

荷電性ポリアミノ酸の添加による L-乳酸脱水素酵素の凝集抑制

SATテクノロジー・ショーケース2024

■ はじめに

酵素は、常温常圧の温和な環境で、化学反応を特異的かつ高効率に触媒するタンパク質であり、産業的利用価値が高い。しかし、酵素は外部環境の変化で容易に不安定化し、活性を失ってしまう。酵素の安定性を向上する技術を確立できれば、酵素の産業応用を拡大することが可能となる。遺伝子組換え技術や化学修飾など、酵素自体を改良する方法を用いると、高い安定性を達成できるが、これらの方法は多くの工程や高い専門知識を必要とする。したがって、酵素の産業応用のために、簡便で汎用性の高い安定化技術が必要である。このような背景のもと、我々は、添加剤を酵素溶液に共存させるだけで、酸性で不安定なオリゴマー酵素を安定化させることに成功した^[1]。特に、カチオン性ポリアミノ酸は、その単量体アミノ酸と比較して4桁程度低い濃度で凝集抑制効果を発揮した。本会では、荷電性ポリアミノ酸が持つ柔軟な構造配置という特徴に着目し、凝集抑制メカニズムについて議論したい (図1)。

■ 活動内容

1. L-乳酸脱水素酵素

L-乳酸脱水素酵素 (LDH) は塩基性の等電点 (pI 8.5) を持つ、分子量140 kDaの4量体酵素である。LDHはピルビン酸とL-乳酸との可逆な反応を触媒し、キラリティーの揃ったL-乳酸生成やバイオセンサーへの応用が期待される。多量体酵素は、非共有結合によって会合した複数のサブユニットから構成される。多量体酵素の不安定化は、主にサブユニットへの解離から開始される。LDHは酸性pH (pH < 6.0) でサブユニットに解離し、数十nmの凝集体を形成し、不活性化する。本研究では、酸性で不安定化するLDHをモデル酵素として、荷電性ポリアミノ酸による凝集抑制効果を調査した。

2. 荷電性ポリアミノ酸

荷電性ポリアミノ酸として、カチオン性のポリ-L-リシン (PolyK)、ポリ-L-アルギニン (PolyR)、アニオン性のポリ-L-グルタミン酸 (PolyE) を用いた。PolyEを添加すると、LDHと静電的に相互作用することで数十 μ mの凝集体を形成し、不活性化した。反対に、PolyKあるいはPolyRを添加すると、pH 6.0でもLDHの粒子径は中性条件と同様に保たれ、凝集にともなう失活も生じなかった。pH 7.0における活性の50%を維持するために必要な濃度をMC₅₀とすると、PolyKとPolyRのMC₅₀は単量体換算で数 μ M、ポリマー換算

で数nMとなった。単量体のリシンやアルギニンのMC₅₀は約10 mMであり、4桁高い濃度の添加が必要であることがわかった。また、球状タンパク質であるリゾチーム (pI 11.4, 分子量14.3 kDa) のMC₅₀は数百nMであり、ポリアミノ酸と比較して2桁高い濃度の添加が必要になることがわかった。これらの結果から、荷電性ポリアミノ酸の柔軟な構造は、その単量体や構造化したタンパク質と比較して、効果的に酵素の凝集を抑制できることが示唆された。

3. 凝集抑制メカニズム

LDHとPolyKとの間の相互作用を、静電遮蔽効果の影響とLDHのゼータ電位の計測によって調査した。まず、pH 5.0において、PolyK存在下でイオン強度を増加させると、PolyKによるLDHの活性維持効果がなくなった。このことから、PolyKはLDHと静電的に相互作用していることが示唆された。次に、LDHのゼータ電位は、PolyKの添加濃度の増加に伴って増加した。また、鎖長の異なる3種のPolyKを用いると、鎖長の増加に伴って、LDHのゼータ電位は増加した。これらの結果から、PolyKはLDH近傍に存在し、LDHに正の電荷を付与することで、LDH分子間の反発を促していることが示唆された。

■ 関連情報等(特許関係、施設)

[1] In preparation

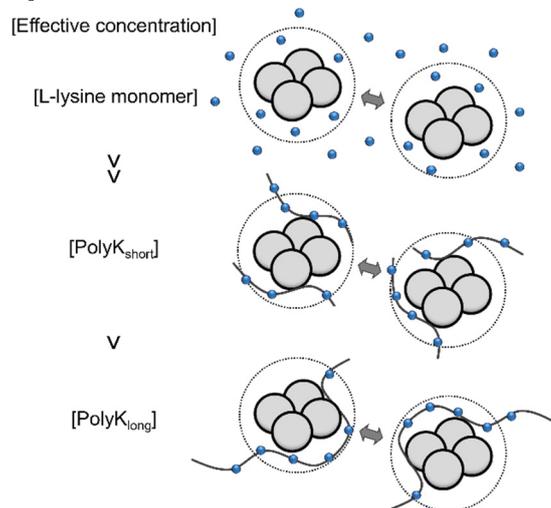


図1. 荷電性ポリアミノ酸による LDH の凝集抑制機構

代表発表者 吉田 桃也(よしだ とうや)
所属 筑波大学大学院 理工情報生命学術院
数理工学物質科学研究群 博士前期課程 1年
問合せ先 〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1
TEL : 029-853-5621 FAX : 029-853-6305
E-mail : yoshida.toya.ut@gmail.com

■キーワード: (1) 酵素
(2) 荷電性ポリアミノ酸
(3) 凝集抑制

■共同研究者: 白木 賢太郎
(筑波大学・数理工学物質科学研究群)
南木 創
(産総研・健康医工学研究部門)
浦 朋人
(筑波大学・数理工学物質科学研究群)
榎原 菜々子
(筑波大学・数理工学物質科学研究群)