

26P-am09

温度応答性高分子-トリプシン複合体の合成とその評価

○笹井 泰志¹, 真柄 豊¹, 土井 直樹¹, 山内 行玄², 葛谷 昌之³, 近藤 伸一¹ (¹岐阜薬大, ²松山大薬, ³中部学院大人間福祉)

【目的】我々は、これまでに、プロテアーゼであるトリプシンをビニルメチルエーテル-マレイン酸共重合体 (VEMAC) で修飾した自己消化耐性を有するトリプシン複合体の合成について報告している。しかしながら、本複合体は、低分子基質に対しては高い活性を有するものの、タンパク質基質に対し十分なプロテアーゼ活性を示さなかった。本研究では、温度応答性高分子を用い、トリプシンの修飾状態を最適化することで、複合体のプロテアーゼ活性の改善について検討した。

【方法】VEMAC のカルボキシル基の一部から上限臨界溶液温度 (UCST) を持つ [2-(methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide (SBMA) のグラフト鎖を伸長させ、温度応答性を有する VEMAC/SBMA を合成した。4 °C (VEMAC/SBMA の UCST 未満の温度 (凝集状態)) で VEMAC 由来のカルボキシル基をトリプシンのアミノ基と縮合させることで VEMAC/SBMA 修飾トリプシン複合体 (VEMAC/SBMA-Tryp) を合成した。タンパク質基質として azocasein (AC) を用い、その分解速度からプロテアーゼ活性を算出した。

【結果および考察】VEMAC/SBMA の UCST は、SBMA の導入率や鎖長により、制御が可能であった。最適化された VEMAC/SBMA-Tryp は、自己消化耐性を持つとともに、55 °C (VEMAC/SBMA の UCST 以上の温度 (溶液状態)) においても高い活性を長時間保持した。また、55 °C におけるプロテアーゼ活性も大いに改善できた。以上の結果は、凝集状態の粒子状 VEMAC/SBMA 表面にトリプシンが固定化されることで、複合化の際、トリプシンが過剰に高分子で修飾されることなく、溶液状態としたとき、AC のトリプシン活性部位へのアクセシビリティが確保されているためと考えられる。