

生体親和性分子を用いた酵素安定化技術の開発

東京農工大学グローバルイノベーション研究院 村岡 貴博

【略歴】

- 2002年 3月 東京大学工学部化学生命工学科卒業
- 2004年 4月 日本学術振興会特別研究員 (DC1)
- 2007年 3月 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻博士課程修了
博士(工学)取得
- 2007年 4月 日本学術振興会特別研究員 (PD)
- 2008年 5月 東北大学多元物質科学研究所助教
- 2013年 10月 科学技術振興機構戦略的創造推進事業さきがけ研究者 (兼任)
- 2015年 5月 東京工業大学大学院 生命理工学研究科 助教
- 2016年 4月 東京工業大学生命理工学院助教 (改組)
- 2017年 2月 東京農工大学グローバルイノベーション研究院准教授

ポリエチレングリコール

ポリエチレングリコール (PEG) は非イオン的でありながら高い水溶性を有するポリエーテルであり、生体親和性も高く、タンパク質に対し共有結合で導入することでストレス効果を与え、またタンパク質溶液に過剰量添加することで沈殿させるなど、タンパク質化学と密接に関わりのある物質である。これらの応用において用いられる PEG は、通常直鎖状分子であり、また分子量分布を有する重合混合物である。広く応用に用いられる反面、PEG の形状や置換基導入の効果について、純物質としての精密な評価は未だ不十分である。我々は最近、特定鎖長 PEG の精密高速合成法の開発を基盤とし、特に PEG 分子の形の効果に注目し、研究を進めている。その中で、PEG 分子の形を精密制御することで、酵素を高効率に安定化する機能が現れることを見出した。

幾何学形 PEG の酵素安定化効果

形状の効果に着目し、二次元状に構造化した PEG として右図に示す三角形 PEG 分子 **1** を開発した。末端に水酸基を有し、エチレングリコール鎖の連結から成る PEG とよく似た構造要素を保持するために、三角形の頂点部位としてペンタエリスリトールを用いた。比較分子として、ほぼ同じ分子骨格、分子量から成る直鎖状分子 **2** も合成した。

PEG は、水中で熱に応答してコンフォメーションを変化させる性質を有する。特に C-C 結合は、室温ではゴーシュ形が安定であるが、温度上昇によりアンチ形の割合が増える。構造化した **1** も同様の熱応答性を示すことが、温度可変 IR、¹³C NMR スペクトル測定から示唆された。ここで、ゴーシュからアンチへのエチレングリコール部分のコンフォメーション変化により、PEG の疎水性が増加することが知られ、結果として PEG は高温で脱水和する。¹H NMR の緩和時間を基に **1** と **2** の脱水和温度を調べたところ、1.8 mM において **2** は 80 °C でも脱水和しないのに対し、**1** は 60 °C 付近で脱水

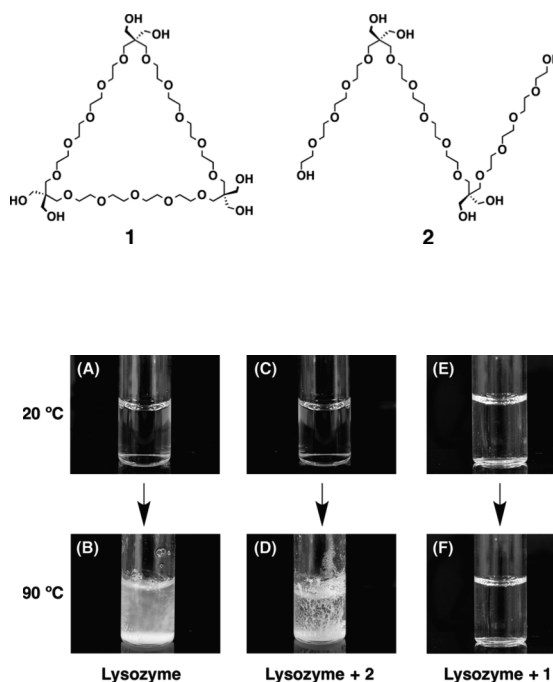


図 1. Pictures of lysozyme in PBS (0.21 mM) at 20 °C and 90 °C; A, B) no additive, C, D) with **2** (34 mM) and E, F) with **1** (34 mM).

和することが示された。この脱水と温度が大幅に減少する、という点は、PEG を二次元状に構造化した一つの効果と考えられる。

我々はこの **1** 特有の効果を、卵白由来リゾチームの凝集抑制に応用した。タンパク質は高温ではその立体構造が崩れ、疎水部が表面に露出する。通常、この露出した疎水部が分子間で相互作用することでタンパク質は凝集する。ここで、高温で疎水性を増した **1** が、タンパク質の露出した疎水部と相互作用すると、凝集が抑制されるのではないかと考えた。リゾチームの PBS バッファー溶液に対し、**1, 2** を添加し加熱した。リゾチームの PBS 溶液を 90 °C まで加熱すると、白濁する (図 1 A, B)。これはリゾチームが凝集したことを示す。**2** を添加した場合も、同様に白濁した (図 1 C, D)。対照的に、**1** を添加した溶液では、90 °C で 30 分加熱しても白濁は見られなかった (図 1 E, F)。つまり、リゾチームの凝集が抑制されたことを示す。

加熱後のリゾチームの酵素活性を調べた (図 2)。0.21 mM のリゾチーム PBS バッファー溶液を 98 °C で 30 分加熱すると、その酵素活性は消失した。**1** を 30 mM 添加した場合、同じ熱処理後 78% の酵素活性が示された。これに対し、**2** や、同程度の分子量から成る通常の PEG (PEG-1000) を添加した場合は、加熱後最大でも 10% 程度の酵素活性しか見られなかった。さらに注目すべきことに、**1** の凝集抑制効果は、凝集抑制剤として広く用いられている L-アルギニン塩酸塩よりも 8 分の 1 添加量で同程度の効果を示す。これらのことから、PEG を二次元的に構造化することで、酵素に対する高い熱凝集抑制機能が現れることが示された。

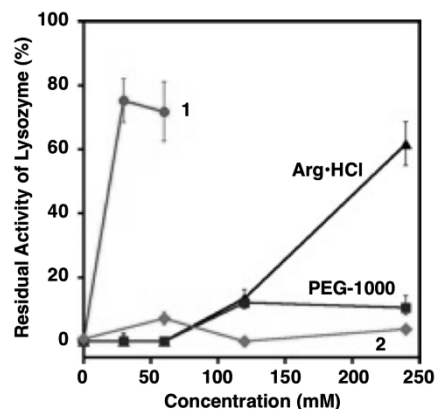


図 2. Residual enzymatic activity of lysozyme (0.21 mM) after heating with different concentrations of additives.

今後の展望

今回見出した幾何学形 PEG の酵素安定化効果を基盤とし、PEG の分子形状と物性・機能の相関関係を広く精査することで、より高効率に機能する酵素安定化剤開発につなげたい。

謝辞

本研究は東京工業大学生命理工学院金原研究室において行われたものであり、金原数教授ならびに研究遂行に携わった学生諸氏に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. A. Wawro, T. Muraoka, K. Kinbara. Chromatography-Free Synthesis of Monodisperse Oligo(ethylene glycol) Mono-p-Toluenesulfonates and Quantitative Analysis of Oligomer Purity. *Polym. Chem.*, 7, 2389 (2016).
2. S. Kawasaki, T. Muraoka, T. Hamada, K. Shigyou, F. Nagatsugi, K. Kinbara. Synthesis and Thermal Responses of Polygonal Poly(ethylene glycol) Analogues. *Chem. Asian J.*, 11, 1028 (2016).
3. N. Sadhukhan, T. Muraoka, M. Ui, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, K. Kinbara. Protein Stabilization by an Amphiphilic Short Monodisperse Oligo(ethylene glycol). *Chem. Commun.*, 51, 8457 (2015).
4. T. Muraoka, N. Sadhukhan, M. Ui, S. Kawasaki, E. Hazemi, K. Adachi, K. Kinbara. Thermal-Aggregation Suppression of Proteins by a Structured PEG Analogue: Importance of Denaturation Temperature for Effective Aggregation Suppression. *Biochem. Eng. J.*, 86C, 41 (2014).
5. T. Muraoka, K. Adachi, M. Ui, S. Kawasaki, N. Sadhukhan, H. Obara, H. Tochio, M. Shirakawa, K. Kinbara. A Structured Monodisperse PEG for the Effective Suppression of Protein Aggregation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 2430 (2013).