

バイオ物質の医学・工学への利用

Application of bioconjugate materials to biomedical and biotechnological processes

関根太一, 石井麻子, 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

(1995年, 2月1日 受領)

概要

本稿は平成6年度修士課程終了の大学院学生(関根及び石井)の行った研究成果を中心に述べる。その1つはタンパク質性薬剤の薬効を増強させることを目的とした研究、他の1つは天然色素の単離と発色のからくりを明らかにしたものである。両者の研究はいずれも「バイオ物質の医学・工学への利用を目指した基礎的研究」で、学術論文として外国誌に掲載されている。

1. T. Sekine et al. Stabilization of L-asparaginase modified with comb-shaped poly(ethylene glycol) derivatives, *in vivo* and *in vitro*. *Bioconjugate Chem.*, 5, 283-286 (1994)
2. A. Ishii et al. Simple isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* and phycocyanobilin-protein inter-action. *J. Mar. Biotech.*, 1, 185-188 (1994)

キーワード

アスパラギナーゼ、ポリエチレングリコール、フィコシアニン、天然色素、バイオハイブリッド

1. ポリエチレングリコール誘導体によるL-アスパラギナーゼの化学修飾 (関根 太一)

L-アスパラギナーゼは微生物、動物及び植物中に広く存在する酵素で、アミノ酸の1つであるアスパラギンをアスパラギン酸と水に分解する。この酵素は、白血病あるいはリンパ肉腫に効果を示し、抗腫瘍剤として用いられているが、大腸菌より単離されたものであるため、人にとって非自己と認識され、アナフィラキシーショックを含む種々の副作用が現れる。本研究ではL-アスパラギナーゼに非免疫性の高分子化合物であるポリエチレングリコール誘導体を結合させ、副作用の少ない新しいタイプの医薬品の開発を行った。大腸菌由来のL-アスパラギナーゼは分子量13.6万、4つの同一サブユニットから成り、1分子中に92個のアミノ基を有する。いっぽう、修飾剤であるポリエチレングリコール誘導体はポリエチレングリコールと無水マレイン酸の共重合体で図1-1の様な櫛状の構造を有し、平均分子量1.3万(活性化PM₁₃)と10万(活性化PM₁₀₀)の2種類を用いた。こ

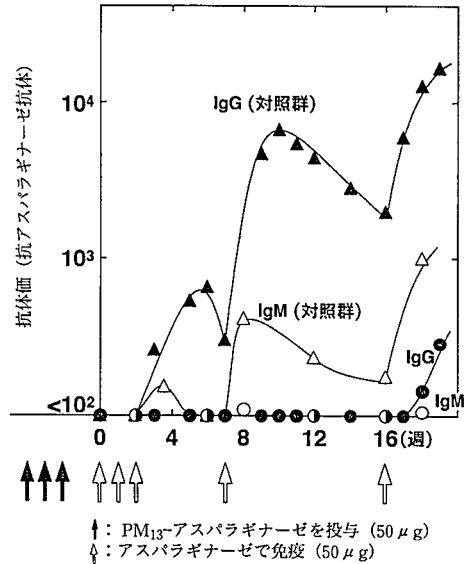
Taichi Sekine, Asako Ishii, Yoh Kodera, Misao Hiroto, Ayako Matsushima, Hiroyuki Nishimura and Yuji Inada; Department of Materials Science and Technology, Faculty of Engineering, Toin University of Yokohama, Toin Human Science and Technology Center.

しPM₁₀₀-アスパラギナーゼでは、著しく体内停滞時間が延長し、投与後27日までその活性を保持し(●)、その間血中アスパラギンは検出されない(○)。以上の結果を血中でのアスパラギナーゼ半減期と比較すると図1-2bに示す様に未修飾アスパラギナーゼの1.5時間に対しPM₁₀₀-アスパラギナーゼは50時間と30倍以上もの延長がみられる。この様にアスパラギナーゼを活性化PMで化学修飾することにより体内停滞時間が大幅に延長することから腫瘍細胞に対する効果(抗腫瘍活性)も増加すると期待される。

PM₁₃-アスパラギナーゼによる抗腫瘍活性の増強: マウス(1群6匹)の腹腔に腫瘍細胞(L5178Y)を移植し、その翌日未修飾アスパラギナーゼ及びPM₁₃-アスパラギナーゼを投与(0.5-8.0単位/マウス)し、マウスの生存日数を測定した。その結果を表1-1に示す。未処置対照群は20日以内にすべて死亡し、平均生存日数は、19.1日である。未修飾アスパラギナーゼの場合には、8.0単位投与した際に、僅かに生存日数の延長がみられるが8.0単位未満では、未処置のものとの差がない。これに対しPM₁₃-アスパラギナーゼでは0.5単位で1匹、2.0単位で4匹、8.0単位では5匹が60日間以上生存する。60日以上降生存しているマウスには腫瘍細胞の存在は認められない。PM₁₃-アスパラギナーゼ8.0単位投与により平均生存日数は56.0日(60日で観察中止)となり未修飾アスパラギナーゼに比べ、著しい抗腫瘍活性の増加がみられる。

PM₁₃-アスパラギナーゼによる免疫寛容の誘導: 免疫寛容とは通常ならば免疫応答を引き起こす等の物質を投与しても免疫応答が起らない現象をいう。大腸菌由来のL-アスパラギナーゼは人にとっては非自己の物質であるため人に投与すれば当然免疫系

図1-3 PM₁₃-アスパラギナーゼ前投与後、アスパラギナーゼで免疫したマウスの抗体価



が刺激され、抗体が産生される。本研究では、アスパラギナーゼを投与する前にPM₁₃-アスパラギナーゼを投与しておけば、アスパラギナーゼに対する抗体は産生されない(免疫寛容の誘導)興味ある現象を発見した。図1-3はその結果を示したものである。まず、未修飾アスパラギナーゼを投与する2、3、及び4週間前に50 μ gのPM₁₃-アスパラギナーゼをマウスに前投与する。その後0、1、2、7及び16週目に未修飾アスパラギナーゼを投与し、アスパラギナーゼに対して産生さ

表1-1 未修飾アスパラギナーゼ及びPM₁₃-アスパラギナーゼの抗腫瘍活性 a)

酵素	投与量 (単位/マウス)	生存日数 (日×マウス)	平均 (日)	P ^{b)}
未処置対照群	-	17, 18, 19x3, 20x4	19.1	
未修飾 アスパラギナーゼ	0.5	15x2, 18, 20, 21x2	18.3	>0.05 ^{c)}
	2.0	15, 16, 20x3, 23	19.0	>0.05 ^{c)}
	8.0	17, 19, 22, 23, 25, 28	22.3	<0.01 ^{c)}
PM ₁₃ - アスパラギナーゼ	0.5	20, 24, 26, 36, 59, 60+ ^{e)}	37.5+	<0.01 ^{d)}
	2.0	25, 31, 60+ ^{e)} x4	49.3+	<0.01 ^{d)}
	8.0	36, 60+ ^{e)} x5	56.0+	<0.01 ^{d)}

a) 未処置対照群は1群9匹、それ以外は6匹のマウスを使用。
 b) Student's t-test による。
 c) 未処置対照群との比較。
 d) 対応する未修飾アスパラギナーゼ投与群との比較。
 e) 60日で観察中止。

れる抗体（抗アスパラギナーゼ IgG抗体及び IgM抗体）量を測定した。PM₁₃-アスパラギナーゼを前投与していない対照群では、図に示すようにアスパラギナーゼの投与によって抗アスパラギナーゼ IgG抗体（▲）ならびに IgM抗体（△）の産生が観察される。それに対しPM₁₃-アスパラギナーゼ前投与の場合、17週目まで IgG抗体（●）の産生も IgM抗体（○）の産生も観察されない。またPM₁₃-アスパラギナーゼを投与した後アスパラギナーゼとは別のタンパク質である卵白アルブミンを投与すると卵白アルブミンに対する抗体は正常に産生される。従ってこの免疫寛容現象はアスパラギナーゼに特異的な現象であると考えられる。つまりPM₁₃-アスパラギナーゼの前投与は、アスパラギナーゼ特異的に抗体産生を抑制する。免疫寛容の誘導は、現在でも不明な点が多くその機構を解明し一般化することができれば、臓器移植あるいは遺伝子治療の分野への利用が期待される。

おわりに：以上のように活性化PMでアスパラギナーゼを化学修飾することで抗原性の消失、体内停滞時間の延長、抗腫瘍活性の増加、さらに免疫寛容の誘導などがみられる。この発見は、人にとって非自己のタンパク質を医薬品として用いる際の新しいタイプのタンパク質性薬剤として次世代に開花すると信じている。

2. ラン藻よりフィコシアニンの単離およびその性質 (石井 麻子)

自然界には多種多様な天然色素が存在している。鮮やかなブルーを呈するフィコシアニンもその一つである。この色素は、25億年前地球上に生き物が誕生して以来、今日まで生存する数少ない生物であるラン藻中に存在する。原始ラン藻の光合成作用によって地球上に酸素が放出され、そのお蔭で地球上に動物が現れたと考えられている。ラン藻の中に存在する色素の主なものは、青色のフィコシア

ニン、黄～赤色のカロチノイドおよび緑色のクロロフィルである。

一般に天然色素は生体内に於いてはかなり安定であるが、それらの色素を生体内より取り出すと極めて不安定となり、光あるいは熱により速やかに褪色する傾向がある。私達は「天然色素の安定化」のテーマを掲げ、まずラン藻より色素の簡単な単離法を確立するとともに、フィコシアニンの発色のメカニズムについて研究を行い興味ある結果を得た。

ラン藻 (*Spirulina platensis*) に含まれるブルーの色素はフィコシアニンといわれる色素タンパク質である。その吸収スペクトルは620nmに吸収極大を持ち、フィコシアノビルリン (図2-1) という発色団がタンパク質のシステイン部分とチオエーテル結合した構造をとる。このタンパク質は α 、 β の二種のペプチド鎖から成り、分子量は α 鎖が2.05万、 β 鎖が2.35万である。通常は($\alpha\beta$)の単量体が3つ会合した3量体($\alpha\beta$)₃の状態 (図2-

図2-1 フィコシアノビルリンの構造 (タンパク質とチオエーテル結合)

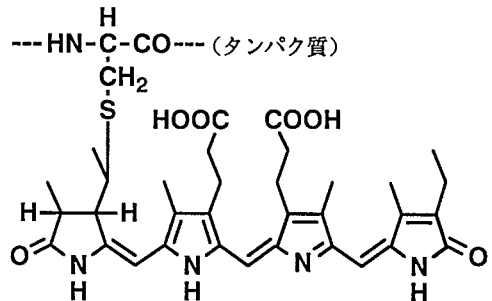
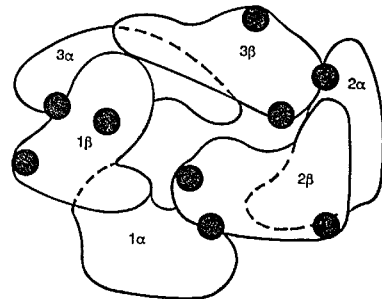


図2-2 フィコシアニン ($\alpha\beta$)₃の構造



α : 20.5kD、発色団1
 β : 23.5kD、発色団2

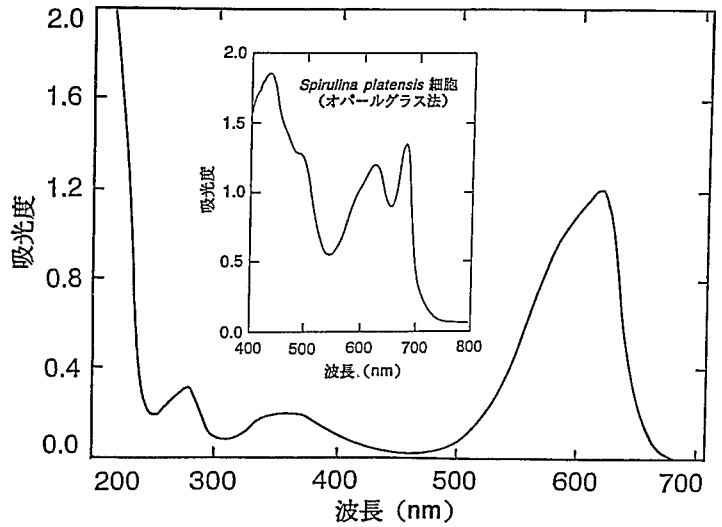
2)にあるが、さらにそれが2つ会合した6量体($\alpha\beta$)₆として存在することもある。

まずフィコシアニンをラン藻 (*Spirulina platensis*) から単離する方法について述べる。

フィコシアニンの単離法:
フィコシアニンは色素タンパク質であるため、タンパク質の精製に用いる基本的な操作により単離した。その方法は大きく3段階から成る。まず、ラン藻にリン酸緩衝液を加え静置すると、フィコシアニンが細胞より緩衝液に抽出される。

攪拌すると細胞が破壊され不純物が混入する。次に等電点沈澱、さらに DEAE 樹脂を通すことにより精製を行う。図2-3の挿入スペクトルはラン藻の吸収スペクトルをオパールグラス法で測定したものであり、精製されたフィコシアニンの吸収スペクトルをその下に示した。620nmの吸収はフィコシアニン、280nmがタンパク質、500nmがカロチノイド、680nmがクロロフィルの吸収である。ラン藻には以上の3つの色素とタンパク質が含まれるが、精製フィコシアニンではブルーの620nmの吸収が主であり、280nmにタンパク質の吸収も含まれるが他の色素は殆ど含まれていない。表2-1は精製の各段階における精製度を吸光度の比で示したものである。E₆₂₀/E₆₈₀の値は精製が進むに従って上昇し0.92より111の値となり100倍以上となる。すなわちクロロフィルは殆どフィコシアニンに含まれていないことを示している。一方E₆₂₀/E₂₈₀の値は DEAE 処理後3.97の値となり、文献値 (E₆₂₀/E₂₈₀≥4) からも、このような簡単な操作にもかかわらず純度の高いフィコシアニンが得られたことがわかる。また、収率は12.

図2-3 フィコシアニンの吸収スペクトル



4%である。フィコシアニン以外の色素、クロロフィルおよびカロチノイドについてもフィコシアニン抽出後の残滓より簡単な方法で単離できる。

フィコシアニンの発色とタンパク質の構造:
フィコシアニンは色素タンパク質である。フィコシアニンの発色とタンパク質との関係を調べるため、タンパク質を変性 (pH、消化、光、および尿素) させ、フィコシアニン色素の吸収極大波長である620nmでの吸光度を測定する。

表2-1 ラン藻 (*Spirulina platensis*) よりフィコシアニンの単離方法

操作	$\frac{E_{620}}{E_{280}}$	$\frac{E_{620}}{E_{500}}$	$\frac{E_{620}}{E_{680}}$	収率 (%)
<i>Spirulina</i> 細胞懸濁液		1.10*	0.92*	100
抽出 (リン酸緩衝液)	0.48	4.07	4.47	77.2
等電点沈澱	1.40	9.50	16.2	26.8
DEAE 樹脂	3.97	17.8	111	12.4

*オパールグラス法

E₆₂₀: フィコシアニンの吸収極大波長、620 nmにおける吸光度

E₂₈₀: タンパク質の吸収極大波長、280 nmにおける吸光度

E₅₀₀: カロチノイドの500 nmにおける吸光度

E₆₈₀: クロロフィルの680 nmにおける吸光度

図2-4 フィコシアニンのpH-依存性および安定性

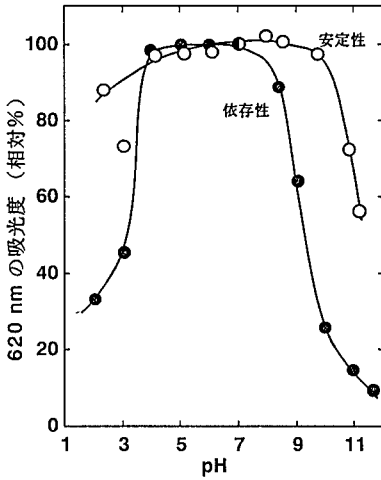
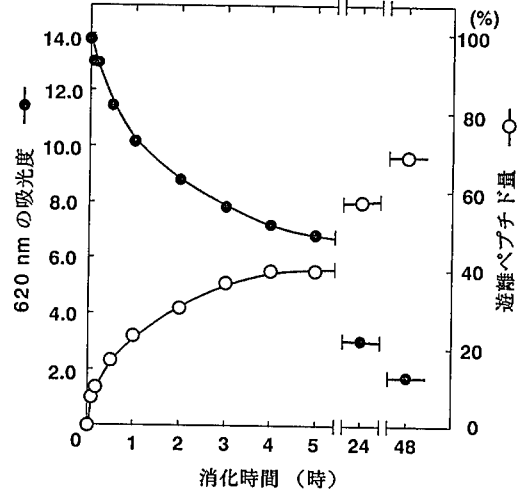


図2-5 フィコシアニンのトリプシン消化によるペプチド遊離と吸光度変化

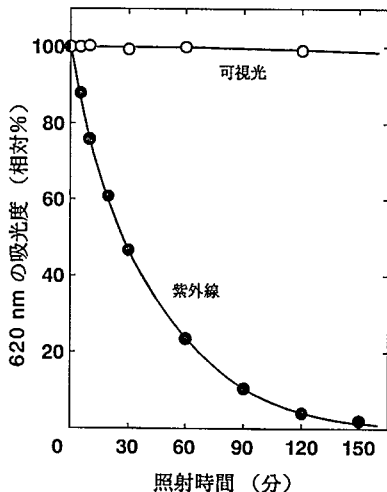


(1) フィコシアニン水溶液のpHの変化による発色と安定性 (pH-依存性・安定性) (図2-4)

依存性：フィコシアニンは中性付近では安定であるが、強い酸およびアルカリ性では吸光度の低下が見られる。

安定性：フィコシアニン溶液を一定のpHに一定時間放置し、その後pHを中性 (pH 7) に戻した際の吸光度の相対%を示す。酸性・アルカリ性にした際の吸光度の減少が復元する。(特にpH4-10の間ではほぼ100%復元する。)

図2-6 フィコシアニンの可視光および紫外線による吸光度変化



(2) フィコシアニンのトリプシン消化 (図2-5)

フィコシアニンの構成タンパク質を加水分解酵素トリプシンで消化すると、時間の経過と共にペプチド量は増加し、それに伴いフィコシアニンの吸光度は低下する。

(3) フィコシアニンに対する光照射の影響 (図2-6)

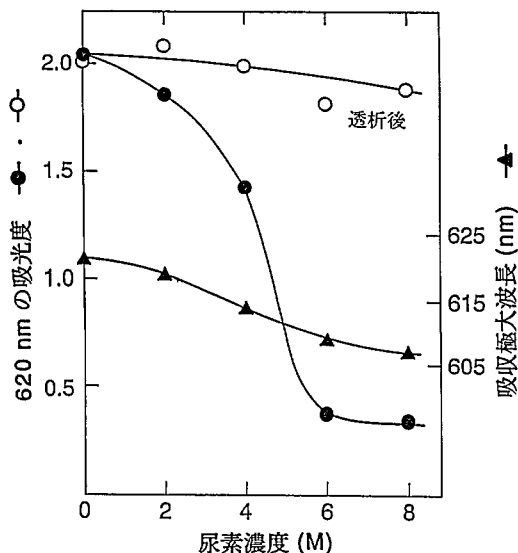
フィコシアニン溶液に可視光 (白熱球、60W、10cmの距離から) を照射しても吸光度の低下はほとんど見られないが、紫外線 (254nm、8W×5、15cmの距離から) を照射すると、照射時間の経過に伴い顕著な吸光度の低下が見られ、最終的に無色透明となる。

(4) フィコシアニンに対する尿素の影響 (図2-7)

フィコシアニン溶液にタンパク質の高次構造を壊す尿素を加えると、尿素の濃度の増加に伴いフィコシアニンの吸光度は低下し、さらに吸収極大波長も短波長側へと移行する。しかし、尿素を透析により除くと、ほぼ100%吸光度は復元し、また吸収極大波長も620nmに復元する。

以上の結果から、フィコシアニンはタンパク質の立体構造が壊れると、著しく

図2-7 フィコシアニンに対する尿素の影響



褪色する。しかし、タンパク質の破壊された高次構造が元の状態に戻ると発色も復元することから、フィコシアニンの発色にはタンパク質の高次構造が深く関与していることがわかる。また、タンパク質が壊れても発色団（フィコシアノピリン）により発色するが、元の約20%に低下する。紫外線照射では発色団そのものが破壊されるようである。

おわりに：現在、フィコシアニンの安定化を目指す研究を続けている。また、フィコシアニンが強い蛍光を発することより、新しい蛍光指示薬の開発についても研究中である。