

ポリエチレングリコール修飾によるコレステロールエステル 分解酵素の体内挙動変化

森 秀 治・中 田 安 成・遠 藤 浩

Clearance study of polyethylene glycol-modified cholesterol esterase.

Shuji MORI, Yasunari NAKATA and Hiroshi ENDO

The clearance of polyethylene glycol-modified cholesterol esterase was investigated spectrophotometrically, as compared with native one. PEG-modification provided the significant elongation in clearance time of cholesterol esterase after intravenous injection in mouse. This method was shown to be effective for creating new biomaterials.

Key Words : cholesterol esterase polyethylene glycol modification in vivo clearance

緒 言

酵素が持つ優れた性質を、臨床検査を初めとする様々な分野に応用しようとする試みが、近年、飛躍的に進歩し脚光を浴びつつある。しかしながら、実際に酵素を応用するにあたり、安定性や特異性の欠如等の理由から、そのままの形では使用できなかつたり、制限を持たざるを得ない酵素も多数存在する。こういった欠点を持つ酵素については、それを補うか、あるいは新しい機能を付与する工夫が必要であり、その方法の一つとして化学修飾法が存在する。化学修飾法とは、他の分子で従来から存在する物質（酵素）に化学的な修飾を施し、全く新しい機能を持った物質（酵素）へと作り換える方法である。

この手法を用いて、我々はコレステロールエステル分解酵素として従来より知られているコレステロールエステラーゼ (CEH) を、両親媒性ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG) で化学的に修飾することにより、有機溶媒に溶解可能で、かつ有機溶媒中で種々のコレステロールエステルを効率良く合成する新酵素へと作り換えることに成功している^{1,2)}。

一方、このような PEG 修飾を施した CEH は、

その周囲を PEG でくまなく包み込まれているため、生体内投与された場合において、加水分解酵素や免疫系等による分解を受け難くなっているものと予想される。このことを明らかにするために、本研究では PEG 修飾 CEH の生体内挙動に関して、未修飾 CEH との比較のもとに検討を行った。

材 料 と 方 法

1. 活性化 PEG の作製

塩化シアヌル378mg, モノメトキシポリエチレングリコール (平均分子量5,000) 20g をベンゼン中で Na₂CO₃ 存在下 80°C 120hr 反応させ、粗活性化 PEG 画分を得た。この粗画分を石油エーテル及びベンゼン-アセトンの混液を用いてそれぞれ分別精製し、活性化 PEG として CEH の修飾に用いた。

2. PEG 修飾 CEH の作製

CEH 2 mg と活性化 PEG 80mg を 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH10.0) 0.32ml 中で混合し 37°C で 1 hr 反応させた。その後、100mM Tris-buffered saline (TBS, pH7.5) を 5 ml 添加し反応を停止し、更に、未反応物除去のため限外濾過を行った。これを生理食塩水に対して透析し、蛋白定量の後、

100 μ g/ml の濃度に調製して以下の実験に用いた。また、未修飾 CEH も同様の蛋白濃度に調製し実験に供した。

3. 蛋白定量

蛋白質濃度は、Bradford の方法³⁾に準じて測定した。この際、ウシ血清アルブミンを標準物質として用いた。

4. 血漿中 CEH 活性の測定

1) 静脈内投与並びに経時的採血

雄性 Balb/c マウス (8~10週齢, 体重約25g) より、前もって酵素投与の 1 hr 前にコントロールとして眼底採血し、血漿を採取した。その後、PEG 修飾 CEH 及び未修飾 CEH 溶液を尾静脈より 100 μ l 投与し、各々 0.5, 1, 2, 4, 7, 20hr 後に採血し、得られた血漿中に含まれる CEH 活性を Noel らの方法⁴⁾に準じた酵素学的方法を用いて測定した。

2) CEH 活性の測定⁴⁾

生理食塩水で10倍希釈したマウス血漿又は CEH 標品 50 μ l に、950 μ l の発色試薬 (7.9mM フェノール, 0.5mM 4-アミノアンチピリン, 5.61 μ g/ml ペルオキシダーゼ, 68.42 μ g/ml コレステロールオキシダーゼ, 2.6mM ラウリン酸コレステロール, 6.3mM コール酸ナトリウム, 26.8mM トリトン X-100, 10mM TBS (pH7.5)) を添加し、37 $^{\circ}$ C で反応を行った。20分後に、1% NaN₃ 溶液を 100 μ l 加えることにより反応を停止させ、反応に伴って生じて来る赤色素を 500nm で比色定量し CEH 活性とした。

結果と考察

PEG 修飾に基づいて生じる CEH の生体内での挙動変化を実際に検討する前に、まず測定系自体に作用することが予想される種々の因子 (例えば、血漿自体に含まれているコレステロールや採血時に混入してくるヘパリン等) の影響について検討を行った。

その結果、得られた血漿を希釈せずに測定系に加えた場合には有意なバックグラウンドの上昇が認められ、そのままの使用は不可能であった。しかし、この影響は血漿を 5 倍以上に希釈して用

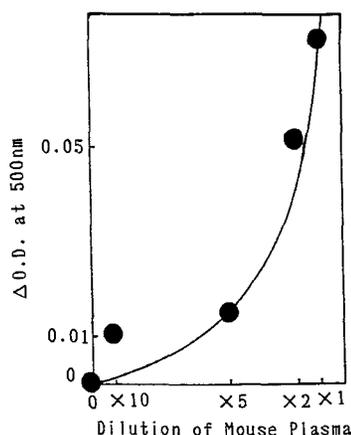


Fig. 1. Effect of mouse plasma on CEH activity. The activity of PEG-modified CEH was assayed in the presence of various concentrations of mouse plasma as described in Materials and Methods.

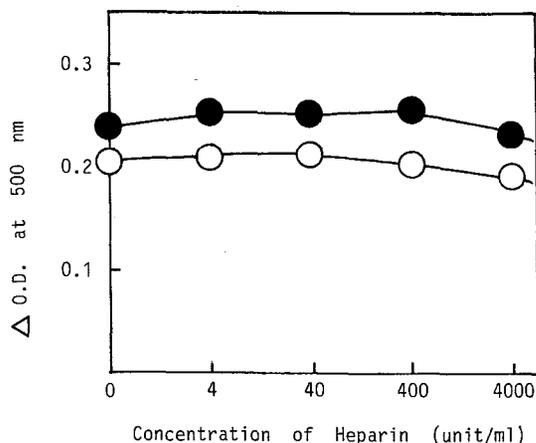


Fig. 2. Effect of heparin on CEH activity. The activity of PEG-modified CEH (○) or native one (●) was measured in the presence of various concentrations of heparin as described in Materials and Methods.

いることによって、ほぼ解消することができた (図 1)。また、ヘパリンの影響に関しては、反応系に 400unit/ml もの濃度で添加した場合でも CEH 活性には殆ど影響が認められず (図 2)、通常、採血時に混入するヘパリンは 4 unit/ml 以下であることよりヘパリン混入の問題は全く考慮する必要の無いことが明らかとなった。

以上の予備的検討の後、PEG 修飾を施した

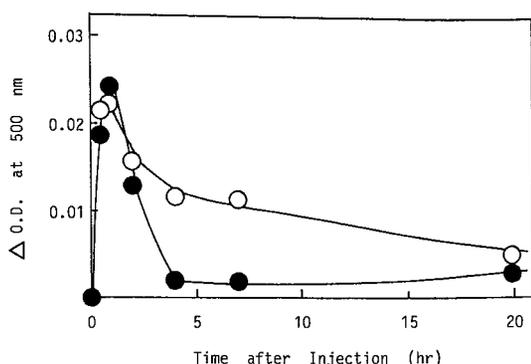


Fig. 3. Time course of CEH activity in mouse plasma after intravenous injection of PEG-modified CEH and native one. Male Balb/c mouse was injected intravenously with 0.1ml of PEG-modified CEH (○) or native one (●). At indicated period, plasma was collected and its CEH activity was measured spectrophotometrically.

CEH をマウスに静脈投与し、その後の血中残存活性を、未修飾 CEH との比較のもとに経時的に測定したところ、両者とも投与後約 1 hr で最大ピークに達することが明らかとなった。しかしながら、未修飾 CEH が投与後 5 hr 以内にはほぼコントロールレベルにまで早やかに低下するのに対して (図 3, ●), PEG 修飾 CEH は投与後 5 hr を経ても、まだ最大活性の約 50% が保持され、コントロールレベルにまで戻るには 20hr 以上を要することが判明した (図 3, ○)。

PEG の性状に関しては、これまでに 1) 蛋白質と共存させた場合に、その高次構造になんら変化を及ぼさないこと、2) イヌ静脈に、90mg/kg/day の濃度で一定期間 (2, 6, 12ヶ月) 投与しても、病理学的、血液学的になんら変化を与えないこと、3) 生体内投与してもアレルギー誘発能が全く認められないこと⁵⁾等の性質を有することが知られている。従って、このような性質を示す PEG で周囲を包み込まれた CEH は、加水分解酵素等による攻撃を受けにくく、かつ免疫系にも認識されにくい安定な分子となる可能性が大であると予想された。現に、PEG と類似した構造を持つ化合物(ポリアルキレングリコール誘導体)にも同様の安定

化作用があることが報告されている^{6,7)}。

本研究においても、PEG 修飾を施すことによって、実際に CEH の血中クリアランスが著しく延長することが明らかとなった。今後、その原因について前述の線に沿った詳細な解析を進めて行く必要があると考えられるが、本手法はこれまでにない機能を持った物質を新たに作製する上で有用な方法であり、他の様々な酵素にも適用することが十分に可能であるため、今後、多分野で幅広く応用されるものと期待される。

文 献

- 1) Mori, S., Nakata, Y. and Endo, H.: Biosynthesis of cholesterol linoleate by polyethylene glycol-modified cholesterol esterase in organic solvents. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15 : 278-282, 1992.
- 2) Mori, S., Nakata, Y. and Endo, H.: Enzymatic properties of polyethylene glycol-modified cholesterol esterase in organic solvents. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 16 : 101-105, 1992.
- 3) Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254, 1976.
- 4) Noel, S.P., Dupras, R. and Filion, A.M.: The activity of cholesterol ester hydrolase in the enzymatic determination of cholesterol: comparison of five enzymes obtained commercially. *Anal. Biochem.* 129 : 467-471, 1983.
- 5) Carpenter, C.P., Woodside, M.D., Kinkead, E.R., King, J.M., Sullivan, L.J.: Response of dogs to repeated intravenous injection of polyethylene glycol 4000 with notes on excretion and sensitization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18 : 35-40, 1971.
- 6) 村上幸子, 船田 正, 石田祀朗: 酵素水溶液の安定化に関する研究; 安定化剤としてのグリセリン=ポリオキシプロピレン=エーテルの効果. *油化学*, 32 : 493-497, 1983.
- 7) 村上幸子, 船田 正, 石田祀朗: 酵素水溶液の安定化に関する研究(第 2 報); グリセリン=ポリオキシプロピレン=エーテルによる安定化について. *油化学*, 33 : 148-150, 1984.