

温度感受性ポリマーを利用した反復利用が可能な酵素試薬の開発

森 秀治 遠藤 浩

要 約

温度感受性ポリマー誘導体を作製し、アルカリホスファターゼ (ALP) と結合させることによって、反復利用が可能な ALP の開発を試みた。温度感受性ポリマー結合 ALP は、反応混合液の温度を 37℃ 以上に温度を上げることによって、簡単に他の成分から分離回収することができ、回収後も約 80% の活性を保持していることが明かとなった。

キーワード：温度感受性ポリマー、反復利用、アルカリホスファターゼ

はじめに

今日、種々の酵素が試薬として臨床検査の多くの分野で応用され、検査を進める上での必須物質となっている。利用されている酵素の中には、高価なものや量的制限があるものもあるため、一度使用した酵素を繰り返し使えるような、極端に言えばリサイクル使用が可能な酵素を開発することは、コストや供給の面からもまた廃棄物汚染の面からも意義あることと考えられる。

一方、温度変化に伴って水に対する溶解性に著しい変化が生じる高分子 (温度感受性ポリマー) の存在が知られている¹⁾。本ポリマーは、32℃ 以下では水に溶解し、それ以上の温度で急激に析出沈澱するといったユニークな性質 (温度感受性) を持ち¹⁾⁻³⁾、単に温度変化を与えるだけで、容易に水溶液中から分離回収することが可能であることから様々な領域への応用が考えられつつある⁴⁾⁻⁶⁾。我々は、本ポリマーの生物学的領域への応用の一

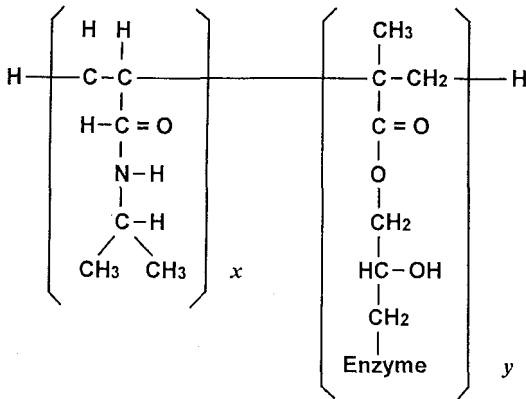


Fig. 1 Structure of thermosensitive polymer-conjugated enzyme

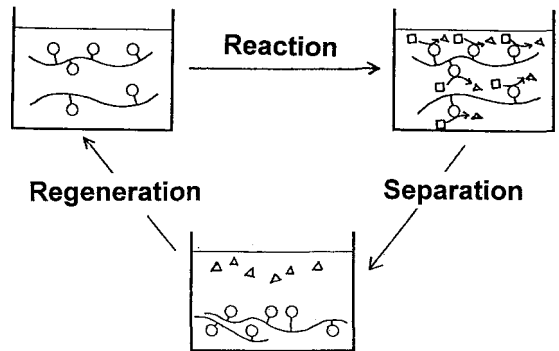


Fig. 2 Repeated use of thermosensitive polymer-conjugated enzyme.
 ○: enzyme, □: substrate, △: product

環として、アミノ基含有化合物との結合能を併せ持った温度感受性ポリマーの誘導体を作製し、これが生体内微量物質を精製するための担体として、十分に活用することができることを既に報告している⁷⁾。

今回、アルカリホスファターゼ (ALP) をモデル酵素として、本ポリマーを結合させた酵素標品を調製し(図1)、いったん反応を行った後に反応混合液中から温度変化によって簡単に回収され、反復して活性を発揮することが可能な酵素の作製を試みた(図2)。

材料と方法

1. 試薬

N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm) は、東京化成より購入した。メタクリル酸グリシジル (GMA) とアゾビスイソブチロニトリル (AIBN) は、和光純薬工業の製品を用いた。ALP は、シグマより得た。その他の試薬は、すべて市販の特級を用いた。

2. 温度感受性ポリマー誘導体の作製⁷⁾

NIPAAm 4.8g 並びに GMA 0.2g を含むベンゼン溶液 (50ml) に AIBN を 1.2g 添加し、60℃、24時間ラジカル重合させた。反応後、生じた沈澱をテトラヒドロフラン及びエチルエーテルにて分別精製し、更に純水に対して透析したものを凍結乾燥した。これを温度感受性ポリマー誘導体として本実験に用いた。

3. 温度感受性ポリマー結合 ALP の作製

温度感受性ポリマー誘導体 200mg と ALP 20mg を 0.05M Na_2CO_3 - NaHCO_3 緩衝液 (pH 9.2) 10ml 中で、4℃、一晚反応させた。その後、4℃に冷却した 0.5M トリス-塩酸緩衝液 (TB, pH 7.5) を 10ml 添加し、更に 4℃で 6 時間反応させた。次に反応混合液を 37℃に加温後、遠心 (37℃, 6000xg, 1分) し沈澱を採取した。これを 10mM トリス緩衝生理食塩水 (TBS, pH 7.5) に再溶解し、同様の洗浄操作を 2 回繰り返した後、最終的に 10mM TBS (pH 7.5) に対して透析したものを温度感受性ポリマー結合 ALP として以下の実験に用いた。

4. ALP 活性の測定

基質溶液 (0.1M TB (pH 7.5) 0.5ml, 2.5mM MgCl_2 , 0.2ml, 25mM p-ニトロフェニルリン酸 0.2ml) 0.9ml に、種々の濃度の ALP (0~1mg/ml TBS (pH 7.5)) を 0.1ml 添加した。30℃、5 分間インキュベート後、5mM EDTA·3Na 溶液を 0.1ml 加えて反応を停止した、反応に伴って生成される p-ニトロフェノール由来の 405nm での吸光度の増大を測定し、これを ALP 活性とした。

5. 温度感受性ポリマー結合 ALP の ALP 活性測定

4. と同様の基質溶液 0.9ml に温度感受性ポリマー結合 ALP 溶液を 0.1ml 加え、30℃で 5 分間インキュベートした。5mM EDTA·3Na 溶液を 0.1ml 加えて反応を停止し、遠心後の上清の 405nm での吸光度を測定した。

6. 温度感受性ポリマー結合 ALP の回収

5. で ALP 活性を測定した後の反応液を回収し、これを 37℃に加温した後に遠心 (37℃, 6000xg, 1分) し、温度感受性ポリマー結合 ALP に由来する沈澱を採取した。沈澱を 10mM TBS (pH 7.5) 1ml で洗浄した後、同緩衝液 0.1ml に再溶解した。この溶液に先述の基質溶液 0.9ml を加え、30℃で、再び酵素反応を行った。5 分後に 5mM EDTA·3Na 溶液を 0.1ml 加え、遠心後の上清の 405nm での吸光度を同様に測定した。

結果と考察

温度感受性ポリマー結合 ALP は、調製時に 10mM TBS (pH 7.5) で十分洗浄し、ポリマーと結合していないフリーの ALP 活性が存在しないことを確認した上で回収実験に用いた。また、回収実験において、活性回収率の見積りは ALP 活性の標準曲線中で直線性の認められる範囲内で行われた(図3)。

ALP 活性は可能な限り ALP の失活が生じない条件下 (10mM TB (pH 7.5) 中で 5 分間の反応) で測定し、反応停止に際しても反復利用を考慮して停止時に失活しないように中性の EDTA·3Na 溶液を用いた。

その結果、温度感受性ポリマー結合 ALP が元

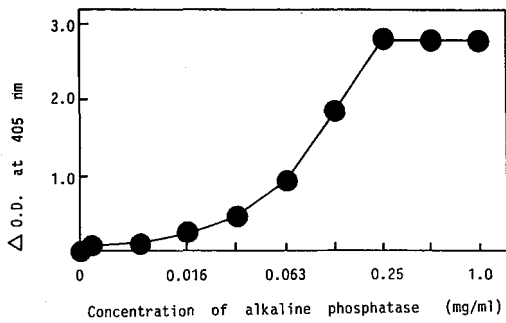


Fig. 3 Standard curve of alkaline phosphatase. Alkaline phosphatase activity was measured as described in Materials and Methods.

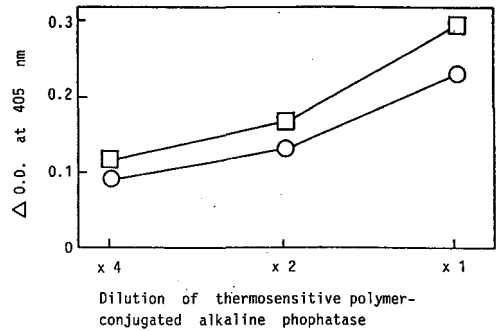


Fig. 4 Recovery of thermosensitive polymer-conjugated alkaline phosphatase. Alkaline phosphatase activity of thermosensitive polymer-conjugated alkaline phosphatase recovered by raising the solution temperature up to 37 °C was assayed (○), as compared to untreated one (□).

来保有していた活性の約80%が、反応後の回収標品中に保持されてくることが明らかとなった (図4)。

今回、モデル酵素としてALPを用い、1回だけではあるが、温度感受性ポリマー誘導体と結合させることによって反復利用が可能な酵素(温度感受性ポリマー結合ALP)を作製することができた。本法は、ALP以外の様々な酵素に適用することも十分に可能であり、リサイクルを指向した種々の酵素試薬の開発へとつながるものと考えられる。

文 献

- 1) Heskins M., Guillet J.E.: Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.* A2: 1441-1455, 1968.
- 2) Priest J.H., Murray S.L., Nelson R.J., Hoffman A.S.: Reverse Polymeric Gels and Related Sys-

tems. *ACS Symposium Series* 350: 255-264, 1987.

- 3) Haas H.C., MacDonald R.L., Schuler A.N.: Synthetic thermally reversible gel systems. *VI. J. Polym. Sci.* 8: 3405-3415, 1970.
- 4) Chen J.P., Yang H.J., Hoffman A.S.: Polymer-protein conjugates I. Effect of protein conjugation on the cloud point of poly (N-isopropylacrylamide). *Biomaterials* 11: 625-630, 1990.
- 5) Chen J.P., Hoffman A.S.: Polymer-protein conjugates II. Affinity precipitation separation of human immunoglobulin by a poly (N-isopropylacrylamide)-protein A conjugate. *Biomaterials* 11: 631-634, 1990.
- 6) Nguyen A.L., Luong J.H.T.: Synthesis and application of water-soluble reactive polymers for purification and immobilization of biomolecules. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 1186-1190, 1989.
- 7) Mori S., Nakata Y., Endo H.: Purification of rabbit C-reactive protein by affinity precipitation with thermosensitive polymer. *Prot. Express. Purif.* 5: 153-156, 1994.

Development of thermosensitive polymer- conjugated enzyme for repeated use.

Shuji MORI, Hiroshi ENDO

Abstract

For the purpose of repeated use of enzyme, alkaline phosphatase conjugated with the reactive derivative of thermosensitive polymer was developed. This novel enzyme was precipitated immediately and recovered from reaction mixture, when the solution temperature was raised to 37°C. Recovered enzyme retained 80% activity compared to that of untreated one.

Key words: thermosensitive polymer, repeated use, alkaline phosphatase

School of Health Sciences Okayama University