

Cholesterol 修飾 Trypsin の低温合成と酵素活性への影響

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

プロテアーゼは水溶液中において種々の反応を触媒することから、様々な分野において広く利用されている。

例えば近年猛威を振るうインフルエンザや HIV などのウイルス性疾患に対して既存の治療法である化学療法やワクチンの代替として、プロテアーゼを用いた汎用性の高いウイルスの不活性化法が研究されている。従来、遺伝子の変異しやすいウイルスに対しては、その都度対応するワクチンを作らなければならず、対処に限界があった。そのため、プロテアーゼを用いてウイルスの宿主細胞へ感染する際に関係するレセプターを破壊し、感染を防ぐ研究が行われている。

また、有機溶媒中でプロテアーゼの優れた触媒作用を利用できる酵素の開発も要望されており東京工業大学の岡畑らの研究を始め様々な脂質修飾による有機溶媒中で使用可能となる酵素の研究が行われている¹⁾。これらの研究は、脂質と酵素の複合体を形成させることにより、温度、pH や溶媒などの外的要因によって容易に凝集し失活するプロテアーゼの課題を克服することおよび有機溶媒に可溶にすることを目的としている。岡畑らは、脂質分散液と酵素液を低温で混合するという簡便な方法で脂質修飾を可能にした。他の特許文献等も上記の技術を基礎に、金属イオンの添加等による脂質修飾率の向上や活性の向上を目指している²⁾³⁾。

一方、当研究室で研究されている Cholesterol

修飾は標的物質に施すことにより、様々な機能を付加することができる事が出来る⁴⁾。例えば CpG オリゴデオキシヌクレオチドに Cholesterol を修飾することによって、未修飾のものと比較し血清中安定性の向上と細胞への取り込みの増大が確認されたと報告されている。また、プリオン病に対して治療予防効果を持つ化合物に Cholesterol を修飾することにより、治療効果が増大することも報告されている。

そこで、本研究では Cholesterol をプロテアーゼに施し、温度、pH や溶媒などの外的要因によって容易に凝集し失活するという課題の改善と活性の向上を目指し、汎用性の高い抗ウイルス薬へ応用することを期待できる高い活性を有する安定な修飾酵素を調製することを目的とした。

2. 実験方法および測定方法

2-1 試薬

Cholesterol修飾Trypsin(CH Trypsin)の調製にはCholesterol, 添加剤として塩化カルシウム, ウシ膵臓由来のTrypsinを用いた。Cholesterolは水に不溶なため溶媒はエタノールを用いた。Na-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩(BANA)を基質として用い、溶媒はDimethylsulfoxide(DMSO)を用いた。反応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。

2-2 CH Trypsin の調製

Tris-HCl 緩衝溶液(pH 7.8)に Trypsin を溶解させ酵素溶液とした。酵素溶液に塩化カルシウムを添加させたものと無添加の 2 種類を調

Low Temperature Synthesis of Cholesterol modified Trypsin and
Influence to its Active power

Kiichi TAKITA, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

Table 1 Native Trypsinに対する各溶液の相対活性値

	相対活性(%)
Native Trypsin(0.1 g / dm ³)	100
脂質:酵素 = 0.3 : 1のCH Trypsin (0.1 g / dm ³)	9.66
脂質:酵素 = 0.4 : 1のCH Trypsin (0.1 g / dm ³)	11.3
脂質:酵素 = 0.5 : 1のCH Trypsin (0.1 g / dm ³)	7.44
脂質:酵素 = 1 : 1 のCH Trypsin (0.1 g / dm ³)	0.666

Table 2 各溶液の K_m と V_{max} の比較

	Native	CH Trypsin (脂質:酵素 = 0.4 : 1)	CH Trypsin (脂質:酵素 = 0.5 : 1)
K_m	0.706	6.098	0.649
V_{max}	1.42	0.0263	0.00161

製した。Cholesterol をエタノールに溶解させ Tris-HCl 緩衝溶液(pH 7.8)を加え脂質溶液を調製した。酵素溶液に塩化カルシウムを溶解させ、4℃に冷却しながら脂質溶液を滴下した。その後4時間4℃で攪拌し、冷蔵庫で24時間静置した。析出物を遠心分離させ、残った析出物を純水で3回洗浄した。析出物を凍結乾燥させ CH Trypsin の固体を得た。

2-3 各種溶液の調製

CH Trypsin の粉末を DMSO 4 cm³ に溶解させた。Tris-HCl 緩衝溶液(pH 7.8)を用いての定量し CH Trypsin(0.1 g / dm³)溶液を調製した。また、BANA を DMSO 4 cm³ に溶解させ緩衝溶液で定量し 1 mmol / dm³ の溶液を調製した。

2-4 CH Trypsin の活性の評価

基質溶液 1.2 cm³ と酵素溶液 1.2 cm³ を混合し反応液とした。混合後それぞれ 5 分, 10 分, 15 分, 20 分反応させた。その後反応停止剤を 0.6 cm³ 加え反応を停止した。紫外可視分光光度計でスペクトル測定(200 ~ 500 nm)を行った。その反応初速度を活性とし、Native Trypsin との相対値から CH Trypsin の酵素活性の評価を行った。また Native Trypsin と CH Trypsin の K_m および V_{max} を算出し比較した。

3. 結果および考察

酵素溶液に塩化カルシウムを添加した系は CH Trypsin が析出した。しかし、無添加の系では析出せず CH Trypsin を得られなかった。このことから無機塩を添加することにより酵素

—基質間の静電相互作用が上昇し、脂質と酵素が結合しやすくなったと考えられる。また得られた CH Trypsin は水に不溶でヘキサン、アセトンなどの有機溶媒に可溶であった。

修飾に用いた脂質の量の増加に伴って得られる CH Trypsin の量が増加した。しかし CH Trypsin の活性は、脂質の量の増加に伴い低下した。各 CH Trypsin 溶液の相対活性を Table 1 に示す。脂質 : 酵素の比率を 0.4 : 1 とした CH Trypsin が最も高い活性を示した。また 37℃における CH Trypsin と Native Trypsin の K_m および V_{max} を算出し、比較したものを Table 2 に示す。Native Trypsin と比較して脂質:酵素が 0.4 : 1 の場合、 K_m が大きくなり酵素-基質の親和性も低下した。一方、0.5 : 1 の場合は基質親和性が高くなった。 V_{max} はどちらも低下した。

4. まとめ

無機塩を添加し低温で修飾を行い、活性を有する CH Trypsin の調製に成功した。

5. 参考文献

- 1) 特許公開公報 昭 64 - 80282
- 2) 特許公開公報 特開 2005 - 46001
- 3) 特許公開公報 特許 2913010
- 4) 桂真治, 修士論文『コレステロール修飾タンパク質の調製およびその構造, 特性についての検討』2006