 \mu\text{M}$ 、 $4.52 \mu\text{M}$ 、 $3.60 \mu\text{M}$ ）の評価液  $10 \text{cm}^3$  に浸漬させた。10分毎にその上澄み液を採取し、Lyz の吸収

Egg white protein adsorption ability of acrylamid gel containing molecule templates

Yuki SATOU, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

極大波長である 280nm 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 濃度の減少量から MIGL への卵白リゾチーム吸着量を算出した。MIGL に対する Lyz の選択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。

上記と同様に卵白タンパク質である OVA, OTF の鋳型を導入したアクリルアミドゲルを作製し、それぞれ吸着実験を行った。

### 3. 実験結果および考察

図 2 に吸着実験における Lyz の吸光度の経時変化を示す。その結果、MIGL に対する Lyz の吸着量は、評価液の濃度上昇に伴い増加していくことが分かった。

RNase を用いた吸光度測定において MIGL はコントロールゲルと同様に変化しなかった。したがって、MIGL 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 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 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 吸着実験においては、OVA の等電点よりも低い pH の緩衝液で吸着実験を行った結果、OVA の吸光度は減少した。この結果から、OVA が MIG に対して吸着したことが分かった。

OTF 吸着実験において吸光度は時間経過に伴い上昇した。しかし、実験回数が少なく再現性の確認をとれていない。そこで学術講演会では OTF 吸着実験および上記実験

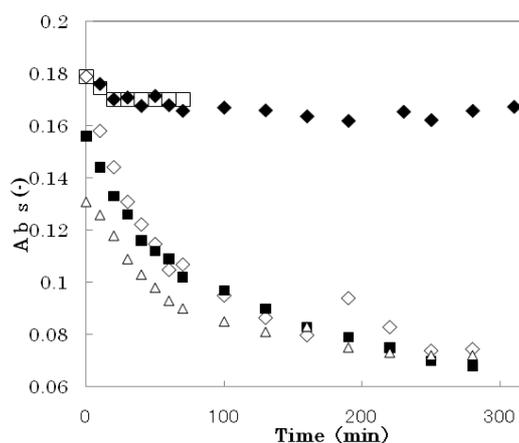


fig.2 Changes in ads of Lyz with time

卵白Lyz評価液濃度◇ $5.20 \times 10^{-6} \text{M}$  ■ $4.52 \times 10^{-6} \text{M}$  △ $3.60 \times 10^{-6} \text{M}$   
□コントロールゲル $5.20 \times 10^{-6} \text{M}$  ◆RNase( $5.85 \times 10^{-3} \text{M}$ )

結果を併せて報告する。

### 4. まとめ

MIG への卵白タンパク質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。

- MIGL に対して Lyz は特異的に吸着した、MIG に対して OVA が吸着した
- MIGL に対する Lyz の吸着様式は主に多層吸着であり、これは Lyz 間の相互作用が起こっていると考えられる

### 参考文献

- 1) S.H. Oua, M.C. Wu, T.C. Chou, C.C.Liu, *Analytica Chimica* 504(2004)163-166
- 2) 箕浦憲彦, 分子インプリンティング, *工業材料*, 47 巻, 1 月号, p.56 (1999)
- 3) G.Wulff, A.Sarhan *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, 11, 341 (1972)
- 4) 平山和子, 分子によるリゾチーム鋳型の合成及びその水晶振動式センサーへの応用, *BUNSEKIKAGAKU*, 49 No.1, pp.29-33