

分子インプリント法により調製したアクリルアミドゲルの Lysozymeの認識能の評価

日大生産工(院) ○吉田 貴秋 日大生産工 高橋 大輔
日大生産工 和泉 剛

1 緒言

近年、タンパク質やDNAなどの生体高分子を標的分子とした分子インプリントポリマーに関する研究報告が数多く行われている。本研究では、標的分子として高い安定性と薬理作用を有する鶏卵白由来の Lysozyme (Lyz)に着目した。種々の機能性モノマー(FM)を用いて調製したLyz認識アクリルアミドゲル (Lyz-MIP)へのLyzの吸着量および吸着したLyzの活性を測定し、Lyz吸着能および活性に及ぼすFMの影響について評価した。

2 実験

2-1 試料

アクリルアミドゲルの調製には、モノマー、架橋剤、重合促進剤および重合開始剤としてアクリルアミド (AAM), *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (BIS), *N,N,N',N'*-テトラエチルメチレンジアミン (TEMED)および過硫酸アンモニウム (APS)をそれぞれ使用した。

Lyzの認識部位となるFMには、アクリル酸 (AAc), メチルメタクリレート (MMA), (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), 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)およびスチレン (SM)を使用した。

タンパク質試料には、鶏卵白由来のLyz [Mw: 14,305 g/mol, pI: 10.5], オボアルブミン (OVA) [Mw: 45,000 g/mol, pI: 4.50]およびオボトランスフェリン (OTF) [Mw: 77,000 g/mol, pI: 6.10]を使用した。また、Lyzと分子量および塩基性アミノ酸残基数が19個と等しいウシ膀胱リボヌクレアーゼA (RNAesA) [Mw: 13,680 g/mol, pI: 9.60]を使用した。

Lyzの活性測定には、基質としてヘキサ-*N*-アセチルグルコサミン [(GluNAc)₆]を使用した。

2-2 種々のBIS濃度のLyz-MIPの調製

pH 5.00のクエン酸緩衝液にLyz, AAM, BIS, TEMEDおよびAPSを所定量溶解させた後、全量を10.0 cm³に定容した。その後、混合溶液を内径 8.50 cmのシャーレに入れ、25℃で6時間

重合した。直径6.0 mm、高さ2.0 mmの円柱状に成形したゲル中の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。洗浄完了後、凍結乾燥によりDryのLyz-MIPを得た。また、同様の操作によりLyzを導入しないノンインプリントゲル (NIP)を調製した。

2-3 種々のBIS濃度で調製したLyz-MIPへのLyzの吸着実験

DryのLyz-MIP 0.100 gを3.50 μM Lyz溶液10 mLに浸漬させ25.0℃で静置した。吸着開始0 hと吸着平衡時の評価溶液の吸光度よりDryのLyz-MIP 1.00 g当たりのLyzの吸着量 q_e 値 (mg/g)を算出した。

2-4 種々のFMを導入したLyz-MIPの調製およびLyzの吸着実験

AAMとFMの総濃度が1.0 Mになるように種々のFM濃度においてLyz-MIP(FM)の調製を行った。調製および吸着実験は2-2節および2-3節と同様の操作で行った。

2-5 Lyz-MIPへの種々のタンパク質の吸着実験

2-4節で決定したLyzの吸着における最適FM濃度において調製したLyz-MIPへの種々のタンパク質の吸着実験を行った。操作は2-3節と同様に行った。

2-6 (GluNAc)₆を用いたLyz-MIPに吸着したLyzの活性測定

ImotoおよびYagishita の還元末端基定量法¹⁾を用いてLyz-MIPに吸着したLyzの活性を測定した。Lyz-MIPがLyzの吸着平衡に達した後、直ちに蒸留水を用いてLyz-MIP表面のLyzを洗浄した。Lyz-MIPに(GluNAc)₆溶液1 mLを添加し25℃で40分間反応させた。次に、反応溶液にヘキサシアノ鉄(III)カリウム10 mgを添加し15分間煮沸した。その後、反応溶液を冷水で3分間冷却し室温で2分間静置した。反応溶液の上澄みの吸光度を波長410 nmで測定した。native Lyzの吸光度と比較してLyz-MIPに吸着したLyzの相対活性を評価した。

Evaluation of the Lysozyme Recognition ability of Acrylamide Gel
Using Molecular Imprinted Method

Takaaki YOSHIDA, Daisuke TAKAHASHI, and Tsuyoshi IZUMI

3 結果および考察

3-1 Lyz の吸着における Lyz-MIP の最適 BIS 濃度の決定

種々の BIS 濃度において調製した Lyz-MIP への Lyz の吸着実験を行った結果, BIS 濃度 15 mM において調製した Lyz-MIP の q_e 値が 0.295 mg/g と極大値を示した。このことから, Lyz の吸着において BIS 濃度 15 mM の Lyz-MIP は最適なサイズの空間を有していると考えられる。

3-2 Lyz の吸着における Lyz-MIP の最適 FM 濃度の決定

種々の FM 濃度で調製した Lyz-MIP の q_e 値を Fig.1 に示す。FM 濃度の増加に伴い Lyz-MIP(AAc)および Lyz-MIP(MMA)の q_e 値は増加する傾向を示したが, Lyz-MIP(APTMAC)の q_e 値は減少した。また, Lyz-MIP(SM)および Lyz-MIP(HEMA)の q_e 値はある FM 濃度において極大値を示した。pH 5.00 において Lyz の実効電荷は+8.50 である。よって, アニオン性モノマーを導入した Lyz-MIP(AAc)は Lyz を静電的引力によって吸着することで q_e 値が増加し, カチオン性モノマーを導入した Lyz-MIP(APTMAC)は Lyz と静電的に反発し合うことで吸着が起こらず q_e 値が低下したと考えられる。また, Lyz-MIP(MMA)および Lyz-MIP(SM)は Lyz 中の疎水性側鎖を有するアミノ酸残基と FM 中の疎水性基との疎水性相互作用によって Lyz を吸着したと考えられる。ヒドロキシ基を有する Lyz-MIP(HEMA)は Lyz の親水性基との親和力によって Lyz を吸着したと考えられる。また, Lyz-MIP(SM)および Lyz-MIP(HEMA)はある FM 濃度より高いと鑄型内での FM 同士の相互作用により Lyz の吸着を阻害したと考えられる。

3-3 Lyz-MIP への種々のタンパク質の吸着評価

最適 FM 濃度において調製した Lyz-MIP への種々のタンパク質の吸着実験の結果を Table 1 に示す。種々の FM を導入した Lyz-MIP の OVA, OTF および RNaseA の q_e 値は Lyz の q_e 値と比較して小さい値を示した。タンパク質の分子量および実効電荷の分布の違いから Lyz 鑄型を有する Lyz-MIP へ吸着できなかったと考えられる。

3-4 種々の Lyz-MIP のインプリント効率および吸着した Lyz の活性評価

種々の Lyz-MIP のインプリント効率(α)および吸着した Lyz の相対活性を Table 2 に示す。ここで, α 値は NIP および MIP の q_e 値の比であり, 鑄型導入の有効性を評価するパラメーターである。Lyz-MIP(HEMA)は高い α 値と Lyz の高い相対活性を示したことから, FM として HEMA の Lyz-MIP への導入が有効であることが明らかとなった。

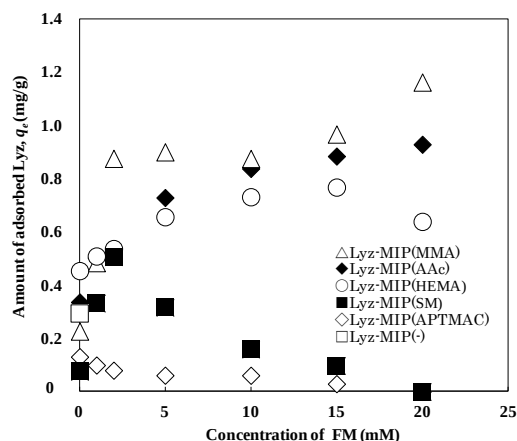


Fig.1 Changes in amount of adsorbed Lyz with concentration of FM

Table 1 Result of amount of adsorbed Lyz, OVA, OTF, and RNaseA on MIP and NIP.

Sample	Concentration of FM (mM)	Amount of adsorbed proteins q_e (mg/g)			
		Lyz	OVA	OTF	RNaseA
Lyz-MIP(-)	0	0.295	0.0666	0.0322	0
Lyz-MIP(MMA)	2.00	1.163	0.0144	0.0098	0.0338
Lyz-MIP(AAc)	2.00	0.929	0.0803	0.0111	0.0114
Lyz-MIP(APTMAC)	2.00×10^{-3}	0.131	0.0977	0.0230	0.0111
Lyz-MIP(HEMA)	1.50	0.768	0.0641	0.0116	0.0421
Lyz-MIP(SM)	2.00×10^{-1}	0.497	0.0434	0.0093	0.0897

Table 2 Result of amount of adsorbed Lyz (q_e), imprinting efficiency (α), and relative activity of Lyz-MIPs with various FMs

Sample	q_e MIP (mg/g)	α ^{※1} (-)	Relative activity (%)
Lyz-MIP(-)	0.295	2.09	38.0 (± 12.5)
Lyz-MIP(MMA)	1.163	16.28	57.9 (± 0.99)
Lyz-MIP(AAc)	0.929	18.67	67.4 (± 2.47)
Lyz-MIP(APTMAC)	0.131	6.21	27.3 (± 4.25)
Lyz-MIP(HEMA)	0.768	23.81	87.6 (± 2.18)
Lyz-MIP(SM)	0.497	3.29	61.1 (± 7.42)

※1 $\alpha = q_e(\text{MIP})/q_e(\text{NIP})$

4 まとめ

種々のFMを導入したLyz-MIPへのLyzの吸着実験およびLyz-MIPに吸着したLyzの活性測定よりLyz-MIPの吸着能および活性に及ぼすFMの影響について検討した結果, 以下のことを明らかにした。

- 1) Lyz-MIPはLyzの吸着に対して選択性を有することからアクリルアミドゲルへのLyzの鑄型導入は有効である。
- 2) FMを導入したLyz-MIPの q_e 値および α 値から, Lyzの吸着における有効なFMとその最適FM濃度を決定した。
- 3) HEMAを導入したLyz-MIPは高い活性を保持した状態でLyzを吸着できる。

「参考文献」

- 1) T.Imoto and K.Yagishita, "Agr. Biol. Chem.", **35**, 7, p.1154-1156