

## バイオ物質の医学・工学への利用 (II)

Application of biomaterials to  
biomedical and biotechnological process. (II)

野口幸紀、山田基之、上村武司、小寺洋、  
廣戸三佐雄、二見 (松島) 瑞子、西村裕之、稲田祐二

桐蔭学園横浜大学工学部材料工学科、桐蔭人間科学工学センター

(1996年, 2月29日 受理)

### 概要

平成7年度修士課程修了の大学院学生3名の研究を紹介する。いずれもその研究成果が論文として以下に示す国際誌に掲載されている。ここでは専門外の読者にも理解して頂くため、なるべく専門用語を用いず研究内容を解説する。21世紀はバイオサイエンスおよびバイオテクノロジー (生命工学) の時代と言われている。21世紀からの使者である3名の学生は、卒業研究を含め3カ年与えられた研究に専心、努力し研究成果をあげた。

1. Noguchi, Y. *et al.*, Inhibition of a mite protease (Df-protease) by synthetic inhibitors. *Biomed. Res.*, 15, 55-58, 1994.
2. Noguchi, Y. *et al.*, Inhibition of Df-protease-induced kinin release by synthetic inhibitors. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37, 935-941, 1995.
3. Yamada, M. *et al.*, Stabilization of trypsin by modification with comb-shaped copolymers of poly(ethylene glycol) derivative and maleic anhydride. *Biotechnol. Tech.*, 9, 105-110, 1995.
4. Uemura, T. *et al.*, Alcoholysis of  $\epsilon$ -decalactone with polyethylene glycol-modified lipase in 1,1,1-trichloroethane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 41

-45, 1994.

5. Uemura, T. *et al.*, Polyethylene glycol-modified lipase catalyzes asymmetric alcoholysis of  $\delta$ -decalactone in *n*-decanol. *Biotechnol. Lett.*, 17, 61-66, 1995.

### キーワード

ポリエチレングリコール、ダニプロテアーゼ、アレルギー、トリプシン、酵素の安定化、リパーゼ、ラクトン

### I. ダニプロテアーゼによるキニン遊離阻害剤の探索 (野口幸紀)

ハウスダスト (浮遊粉塵) が原因でおこるアレルギーは、家ダニ [コナヒョウヒダニ、*Dermatophagoides farinae* (Df)、およびヤケヒョウヒダニ、*Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp)] に含まれるタンパク質がアレルゲンとなって免疫系を活性化し、免疫グロブリンE (IgE) を産生するためと言われている。事実、DfおよびDpよりそれぞれ3種類のアレルゲン (Der f I~IIIおよびDer p I~III) が単離されている。

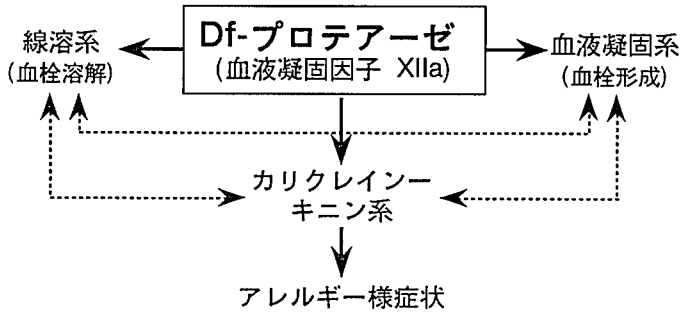


図1 Df-プロテアーゼの生体に及ぼす作用

これに対し私達の研究室では大学が設立されて以来（1988年）ダニの研究を行ない、アレルギーとは異なった経路によっても血管透過性の亢進や炎症反応等が起こり得ることを提唱してきた。それは1991年、培養ダニ（Df）抽出物よりタンパク質分解酵素（Df-プロテアーゼ）を単離したことに始まる。Df-プロテアーゼは消化酵素として有名なトリプシンに類似しているが、血液凝固系を活性化する最初の物質、血液凝固因子XIIaと似た性質を有する興味ある現象を発見した。図1は血液凝固、線溶系およびカリクレイン-キニン系の関係を示した。血液凝固因子XIIaは血液中中で凝固系を活性化しフィブリンクロット（血栓）の生成、線溶系の活性化による血栓の溶解およびプレカリクレインの活性化に伴いキニンの生成を触媒する多機能タンパク質である。キニンは血圧降下を担う生理活性ペプチドで血中の酵素系であるカリクレイン-キニン系の活性化によって生成され、血管透過性の亢進や平滑筋の収縮と言った作用を引き起こすことが知られている。不思議な事に私達の単離したDf-プロテアーゼは上述の血液凝固因子XIIaと同じ働きを示す。つまりヒト血漿中のプレカリクレインを活性化すること、またヒト血漿存在下、ラットの子宮平滑筋を収縮する事より、ヒト血漿中でキニンを遊離することを見出した。また、Df-プロテアーゼがラットの皮膚の血管透過性を亢進することからもキニンの生成を証明した。このことから、ダニアレルギー患者がダ

ニを吸入した際、鼻粘膜や気道で集束されたDf-プロテアーゼによってカリクレイン-キニン系をはじめ、生体中の種々の物質が活性化され、血管透過性の亢進や各種炎症反応を悪化させる可能性がある。また、Df-プロテアーゼが線溶系亢進（プラスミノゲン活性化）や凝固系の活性化も血液凝固因子XIIaと同じように起こす事も証明している。

そこでキニン遊離にともなうアレルギー様症状の軽減を目的として、Df-プロテアーゼの活性を抑制する阻害剤の探索を行った。ポテトインヒビターや大豆トリプシンインヒビターなど植物由来のタンパク質性阻害剤は効率よくDf-プロテアーゼを阻害するが（阻害定数  $K_i = 10^{-9} \sim 10^{-10} \text{M}$ 、 $K_i$  値の小さいほど阻害効果が高い）、微生物由来の阻害剤（アンチパイン、ロイペプチン）や合成阻害剤（ $\epsilon$ -アミノカプロン酸、メシル酸カモスタット、メシル酸ガベキサート）はタンパク質由来の阻害剤ほど強力には阻害しない（ $K_i = 10^{-7} \sim 10^{-8} \text{M}$ ）。抗急性膵炎剤でトリプシンの阻害剤であるアプロチニン（分子量 6511 のペプチド）は高い阻害活性（ $K_i = 4 \times 10^{-10} \text{M}$ ）を示すこと、またこのアプロチニンはDf-プロテアーゼによるラットの皮膚の血管透過性の亢進をほぼ化学量論的に抑制する事を発見した。従ってアプロチニンはDf-プロテアーゼ活性を阻害するに最も強力な薬剤であるが、アプロチニンはウシ膵臓より単離されたものであるためヒトにとって異物と認識され頻回投与によって種々の副作用を誘起し危

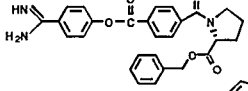
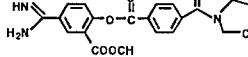
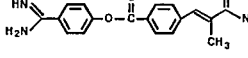
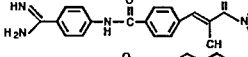
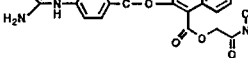
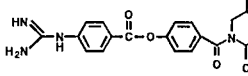
険である。

そこで、私達は Df-プロテアーゼに対する阻害剤として低分子で有効な物質を探索した。グアニジン誘導体およびアミジン誘導体 30 種類について Df-プロテアーゼの阻害効果を調べたところ、有効な物質を発見した。結果の一部を表 1 に示す。No. 1 ~ 3 の物質は Df-プロテアーゼに対する  $K_i$  値が  $10^{-9}$  M であった。そこで Df-プロテアーゼがヒト血漿より遊離するキニンを定量し、これら阻害剤のキニン遊離抑制効果を検討した。 $K_i = 9 \times 10^{-9}$  M である No. 3 の阻害剤はキニンの遊離をほぼ化学量論的に阻害し、またキニン遊離にともなう血管透過性の亢進をも有意に抑制することが明かとなった。この阻害剤は経口吸収性も比較的優れていることから新しい抗アレルギー剤としての可能性が期待される。現在、アレルギー症状を呈するラットにこの阻害剤を投与し、症状の改善を計る実験を進行中である。既にこの物質の毒性試験は終了しており、動物実験の結果次第で臨床試験、新薬としての申請も可能であると考えられる。

## II. 筒状ポリエチレングリコール誘導体による酵素 (トリプシン) の安定化 (山田基之)

生物はその生命を維持するために、種々の化学反応を体の中で行っている。化学反応と言えば、熱、アルカリ、酸、有機溶媒を用い過酷な条件下の反応を想像するが、生体内反応は常温、中性、水溶液と言う極めて緩和な条件で進行する。その主役を演じるのが酵素である。酵素はタンパク質の一種でありアミノ酸が酸-アミド結合でつながった長い鎖状の高分子であるが、その長い鎖は折れ曲がり重なり合って特定の立体構造を保持している。

表 1 Df-プロテアーゼに対する低分子阻害剤の阻害効果

No.	化学構造式	分子量	阻害定数 $K_i$ (M)
1		532	$5 \times 10^{-9}$
2		563	$6 \times 10^{-9}$
3		546	$9 \times 10^{-9}$
4		517	$1 \times 10^{-6}$
5		470	$2 \times 10^{-8}$
6		547	$3 \times 10^{-8}$

一般に酵素は生体内では安定と言われている。最近では、この酵素を生体内より取り出し、医・薬・農・工学の応用分野に利用する、あるいは必要とする酵素を遺伝子工学的手段を用いて単離し利用する傾向にある。

しかし、酵素を利用する際の欠点はその不安定さにある。この欠点を補うための研究は固定化酵素等多くの方法が報告されているが、酵素を安定化させる共通の方法は未だ見いだされていない。

そこで本研究では、合成高分子の一つであるポリエチレングリコール (PEG) に焦点を合わせ、酵素を安定化させる材料とした。私達の研究室では 1978 年より PEG を修飾剤として用い、タンパク性薬剤に結合させ著しい薬効の増強を観察している。PEG の歴史は古く 1859 年に合成されて以来、様々な産業分野で利用されている。PEG の一般式は、



で表され、その性質は無毒・無臭で水にも有機溶媒にも可溶性両親水性物質である。また、人の体内に入れても非自己と認識されない (非免疫原性) 合成高分子である。

タンパク質を PEG で修飾する際に最も大

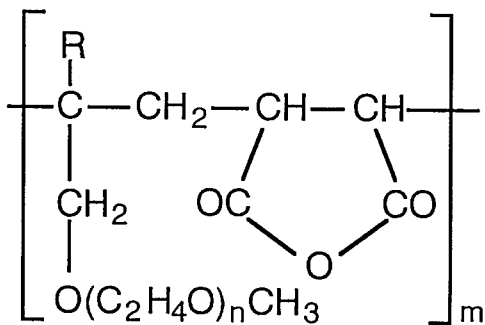


図2 活性化 PM<sub>13</sub> および活性化 PM<sub>100</sub>  
 PM<sub>13</sub> : m = 8, n = 33, R = H, MW = 13kD  
 PM<sub>100</sub> : m = 50, n = 40, R = CH<sub>3</sub>, MW = 100kD

切な事は、タンパク質の構造を壊さないようにする事であり、タンパク質と PEG を緩和な条件で反応させる必要がある。また、タンパク質分子表面に露出しているリジンのアミノ基 (-NH<sub>2</sub>) に PEG を結合させると修飾効率が高いことから、図2に示すようなポリエチレングリコール誘導体を修飾剤とした。この修飾剤の特徴は PEG と無水マレイン酸の共重合体 (活性化 PM) で櫛状の構造を持ち、櫛の峯に相当する部分にタンパク質表面にあるアミノ基と結合する反応基である酸無水物

が複数存在する。また、櫛の峯より垂れ下がった PEG が、タンパク質分子表面のアミノ酸残基と相互作用 (疎水結合、水素結合など) し、タンパク質分子の表面を PM 分子で覆うためその立体構造を保持できると考えられる。そこで消化酵素として知られるトリプシンをそれら活性化 PM で修飾する事により、熱・尿素など変性条件下における安定性を調べた (図3)。

本実験で使用したトリプシンは、牛の膵臓由来の物で、分子量は 23, 990、N 末端を含めて 16 個のアミノ基が存在している。また、塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニンのカルボキシル基側のペプチド結合を切断するという基質特異性を持っている。

活性化 PM<sub>13</sub> 及び活性化 PM<sub>100</sub> は図2にも示したように、それぞれ分子量 1.3 万と 10 万を有する。また、主鎖の繰り返し、即ち m に相当する部分が活性化 PM<sub>100</sub> の方が活性化 PM<sub>13</sub> よりも約 6 倍長い。それら活性化 PM<sub>13</sub> 及び活性化 PM<sub>100</sub> で修飾されたトリプシンは、未修飾トリプシンに比べ高い酵素活性が残っている。また、活性化 PM と同じように

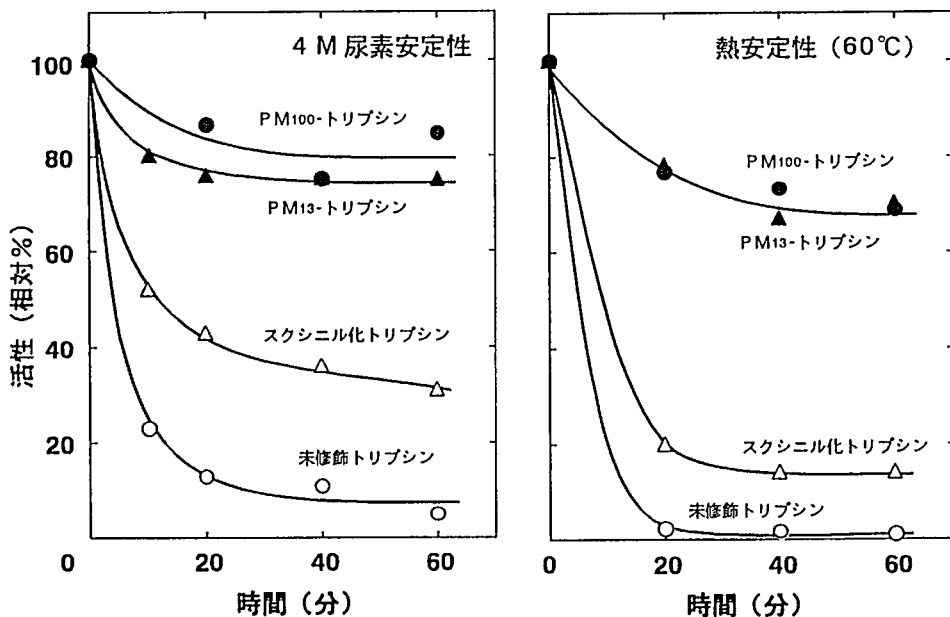


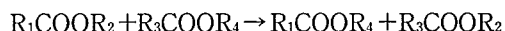
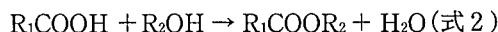
図3 PM 修飾によるトリプシンの熱および尿素に対する安定性

タンパク質中のアミノ基と反応する低分子のものとして無水コハク酸を用いてトリプシンを修飾 (スクシニル化) しPM-トリプシンと比較したところ、やはりPM修飾されたトリプシンの方がその安定性が優れていることが観察された。

以上の結果は、櫛状ポリエチレングリコール誘導体がタンパク質の立体構造の保持に有効であることを示唆するものであり、活性化PMで修飾する事で様々な酵素の欠点を補う事が出来れば、酵素の応用範囲がさらに広がる事と期待している。

### III. ポリエチレングリコール修飾リパーゼ (PEG-リパーゼ) を用いた、ラクトンの不斉アルコール分解 (上村武司)

リパーゼは、油脂 (トリグリセリド) を脂肪酸とグリセリンとに加水分解する酵素である。このリパーゼを前述のポリエチレングリコール (PEG) で修飾すると有機溶媒中での反応も可能となるため、元来の機能であるエステル加水分解 (式1) に加えて、それらの逆反応であるエステル合成反応 (式2) やエステル交換反応 (式3) をも触媒するようになる。



リパーゼは元々比較的基質をえり好みしない酵素であるため、PEG修飾によって工業用触媒としての幅広い利用が期待できる。

私は、PEG-リパーゼを用いた応用研究の一環として、 $\delta$ -デカラクトンの不斉アルコール分解を試みた。 $\delta$ -デカラクトンは10個(デカ)の炭素を有する環状化合物(6員環)であり、果実や花などに香気成分として含まれている。これを有機化学的手法で合成したものが主に食品香料として広く用いられているが、その構造は天然物に含まれている $\delta$ -

デカラクトンとは同一ではない。図4は、構造式は同じでも立体配座の違う二種類の $\delta$ -デカラクトンが存在することを示している。  
\*印の炭素が不斉炭素であるため、(R)-体と(S)-体が存在する。これらの違いは右手と左手の関係、あるいは自分の顔と鏡に映った顔の違いに相当し、互いに鏡像の関係にある。実際、合成品の $\delta$ -デカラクトンは(R)-体と(S)-体を50:50の割合で含む混合物(ラセミ体)であり、これらをそれぞれ(R)-体と(S)-体とに分離することは困難である。これに対して天然物に含まれているラクトンは、表2に示したようにコンデンスミルク、ココナッツミルク、桃に於いては $\delta$ -デカラクトンの(R)-体が(S)-体と比べ圧倒的に多く存在している。このように、天然のラクトンの香気を作り出すためには、合成品のラクトン(ラセミ体)を(R)-体と(S)-体に分割する必要がある。

私達は $\delta$ -デカラクトンよりもラクトン環の炭素が一つ多い $\epsilon$ -デカラクトンのアルコール分解を1, 1, 1-トリクロロエタン中でPEG-リパーゼを用いて行ったところ、(R)-体のみがアルコール分解して(S)

図4  $\delta$ -デカラクトンの光学異性体の構造

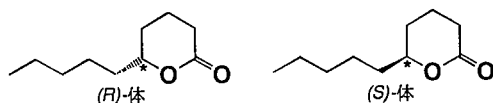


表2 天然物に含まれる $\delta$ -デカラクトンの光学異性体

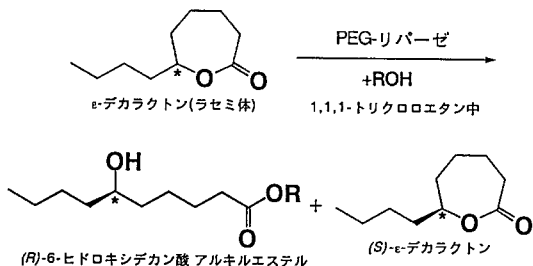
天然物名	$\delta$ -デカラクトンの光学異性体の存在比	
	(R)	(S)
コンデンスミルク	92	8
ココナッツミルク	91	9
桃(白鷗)	98	2

一体は全く分解しない現象を発見した（図5 a）。しかしこの反応は極めて反応速度が小さく、また人体にとって有害な溶剤、1, 1, 1-トリクロロエタンを溶媒として用いている。これらの問題を解決するために、有害な溶媒を用いずに基質であるアルコールの中で反応を行ったところ（図5 b）、PEG-リパーゼは基質であるアルコール中でも酵素活性を有し、反応速度も向上した（図6）。100% (R)-一体のみが反応したわけではないが、PEG-リパーゼは高い特異性で (R)-一体の反応を触媒した。また実験の結果、長い炭素鎖を持つアルコール中では反応が速やかに進行することがわかった。

これらの反応によってラセミ体を基質とすると、(S)-一体のラクトンが未反応物より得られ、またアルコール分解物を再環化すれば (R)-一体のラクトンが得られる。ラクトンは、香料素材としてだけでなく、たとえば抗生物質としても私達の生活に深く関わっている。本研究は、PEG-リパーゼがそれらの合成にも有効であることを示唆するものである。

図5

a 1,1,1-トリクロロエタン中における  
ε-デカラクトンの不斉アルコール分解



b アルコール中におけるδ-デカラクトンの  
不斉アルコール分解

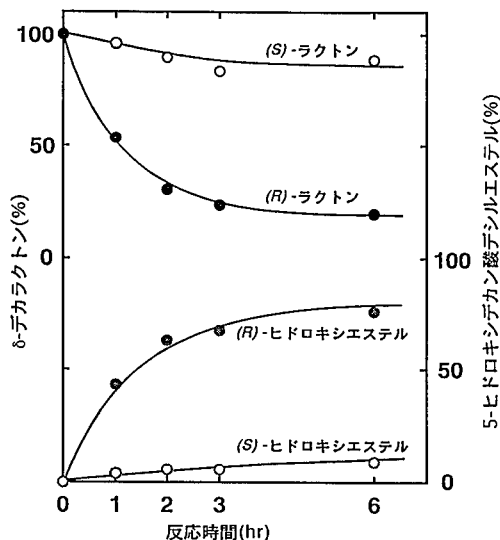
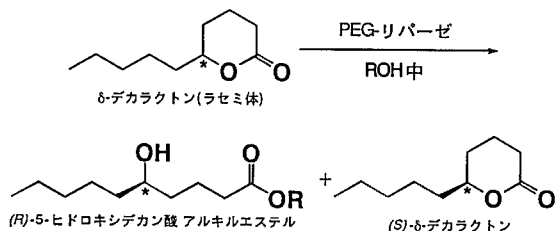


図6 δ-デカラクトンのアルコール分解のタイムコース (n-デカノール中、反応温度 50°C)

## おわりに

私達第三期生が卒業研究をはじめた当時は、ただ与えられた作業を、先生方や先輩方によって既に完成されていたプロトコールに従ってこなしているにすぎなかった（勿論それも非常に重要なことだが）。今自信を持って言えることは、三年間の研究生活は間違いなく私達を（あらゆる意味において）成長させたということである。私達の経験したものの、例えばある研究データを国際誌等に公表できる形にまで高めるプロセスは、これからの人生で、一つの仕事を完成させなければならない時に必ず生きてくるように思う。私達にその機会を与えて下さった先生方に感謝したい。（野口幸紀、山田基之、上村武司）