

Lysozyme 鋳型を有するアクリルアミドゲルのLysozyme認識に及ぼす機能性モノマーの影響

日大生産工(院) ○吉田 貴秋
日大生産工 高橋 大輔 和泉 剛

1 まえがき

分子認識は生体系の活動の中心である。生体系に存在する分子認識現象を模倣することができる技術の一つとして分子インプリント法がある。分子インプリント法は生体外でレセプターの合成が可能な鋳型重合であり、広く研究が行われている。研究の領域に応じて目的分子は多様であり、アミノ酸、糖誘導体、ステロイド、ヌクレオチド、殺虫剤と農薬、金属イオンなどの低分子物質が主体である²⁾。しかし近年ではタンパク質やDNAなどの生体高分子を目的分子とする研究報告が増加の傾向にある。本研究では、目的分子としてタンパク質の中でも高い安定性と薬理作用を有する卵白由来の Lysozyme(Lyz)に着目した³⁾。本報告では、Lyz鋳型を有するアクリルアミドゲル(Lyz-MIP)の調製とそのLyz認識に及ぼす機能性モノマーの影響について報告する。

2 実験方法および測定方法

2-1 試料

アクリルアミドゲルの調製試料にはモノマーとしてアクリルアミド(AAm)、架橋剤として *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(BIS)、重合促進剤として *N,N,N',N'*-テトラエチルメチレンジアミン(TEMED)、重合開始剤として過硫酸アンモニウム(APS)を使用した。

2-2 種々のBIS濃度のLyz-MIPの調製

pH 5.00のクエン酸緩衝液を用いて5M AAm溶液、0.125M BIS溶液、 2.00×10^{-4} M Lyz溶液、20%APS溶液をそれぞれ調製した。各溶液を所定量混合した後、全体量を10.0 cm³に定容した。その後、混合溶液を内径 8.50cmのシャーレに移しシリコンカバーを用いて密封した。25.0°Cに設定した恒温槽内で6時間静置し重合した。Lyz-MIPの調製条件をTable 1に示す。重合反応終了後、内径6.0mmのガラス管を用いて成形したゲル中のLyzと未反応モノマー、クエン酸塩を除去するため蒸留水を用いて洗浄を行った。洗浄の確認は吸光度(波長280 nm)および伝導度測定より行った。洗浄完了後、凍結乾燥によりドライLyz-MIPを得た。

Table 1 Concentration of AAm and BIS for preparation of Lyz-MIP

No.	Concentration				
	AAm (M)	BIS ($\times 10^2$ M)	Lyz (μ M)	TEMED ($\times 10^2$ M)	APS (mM)
1		0.75			
2		1.00			
3		1.13			
4		1.25			
5		1.38			
6		1.50			
7		1.63			
8	1.00	1.75	2.00	5.34	4.82
9		2.00			
10		2.50			
11		2.75			
12		3.00			
13		3.25			
14		3.50			
15		3.75			

2-3 種々のBIS濃度で調製したLyz-MIPへのLyzの吸着評価実験

Table 1の条件で調製したLyz-MIPのドライゲルを0.1000 g採取しクエン酸緩衝液5 cm³で膨潤を行った。完全に膨潤したLyz-MIPに 7.00×10^{-6} M Lyz溶液を5 cm³添加した。このときの時間を吸着開始0 hとした。実験サンプルは24 h、25.0 °Cに設定した恒温槽内に静置した。吸着開始0 hと24 hの評価溶液の吸光度を測定することでLyz-MIP 1.00 gへのLyzの吸着量 q_e (mg/g)を算出した。その結果より最もLyzを吸着したLyz-MIPのBIS濃度を最適濃度と決定した。

2-4 種々の濃度の機能性モノマーを導入したLyz-MIPの調製

機能性モノマー(FM)として、アクリル酸(AAc)、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)、メタクリル酸メチル(MMA)を使用し、種々の機能性モノマー濃度においてLyz-MIP(FM)の調製を行った。Lyz-MIP(FM)調製におけるモノマー濃度をTable 2にそれぞれ示す。

2-5 Lyz-MIP(FM)のLyz吸着に及ぼす種々の機能性モノマーの影響

Table 2の条件で調製したLyz-MIP(FM)へのLyzの吸着実験を2-3節で記した操作と同様に行いLyz吸着能を評価した。

Effect of Functional Monomer on Lysozyme of Recognition Acrylamide Gel with Lysozyme Template
Takaaki YOSHIDA, Daisuke TAKAHASHI, Tsuyoshi IZUMI

3 結果および考察

3-1 Lyz-MIP の最適 BIS 濃度の決定

異なる BIS 濃度の Lyz-MIP の q_e を Fig.1 に示す。Fig.1 から BIS 濃度 $1.50 \times 10^{-2} \text{M}$ の Lyz-MIP の q_e が 0.295 mg/g と最も高い値を示した。このことから Lyz-MIP への Lyz 吸着における最適 BIS 濃度を $1.50 \times 10^{-2} \text{M}$ と決定した。

3-2 種々の機能性モノマー濃度で調製した Lyz-MIP(FM)への Lyz 吸着評価

Fig.1 より決定した最適 BIS 濃度 $1.50 \times 10^{-2} \text{M}$ において Lyz-MIP(FM)の調製を検討した。Table 2 の FM 濃度で調製した Lyz-MIP(FM) の q_e を Fig.2 に示す。Fig.2 から FM 濃度の増加に伴い Lyz-MIP(AAc)および Lyz-MIP(MMA)の q_e は増加する傾向を示した。なかでも、FM 濃度 $2.00 \times 10^{-1} \text{mM}$ で調製した Lyz-MIP(AAc)および Lyz-MIP(MMA)の q_e を Lyz-MIP と比較するとそれぞれ 242%および 297%と増加した。一方、Lyz-MIP(APTMAC)は FM 濃度の増加に対して q_e の変化は見られなかった。また、Lyz-MIP(APTMAC)への平均 q_e は Lyz-MIP と比較して 44.4%に低下した。このことから、Lyz-MIP(AAc)は Lyz を静電的に引きつけることで q_e が増加し、Lyz-MIP(APTMAC)は Lyz と静電的に反発し合うことで q_e が低下したと考えられる。これは、pH5.00 の緩衝液中での Lyz の表面電荷に対して AAc および APTMAC の静電的官能基が Lyz の吸着に影響を与えていることを示唆した。また、Lyz-MIP(MMA)は Lyz 中の疎水性側鎖を有するアミノ酸残基と MMA 中の疎水基との疎水性相互作用によって Lyz を吸着したことを示唆した。本講演では、MMA の比較として MMA と構造が類似している親水性モノマーであるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチル(HEMA)とベンゼン環を有する疎水性モノマーであるスチレン(SM)を使用して Lyz の吸着の挙動についても併せて報告する。

4 まとめ

Lyz-MIPのLyzの吸着における最適BIS濃度および、Lyz-MIP(FM)のLyz吸着能に及ぼすFMの影響について検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. Lyz-MIPへのLyzの吸着における最適BIS濃度を $1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ と決定した。
2. Lyz-MIP(FM)へのLyzの吸着においてAAcおよびMMAの導入が有効であった。
3. Lyz-MIP(AAc)およびLyz-MIP(MMA)のFM濃度の増加に伴い q_e の増加傾向を観察された。
4. Lyz-MIP(AAc)およびLyz-MIP(ATPMAC)のLyz吸着能評価より静電的側鎖を有するAAcおよびAPTMACの導入効果を観察することができた。

Table 2 Concentration of functional monomers for preparation of Lyz-MIP(FM)

No.	Concentration			
	functional monomer ($\times 10^{-1} \text{mM}$)	AAm + functional monomer (M)	BIS ($\times 10^{-2} \text{M}$)	Lyz (μM)
16	2.00			
17	1.50			
18	1.00	1.00	1.50	2.00
19	0.50			
20	0.02			

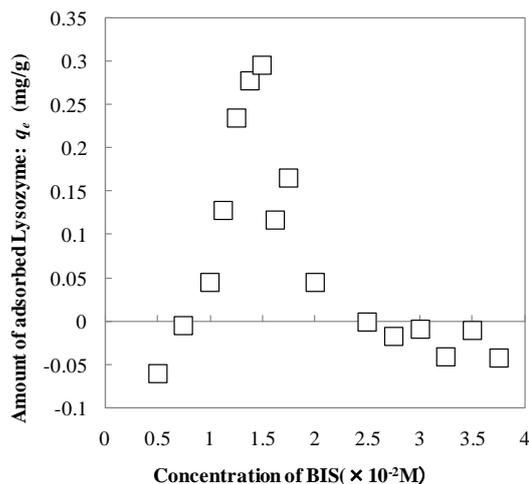


Fig.1 Change in amount of adsorbed Lysozyme with concentration of BIS

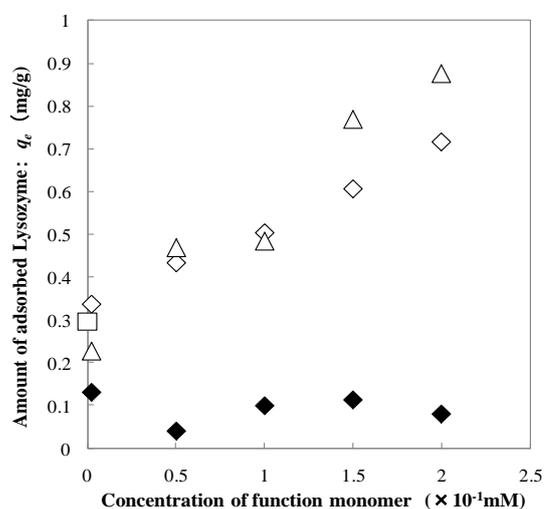


Fig.2 Changes in amount of adsorbed Lysozyme with concentration of function monomer (◇:AAc, ◆:APTMAC, △:MMA, □:AAm)

参考文献

- 1) Jean Daniel Marty (2005) *Adv Polym Sci* 172 2
- 2) Fischer E Ber Dtsch(1894) *Chem Ges* 27 2985
- 3) 林 勝哉, 化学の領域選書 リゾチーム, 31