MPC ポリマーを用いた HRP 安定化システム

伊藤　恵*・菅原　拓郎・榊　秀次郎

Enzyme stabilization systems using MPC polymers

Megumi ITO*, Takuro Sugawara and Shujiro Sakaki

（平成 26 年 12 月 24 日受理）

Horse radish peroxidase (HRP) is stable in case of freeze powder, but denatured in case of solution. Freeze-dried HRP powder is stable, but HRP solution denature no more than one day. Bovine serum albumin (BSA) is used as traditional stabilizer. But BSA has a risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), so development of synthetic stabilizer is required. In this study, poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co*-butyl methacrylate (BMA)) (PMB) was used as synthetic stabilizer. Hydrophilic-hydrophobic balance and molecular weight of PMB can be controlled since PMB is synthetic polymer. When 1.0 wt% BSA solution and sucrose solution used as stabilizer, remaining activity of HRP decreased about 10% and 20% after 28 days respectively. In case of 1.0 wt% PMB solution, the activity remained about 40-60%. On the other hand, in case of 1.0 wt% PMB, 15 wt% sucrose solution, the activity remained 70-80%. These results indicated that PMB and sucrose had the ability to inhibit denaturation of HRP. We concluded that poly (MPC-*co*-BMA) is an effective synthetic stabilizer in ELISA systems.

1.緒　言

酵素を抗体に化学修飾した酵素標識抗体は、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA）による疾患の検査や、免疫染色による癌の検出などに広く使われている。標識酵素としては、アルカリ性フォスファターゼ（ALP）や、β-D-ガラクトシターゼ（β-Gal）や、西洋ワサビ過酸化酵素(HRP)が用いられているが、なかでも植物由来であり入手が容易で、高感度測定が可能な HRP が広く使われている[1)]。

しかしながら、HRP は粉末・冷凍保存では 1 年以上安定であるが、直ちに利用可能な、希薄溶液を常温保存すると 1 日以内で失活してしまう。そのため、安定化剤として牛血清アルブミン（BSA）を HRP 溶液に添加することが知られている。しかし、BSA を用いることにより牛海綿状脳症（BSE）に感染してしまうことが懸念されている。BSE の原因は異常となった蛋白質が感染の本体であり、従来の滅菌方法や熱処理が効かない性質を持っている。このため、BSE の感染を懸念されることのない安定化剤が望まれている。

また、タンパク質の凍結乾燥時には、タンパク質同士の会合を防ぐことを目的として、サッカロース（Sucrose）等の糖類を加えるとことが知られている[2)]。

一方、タンパク質の立体構造は、親水性部位を外側に、疎水性部位を内側にしているが、高温では水分子が振動し脱水和し、内部の疎水部位が露出し、他の疎水性露出部分と疎水性相互作用し沈殿し失活する[3)]。

そこで本研究では、生物由来の原料を用いない、完全合成品で、且つ、タンパク質との相互作用をコントロールするために、その分子量及び、親水-疏水バランスを自由にコントロールできる 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）と *n*-ブチルメタクリレート共重合体（PMB）（図 1）を用いた HRP 安定化システムの構築を目的とした。

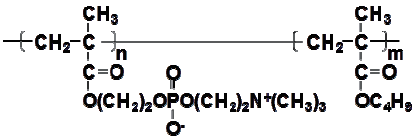


図 1．PMB の構造式

*技術教育支援センター

２.実　験

２－１．BSA による HRP の安定化

西洋わさび由来ペルオキシダーゼ（HRP，和光純薬工業製）およびダルペッコリン酸緩衝生理食塩水（D-PBS）（Sigma-Aldrich 社製）を用いた。

［材料・方法］

西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP,和光純薬工業) 1 mg に 500 μL のダルペッコリン酸緩衝生理食塩水（D-PBS）を加えた（原液Ⅰ）。

D-PBS にて 5 倍希釈し 400 μl の D-PBS を添加し、403 nm の吸光度を測定し、HRP の 403 nm の吸光係数 $\varepsilon_{403\ nm}$ = 2.275 cm^3/mg より、原液Ⅰの HRP 濃度を求めた。原液Ⅰに D-PBS を適量添加し 1.0 mg/ml HRP 溶液を調製した。

1 wt% BSA 溶液（D-PBS）と、D-PBS 10 ml（BSA 未添加、Non）に、10 μg/ml HRP 溶液を 50 μl 添加した。各溶液 10 μl に基質溶液である ABTS Microwell Peroxidase Substrate（1-Component System）（2,2‘-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt)（ABTS)基質溶液）（フナコシ(株)）100 μL 加え、室温・10 分間インキュベートした。1 wt% ドデシル硫酸ナトリウム(sodium lauryl sulfate: SDS）溶液を加えて反応を停止させ、マイクロプレートレーダー（Model680, BIO-RAD 製）を用いて 405 nm の吸光度を測定した。0 日目の吸光度を 100%とし、各日後（0, 1, 2, 7, 9, 14, 21, 28, 35, 42 日後）の残存相対酵素活性を測定した。

［結果・考察］

未添加（Non）と 1 wt% BSA 添加の残存相対酵素活性を図 2 に示した。

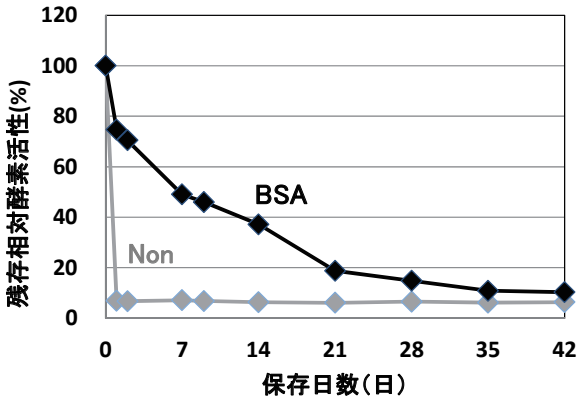


図２.BSA による HRP の安定化

未添加（Non）は 1 日で失活したが、BSA 添加により安定化したが、21 日以降の残存相対酵素活性は、20%以下となった。

以上の結果より、BSA には HRP の安定化能があるが、BSA 自身がタンパク質であるため、保存により次第に失活したと思われる。

２－２．Sucrose による HRP の安定化

［方法・材料］

HRP 溶液の調製手順は２－１と同様に行った。

15, 10, 5 wt% Sucrose 溶液（D-PBS）を調製した。

15, 10, 5 wt% Sucrose 溶液（D-PBS）10 mL に、10 g/ml HRP 溶液を 50 μl 添加した。

尚、Sucrose の構造式を図３に示した。

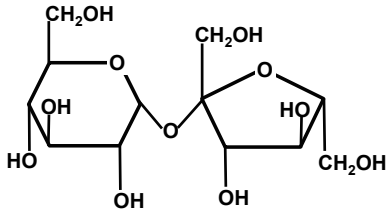


図３.Sucrose の構造式

２－１と同様に各日後（0, 1, 2, 7, 9, 14, 21, 28, 35, 42 日後）の残存相対酵素活性を測定した。

［結果・考察］

未添加（Non）と 5, 10, 15 wt% Sucrose 添加の残存相対酵素活性を図４に示した。

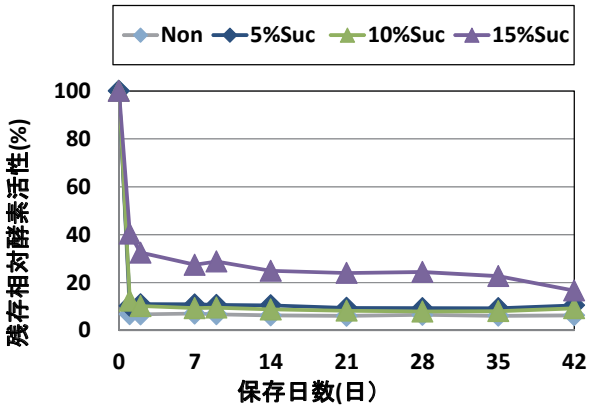


図４.Sucrose による HRP の安定化

5, 10 wt% Sucrose 添加は、Non（未添加）と同様に 1 日で失活したが、15 wt% Sucrose 添加では、約 20%の

残存相対酵素活性を示した。
以上の結果より、Sucrose の安定化機構には、濃度依存性があり、Sucrose の添加濃度が高くなると溶液の粘度が上がりタンパク質同士の接触を防いだと思われる。

２－３．PMB による HRP の安定化

PMB として、MPC と *n*-ブチルメタクリレート（BMA）の共重合体で、MPC/BMA の共重合組成比が３：７の PMB37（日油製）（図５）と、８：２の PMB82（日油製）（図６）を用いた。

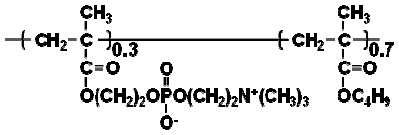


図５. PMB37 の構造式

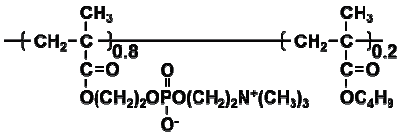


図６. PMB82 の構造式

［方法・材料］
4.0 wt% PMB37（あるいは PMB82）溶液（D-PBS）2.50g と D-PBS 7.50 g を混合し、1.0 wt% PMB37（あるいは PMB82）溶液（D-PBS）を調製した。1.0 wt% PMB37（あるいは PMB82）溶液（D-PBS）10 mL に、10 μg/ml HRP 溶液を 50 μl 添加した。
２－１と同様に各日後（0, 1, 2, 7, 9, 14, 21, 28, 35, 42 日後）の残存相対酵素活性を測定した。
［結果・考察］
未添加（Non）と PMB37（あるいは PMB82）添加の残存相対酵素活性を図７に示した。

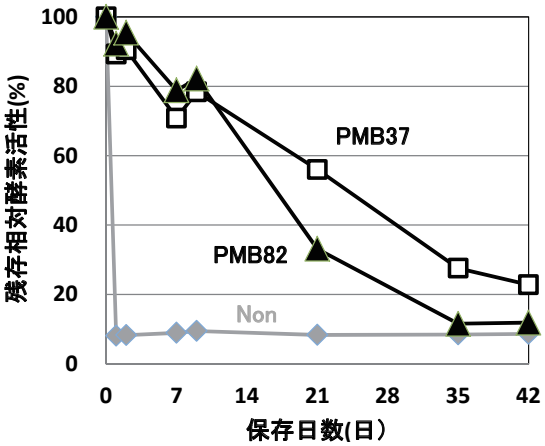


図７. PMB37、PMB82 による HRP の安定化

未添加（Non）及び、２－１の BSA 添加と比較すると、PMB37（あるいは PMB82）添加は安定化したが、保存日に依存し、残存相対酵素活性は低下した。
また、PMB37 と PMB82 を比較すると、PMB37 の方が、安定化能が高いことがわかった。

２－４．PMB および Sucrose による HRP の安定化

Sucrose および MPC ポリマーに安定化能はあることは確認されたが、長期保存（１か月保存）にはまだ不十分である。
そこで、PMB37 と PMB82 に更に Sucrose を添加し、HRP の残存相対酵素活性を測定することにした。Sucrose の濃度は２-２と同様に 5, 10, 15 wt%とした。
［方法・材料］
2.50 g の 20 wt% Sucrose と 7.50 g の 4.0 wt% PMB37 を加えて PMB37 + 5 wt% Sucrose を作成した。同様に、5.00 g の 20 wt% Sucrose と 5.00 g の 4.0 wt% PMB37 を加えて PMB37 + 10 wt% Sucrose を、7.50 g の 20 wt% Sucrose と 2.50 g の 4.0 wt% PMB37 を加えて PMB37 + 15 wt% Sucrose を作成した。同様に PMB82 + 5, 10, 15 wt% Sucrose も作成した。各溶液 10 mL に、10 μg/ml HRP 溶液を 50 μl 添加した。
２－１と同様に各日後（0, 1, 2, 7, 9, 14, 21, 28, 35, 42 日後）の残存相対酵素活性を測定した。
［結果・考察］
残存相対酵素活性を図８に示した。

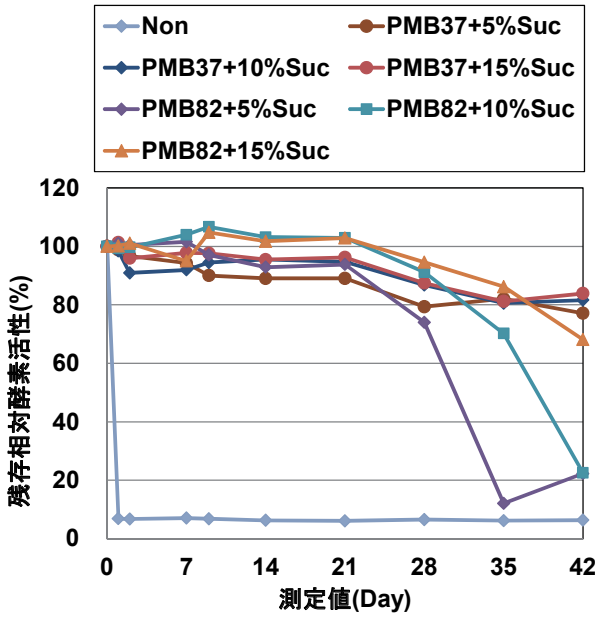


図８. PMB37、PMB82、Sucrose による HRP の安定化

Sucrose 濃度が高いほど、PMB37, PMB82 双方において安定可能は高くなった。PMB37 と PMB82 を比較すると、PMB37 は 5, 10 wt%の Sucrose でも大きな失活は見られず、より優れた安定化能を有していることがわかった。一方 PMB82+Sucrose 5 wt%は、PMB82 単体と同じく 28 日頃から活性が低下し、30 日以上でほぼ失活し、PMB82+10 wt% Sucrose も同様に 30 日以上で失活しはじめた。

15 wt% Sucrose 添加は、42 日間後の相対酵素活性がそれぞれ、PMB37+15 wt% Sucrose が約 84%、PMB82+15 wt% Sucrose が約 68%と高い安定性を示した。

以上の結果より、PMB37 に更に 15 wt% の Sucrose を加えることが効率良く HRP を安定化できることがわかった。

２－５．PMB、Sucrose の表面張力

界面活性剤等の界面活性能がある物質を加えると、両親媒基が界面に移動して、その不安定な状態を和らげ、表面張力を低下させる。界面活性能がある物質を更に加えると、ある一定濃度（臨界ミセル濃度, CMC）以上で、親水性部分を外側に、親油性部分を内側にしたミセルを形成する（図９）[4]。

尚、界面活性剤のミセル及び、臨界ミセル濃度（CMC）のモデル図を図９に示した。

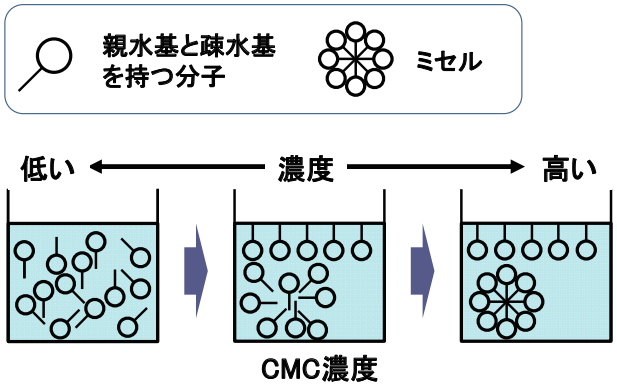


図９. 界面活性剤のＣＭＣ濃度

このことにより、界面活性剤を添加すると疎水性部位の露出を抑えることが可能となり、タンパク質を安定化することが可能となる。

以上より、界面活性剤の濃度による表面張力の変化を確認し、濃度に依存して表面張力の低下がある場合は界面活性能があることがわかり、HRP を安定化させる作用があることが推察される。

そこで、この表面張力測定を行うことで、これまで用いてきた PMB37、PMB82、Sucrose にどのような安定化機構があるのか検証を行うことを目的とした。Sucrose の濃度は、HRP 安定化能が最も高かった 15 wt%にて検討した。

［方法・材料］

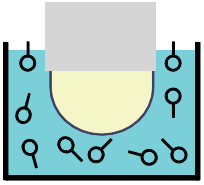
15 wt% Sucrose 水溶液は 450.00 g D-PBS に 67.50 g の Sucrose を加えて調製した。

PMB37, PMB82 水溶液はそれぞれ蒸留水で希釈し、0.001, 0.002, 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 wt%の各水溶液を調節した。

PMB37+15 wt% Sucrose、PMB82+15 wt% Sucrose 水溶液はそれぞれ 15 wt% Sucrose 溶液で希釈し、0.001, 0.002, 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 wt%の各水溶液を調節した。

SITA Dyno Tester（英弘精機㈱）を用いてバブル法にて測定した。

尚、バブル法の原理を図 10 に示した。



- 液中に気泡を発生させ、新しい界面を形成させる
- 発生させた気泡が半円になった時、液体からの圧力が最大になる
- 気泡にかかる圧力の最大値と最小値の差から表面張力を算出する

図 10. バブル法の原理

［結果・考察］

PMB37 あるいは PMB82（PMBs）および、PMBs ＋ 表面張力の測定結果を図 11 に示した。

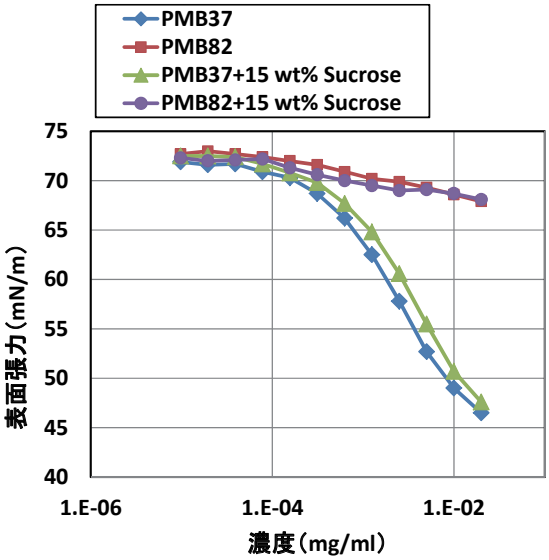


図 11. PMBs, PMBs ＋ Sucrose の表面張力

PMB37 は PMB82 より濃度に依存して表面張力が大きく低下したため、高い界面活性能があることがわかった。PMB82 は濃度を変化させても表面張力はわずかに低下したのみで、界面活性能がほとんど無いことがわかった。

前記の実験結果で得られたように PMB37 は PMB82 より安定化能が高かったのは、PMB37 は PMB82 よりも界面活性能が高いために HRP を安定化能が高かったと考えられる。

しかしながら、PMB37（あるいは PMB82）に Sucrose を加えても界面活性能に大きな変化はなかった。

Sucrose 水溶液の濃度を変化させて表面張力を測定したところ、表面張力に変化はなく、界面活性能はなかった（データ未記載）。

よって、Sucrose は PMB37, PMB82 と相互作用して HRP を安定化しているのではなく、Sucrose そのものに HRP を安定化させる機構が備わっていることがわかった。

また、表面張力の影響はない Sucrose の安定化能は濃度に依存していることからも、粘度が上がり、タンパク質同士の接触を防ぐことによりタンパク質を安定化させたこと思われる。

以上の結果より、MPC と *n*-ブチルメタクリレート（BMA）の共重合体で、MPC/BMA の共重合組成比が 3:7 の PMB37 及び、Sucrose の双方を用いることにより、25℃で 1 カ月間、HRP を保存できることがわかった。

3. 総　括

- HRP の残存相対酵素活性について、ウシ血清アルブミン（BSA）、MPC と *n*-ブチルメタクリレート（BMA）の共重合体で、MPC/BMA の共重合組成比が 3：7 の PMB37 と、8：2 の PMB82（PMB37、PMB82 を安定化剤として用いて、それぞれ 42 日間の残存相対酵素活性を測定した。
- PMB37 の方が PMB82 より安定化能が高いことがわかった。しかし、いずれも HRP は、安定化はしたが、長期保存には向いておらず、何らかの方法で安定化を更に高める必要があった。
  そこで、タンパク質の凍結乾燥時の安定化剤として用いられる Sucrose に注目した。
- 15 wt% Sucrose には安定化能があることが確認でき、PMB37、PMB82 を共に安定化剤として用いると、PMB37+15 wt% Sucrose と PMB82+15 wt% Sucrose はこれまでよりも高い安定化能が確認できた。
- PMB37、PMB82 及び Sucrose の安定化能が何に起因するのかを詳しく調べるために、表面張力の測定を行った。測定対象としては、PMB37, PMB82, PMB37+15 wt% Sucrose, PMB82+15 wt% Sucrose の 4 種類を用いた。
- PMB37 は表面張力が大きく下がり、PMB82 はほとんど下がらなかった。この違いより、PMB37 の方が高い安定化能を示したと考えられる。
- MPC と *n*-ブチルメタクリレート（BMA）の共重合体で、MPC/BMA の共重合組成比が 3：7 の PMB37

及び、Sucrose の双方を用いることにより、25℃で１カ月間、HRP を保存できることがわかった。

４．参考文献

1) 西岡久壽彌・島田孝吉・真崎知生，役に立つ免疫実験法，株式会社講談社，p. 150、p. 164-166
2) 鈴木哲夫，糖ガラスによるタンパク質の熱安定化に関する分子動力学シミュレーション　蛋白質化学会アーカイブ，2，e053（2009）
3) 渡辺公綱・小島修一，バイオテクノロジー教科書シリーズ9 蛋白質工学概論，p. 30、p. 169
4) 岡部平八郎，エンジニアリング・サイエンス講座18 界面工学，p. 69-75