

# 機能性高分子を用いた酵素安定化システムの構築

猿 田 一 平\*・榊 秀次郎

## Constructing of the enzyme stabilization system using functional polymers

Ippei SARUTA\* and Shujiro SAKAKI

(平成24年12月3日受理)

Frozen enzyme at  $-20^{\circ}\text{C}$  can be used over one year. However, the enzyme activity solved in the buffed solutions is no longer available in a day. The pullan which carried out chemical modification of the cholesteryl group forms CHP nanogel. When a mixture enzyme and CHP nanogel was heated, complexation denatured enzyme and CHP nanogel was carried out. When cyclodextrin is added to a complex, nanogel collapses and the enzyme will be native by refolding. The purpose of this research is Constructing of the enzyme stabilization system using functional polymers. In order to form the HRP/CHP complex, the mixed solution of 0.09wt% CHP and  $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$  HRP was heated ( $95^{\circ}\text{C}\cdot 1\text{h}$ ). This complex was preserved at room temperature. To collapse nanogel, 20mM Methyl- $\beta$ -CD was added to this complex after each day, and HRP activity was measured. HRP activity maintained about 100% for 15 days. From these results, the enzyme stabilization system has been constructed using CHP nanogel.

### 1. 緒 言

抗体に酵素が化学修飾された酵素標識抗体は、免疫染色やELISAなどに広く用いられており、標識酵素としては、ペルオキシダーゼなどが知られている(表1)<sup>1-2)</sup>。

表 1. 酵素標識抗体に用いられる酵素

酵素名	由来	入手性
ペルオキシダーゼ	西洋ワサビ	○
$\beta$ -D ガラクトシダーゼ	大腸菌	△
アルカリフォスファターゼ	ウシ小腸	×

西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP), 大腸菌由来 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ, ウシ小腸由来アルカリフォスファターゼは, 粉末・冷凍保存では1年以上安定で長期間の保存に耐えるが, 溶液・室温保存では1日で酵素活性が失活する。

中でも, HRPは入手が容易であり, 測定感度が高いので広く用いられて, その安定化剤としては, ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin,

BSA) が用いられるが, BSE (牛海綿状脳症) などの感染症が懸念され, 医療分野では使用が控えられている。

一方, 本研究で用いたコレステロール置換基プルラン (CHP) は, 多糖であるプルランに糖100ユニットに疎水性のコレステロール基を1~4個化学修飾した機能性高分子であり, 溶液中で自己組織化し, 直径20~30nmのナノゲル (CHPナノゲル) を形成することが知られている (図1)。

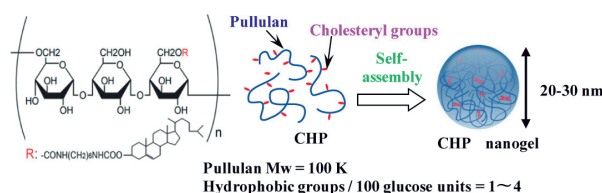


図 1. CHPナノゲルの構造

更に, 熱などにより変性した変性タンパク質 (Denatured protein) は, CHPナノゲルに内包され (complexation), タンパク質/CHPナノゲル複合体 (CHP nanogel protein complex) を形成する。複合化されたタンパク質は, ナノゲル内では機能, あるいは活性を失ってはいるものの, シクロデキストリ

\* 環境システム工学専攻

ン(CD)を添加することにより, CDがコレステロール基と結合し, ナノゲルが崩壊しタンパク質放出する(releasing)。その際に, タンパク質がリフォールディング(Refolding)し, その機能と活性が再生することが知られている(図2)<sup>4-6)</sup>。

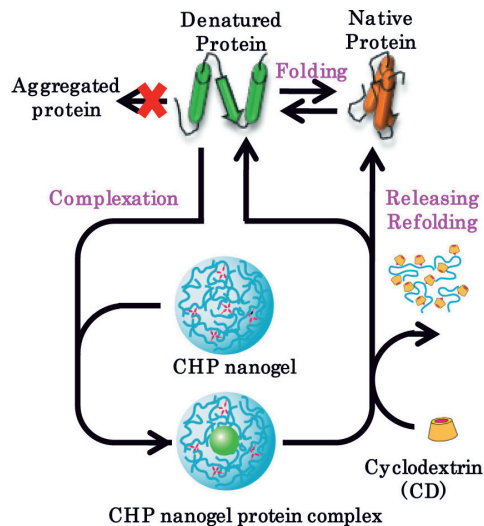


図2. CHPナノゲルによるタンパク質のリフォールディング

そこで本研究では, CHPナノゲルのタンパク質リフォールディング能に注目し, 酵素を室温・溶液状態で安定化することを目的とした。

具体的には「2液（2ステップ）での安定化システム」として, タンパク質を熱変性させることによりCHPナノゲルと複合化させて（図3-①）, タンパク質/CHPナノゲル複合体の状態での長期保存（図3-②）, 必要時毎にCDを添加し（図3-③）, リフォールディングさせ, 活性を安定的に維持させるシステムの構築を目指した（図3）。

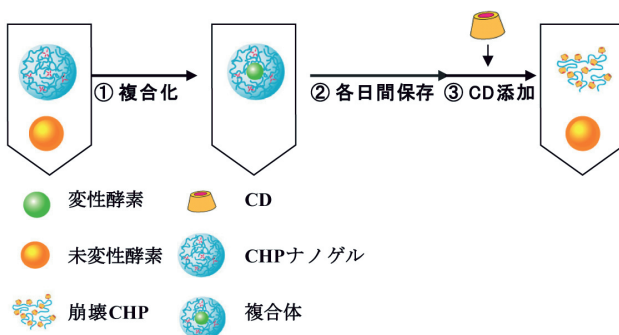


図3. 2液での安定化システム

## 2. 実験

### HRPの測定濃度の検討（1）

0.1mg/mL HRP溶液（10mM リン酸緩衝液, pH 7.0）（以下, 10mM NaPB）を10mM NaPBで希釈し0.005, 0.001, 0.02, 0.025, 0.05 $\mu$ g/mL HRP溶液を調製した。各HRP溶液を10 $\mu$ Lずつ96ウェルポリスチレン製マイクロプレートに添加し, TMB peroxidase Substrate（KPL社）を100 $\mu$ L添加し, 室温で10分間反応させた。反応後, 2N-硫酸水溶液を100 $\mu$ L添加し, 酵素反応を停止させた。各ウェルの吸光度450nmをマイクロプレートリーダー（680 MICROPLATE READER, BIO RAD社）にて測定し, 結果を図4に示した。

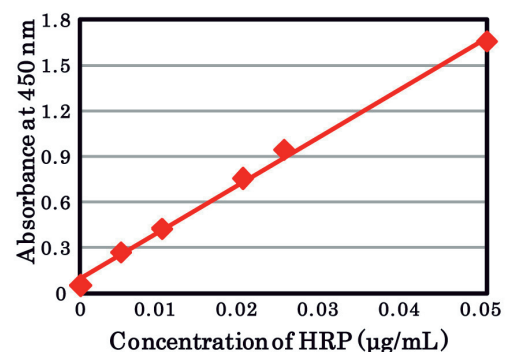


図4. HRP活性の濃度依存性

以上の結果より, 以下の実験では, HRPの終濃度を0.05 $\mu$ g/mLに決定した。

### HRP/CHPナノゲル複合体形成時の加熱条件の最適化

0.05 $\mu$ g/mL HRP 1000 $\mu$ Lをブロックヒーターにて85, 90, 95 $^{\circ}$ Cで10, 20, 30, 40, 50, 60分間加熱した。加熱終了後, 「HRPの測定濃度の検討（1）」と同様に, TMB Peroxidase Substrateを用いて吸光度450nmを測定し, 結果を図5に示した。

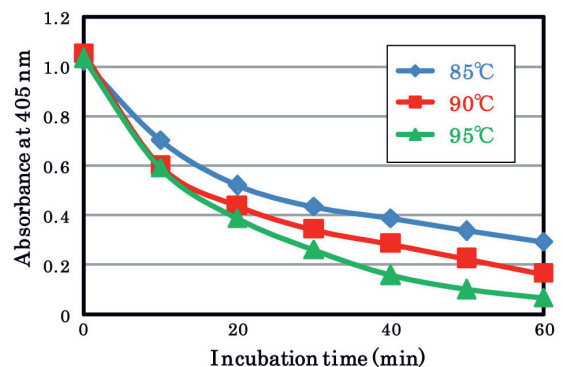


図5. HRP活性の温度・加熱時間依存性

以上の結果より、以下の実験では、95℃・1hで熱変性させることをした。

#### CHP ナノゲル濃度の最適化 (1)

0.1mg/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) 300 $\mu$ L と 0.0009, 0.009, 0.09, 0.9wt% CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB) 300 $\mu$ L を混合させ、95℃・1h インキュベート HRP/CHP ナノゲル複合体を形成させた。各 HRP/CHP ナノゲル複合体に 20mM Methyl- $\beta$ -CD 東京化成工業株式会社) 溶液 (10mM NaPB) を 600 $\mu$ L 添加し、4℃・24h インキュベートし、リフォールディングを行なった。インキュベーション後、10mM NaPB にて 8 倍希釈した。希釈終了後、TMB peroxidase Substrate を用いて吸光度 450nm を測定した。CHP ナノゲル及び CD 未添加 (Native HRP) の HRP 活性を 100% とした時の比活性を図 6 に示した。

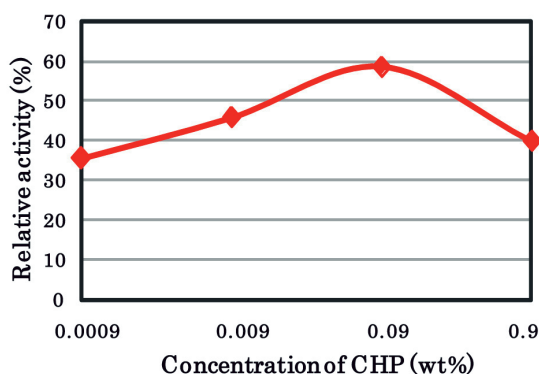


図 6. 残存 HRP 活性の CHP ナノゲル濃度依存

リフォールディング効率は CHP ナノゲル濃度が 0.09wt% の時、58.6% となり最大効率となった。

以上の結果より、0.1mg/mL HRP に対して、HRP/CHP ナノゲル複合体形成に必要な CHP ナノゲル量 (CHP ナノゲル濃度) は 0.09wt% であることがわかった。

#### CD 濃度の最適化 (1)

シクロデキストリンの特徴を表 2 に示した。

表 2. シクロデキストリンの特徴

種類	置換度 (個/グルコース)	分子量
Methyl- $\beta$ -CD	1.7–1.9	1380–1500
HP- $\beta$ -CD	0.6–0.9	1310

0.1mg/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) と 0.09wt% CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB) をそれぞれ 300 $\mu$ L 混合し、95℃・1h インキュベートし、HRP/CHP ナノゲル複合体を形成させた。HRP/CHP ナノゲル複合

体に 4, 8, 16, 20mM の Methyl- $\beta$ -CD あるいはヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン (HP- $\beta$ -CD) (東京化成工業株式会社) 溶液 (10mM NaPB) を 600 $\mu$ L をそれぞれ添加し、4℃・24h インキュベートし、リフォールディングを行なった。インキュベーション後、10mM NaPB にて 8 倍希釈した。希釈後、TMB Peroxidase Substrate を用いて吸光度 450nm を測定した。CHP ナノゲル、各 CD 未添加の HRP 活性を 100% とした時の比活性を図 7 に示した。

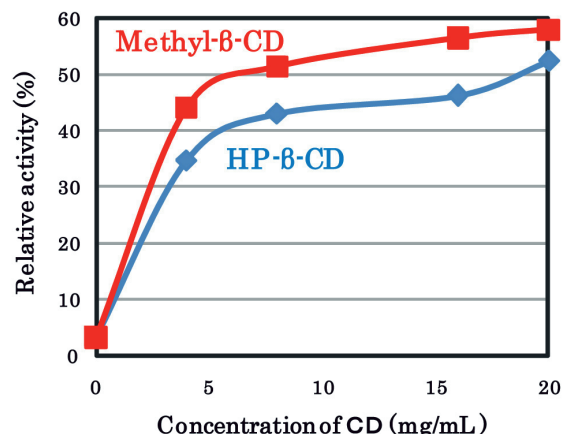


図 7. 残存 HRP 活性の CD 濃度依存

Methyl- $\beta$ -CD を用いた場合がいずれの濃度でも有為にリフォールディング効率が高かった。これは CD の化学修飾の置換度により、コレステロール基との親和性が異なるため、リフォールディング効率に差が見られたと考えられる。

以上の結果より、0.1mg/mL HRP 溶液 (10mM NaPB), 0.09wt% CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB) に対して、HRP/CHP ナノゲル複合体崩壊には、20mM Methyl- $\beta$ -CD 溶液 (10mM NaPB) を用いることとした。

#### HRP の測定濃度の検討 (2)

基質として TMB を用いると、CD を添加しリフォールディングをさせた後に、更に希釈が必要となり、希釈時に更なるリフォールディングが起きていることが懸念される。そこで、より低感度な基質を用いて希釈操作を行わない実験系の確立を目指し、基質として ABTS を用いて測定に適した HRP 濃度決定を行なった。

0.1mg/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) を 10mM NaPB で希釈し、0.02, 0.025, 0.033, 0.05, 0.1 $\mu$ g/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) を調製し、各溶液を 10 $\mu$ L ずつポリスチレン製造マイクロプレートに添加し、

ABTS Peroxidase Substrate (KPL社) を100 $\mu$ L 入れ、室温で10分間反応させた。反応後、1.0wt% SDS水溶液100 $\mu$ Lを入れ反応を停止させた。マイクロプレートリーダーにて、吸光度405nmを測定した。

実験結果を図8に示した。

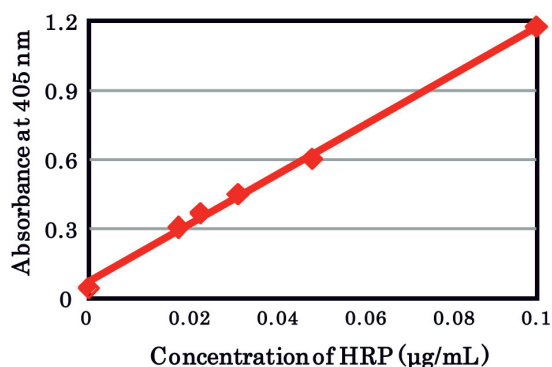


図8. HRP活性の濃度依存性

以上の結果より、以下の実験では、HRPの終濃度を0.1 $\mu$ g/mLに決定した。

#### CHP ナノゲル濃度の最適化 (2)

0.4 $\mu$ g/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) 300 $\mu$ L と 0.0009, 0.009, 0.09, 0.9wt% CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB) 300 $\mu$ L を混合させ、95 $^{\circ}$ C・1h インキュベートし複合体を形成させた。各 HRP/CHP ナノゲル複合体に 20mM Methyl- $\beta$ -CD 溶液 (10mM NaPB) を 600 $\mu$ L 添加し、4 $^{\circ}$ C・24h インキュベートし、リフォールディングを行なった。リフォールディング後、ABTS Peroxidase Substrate を用いて吸光度405nmを測定した。

CHP ナノゲル、CD 未添加の HRP 活性を100%とした時の比活性を図9に示した。

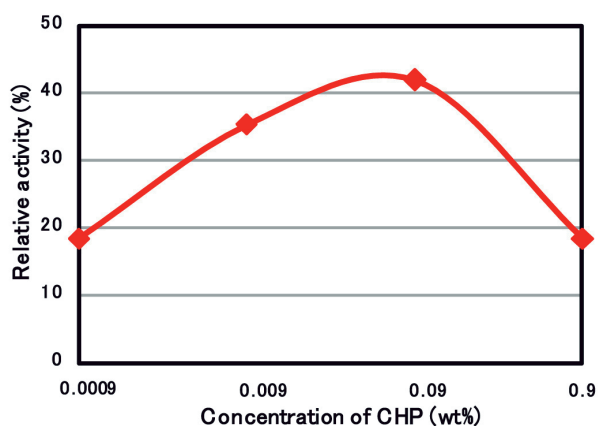


図9. HRP リフォールディングのCHP濃度依存性

リフォールディング効率はCHP ナノゲル濃度が 0.09wt%の時、42.1%となり最大効率となった。

以上の結果より、0.4 $\mu$ g/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) に対して、HRP/CHP ナノゲル複合体形成に必要な CHP ナノゲル量 (CHP ナノゲル濃度) は 0.09wt%であることがわかった。

尚、TMBとABTSを比較すると、必要なCHP ナノゲル量 (CHP ナノゲル濃度) は同一であったが、リフォールディング効率は、TMBが16.5%高く、希釈時に更なるリフォールディングが起きていたと思われる。

#### CD濃度の最適化 (2)

0.4 $\mu$ g/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) と 0.09wt% CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB) をそれぞれ300 $\mu$ L 混合し、95 $^{\circ}$ C・1h インキュベートし、HRP/CHP ナノゲル複合体を形成させた。HRP/CHP ナノゲル複合体に 4, 8, 16, 20mM の Methyl- $\beta$ -CD 溶液 (10mM NaPB) あるいは HP- $\beta$ -CD 溶液 (10mM NaPB) を 600 $\mu$ L をそれぞれ添加し、4 $^{\circ}$ C・24h インキュベートし、リフォールディングを行なった。リフォールディング後、ABTS Peroxidase Substrate を用いて吸光度405nmを測定した。

CHP ナノゲル、各CD未添加の HRP 活性を100%とした時の比活性を図10に示した。

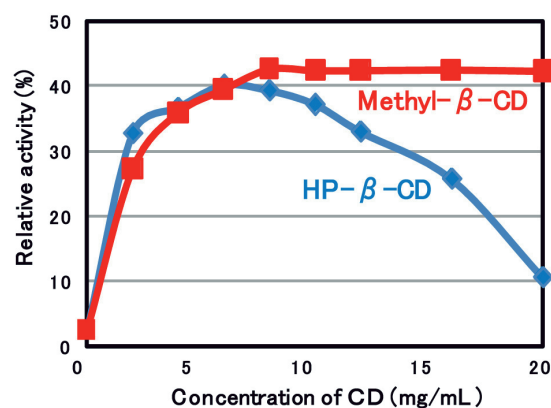


図10. CDの最適化

以上の結果より、0.4 $\mu$ g/mL HRP 溶液 (10mM NaPB), 0.09wt% CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB) に対して、HRP/CHP ナノゲル複合体崩壊には、20mM Methyl- $\beta$ -CD 溶液 (10mM NaPB) を用いることとした。

#### 2液 (2ステップ) 安定化システム構築 (4 $^{\circ}$ C)

0.4 $\mu$ g/mL HRP 溶液 (10mM NaPB), 0.09wt%



CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB), 20mM Methyl- $\beta$ -CD 溶液 (10mM NaPB) を用い, 本研究の目的である 2 液 (2 ステップ) HRP の安定化システム構築 (4℃ 保存) を試みた。

具体的には, HRP を熱変性させることにより CHP ナノゲルと複合化して, HRP/CHP ナノゲル複合体の状態での長期保存し, 必要時毎に CD を添加し, リフォールディングさせ, 活性を安定的に維持させるシステムの構築を目指した (図11)。

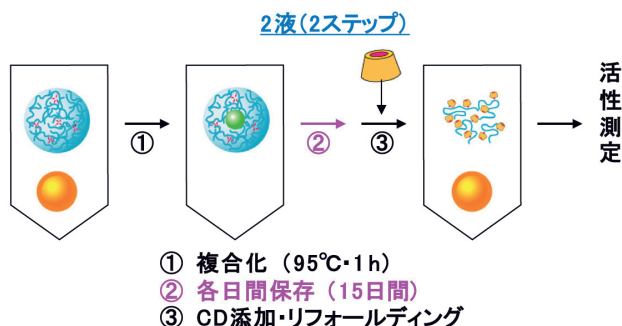


図11. 2液 (2ステップ) 安定化システム

0.4 $\mu$ g/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) 300 $\mu$ L, 0.09wt% CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB) 300 $\mu$ L を混合させ, 95℃・1h インキュベートし, HRP/CHP ナノゲル複合体を形成させた。HRP/CHP ナノゲル複合体を 4℃ で 15日間保存し, 各日後 (0, 1, 2, 5, 8, 9, 13, 14, 15日後) 20mM Methyl- $\beta$ -CD 溶液 (10mM NaPB) を 600 $\mu$ L 添加して HRP のリフォールディングを行なった。リフォールディング終了後, 各溶液を 10 $\mu$ L ずつポリスチレン製造マイクロプレートに添加し, ABTS Peroxidase Substrate を 100 $\mu$ L 入れ, 室温で 10 分間反応させた。反応後, 1.0wt% SDS 水溶液 100 $\mu$ L を入れ反応を停止させた。マイクロプレートリーダーにて, 吸光度 405nm を測定した。

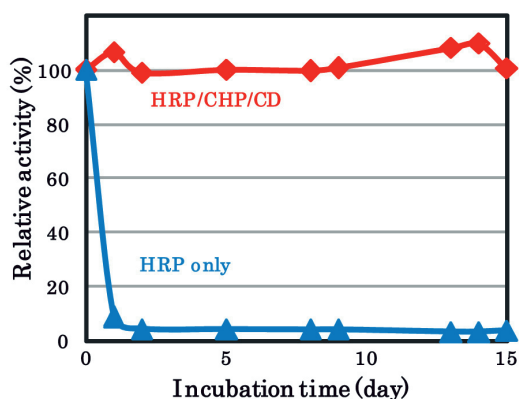


図12. 2液での安定化システム (4℃)

0 日目の酵素活性を 100% としたときの比活性を図12に示した。

CHP, CD 未添加 (HRP only) の残存 HRP 活性は, 1 日後に 10% 未満となった。一方, CHP, CD 添加 (HRP/CHP/CD) では, 15 日後でも 100.2% の酵素活性を維持した。以上より, 4℃ における 2 液での酵素安定化システムが構築出来た。

#### 2液 (2ステップ) の安定化システム構築 (25℃)

4℃ における 2 液 (2 ステップ) での安定化システムの構築が出来たので, 保存温度を 25℃ に変えて同様の検討を行なった。

0.4 $\mu$ g/mL HRP 溶液 (10mM NaPB) 300 $\mu$ L, 0.09wt% CHP ナノゲル溶液 (10mM NaPB) 300 $\mu$ L を混合させ, 95℃・1h インキュベートし, HRP/CHP ナノゲル複合体を形成させた。HRP/CHP ナノゲル複合体を 25℃ で 15日間保存し, 各日後 (0, 1, 2, 5, 8, 9, 13, 14, 15日後) 20mM Methyl- $\beta$ -CD 溶液 (10mM NaPB) を 600 $\mu$ L 添加して HRP のリフォールディングを行なった。リフォールディング終了後, 各溶液を 10 $\mu$ L ずつポリスチレン製造マイクロプレートに添加し, ABTS Peroxidase Substrate を 100 $\mu$ L 入れ, 室温で 10 分間反応させた。反応後, 1.0wt% SDS 水溶液 100 $\mu$ L を入れ反応を停止させた。マイクロプレートリーダーにて吸光度 405nm を測定した。

0 日目の酵素活性を 100% としたときの比活性を図13に示した。

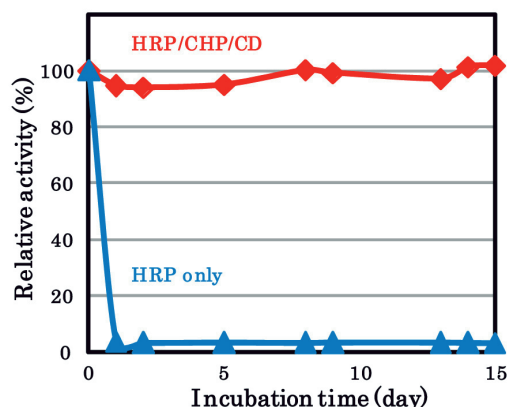


図13. 2液での安定化システム (25℃)

保存温度を 25℃ にしても, 4℃ 同様に CHP, CD 未添加 (HRP only) の残存 HRP 活性は, 1 日後に 10% 未満となった。一方, CHP, CD 添加 (HRP/CHP/CD) では, 15 日後でも約 101.7% の酵素活性を維持した。以上より, 25℃ における 2 液での酵素安定化システムが構築出来た。

### 3. 参考文献

1. 石川榮治（著），生化学実験法27 酵素標識法，学会出版センター，1991
2. 石川榮治，河合 忠，宮井 潔（編），酵素免疫測定法（第3版），医学書院，1987
3. N. Karupiah, C. Hedgepeth and D. I Wang : J. boil. Chem., 211, 60
4. K. Akiyoshi, E-C. kang, S. Kurumada, J. Sunamoto, T. Principi and F. M. Winnik : Macromolecules, 33, 3244 (2000)
5. K. Akiyoshi, A. Ueminami, S. Kurumada, and Y. Nomura : Macromolecules, 33, 6752 (2000)