

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06602

研究課題名(和文) タンパク質医薬品の位置特異的修飾を触媒する高分子-酵素コンジュゲートの開発

研究課題名(英文) Synthesis of polymer-enzyme conjugates for site-specific modification of therapeutic proteins

研究代表者

笹井 泰志 (Sasai, Yasushi)

岐阜医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60336633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：vinylmethylether-maleic acid copolymer(VEMA)の側鎖に上限臨界溶液温度(UCST)をもつポリスルホベタインメタクリレート(PSBMA)を伸長させたグラフト高分子を合成し、その温度応答性におけるPSBMA側鎖のグラフト密度や鎖長の影響を明らかにした。適当な条件で合成されたPSBMA-g-VEMAでは、UCST未満でVEMACを外層する高分子ミセル様粒子の形成が確認された。本ミセル様粒子表面に固定化したトリプシンでは、UCSTより高い温度の溶解状態で触媒活性を示し、系の冷却により不溶性粒子として回収可能であった。また、再利用も可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した温度応答性グラフトコポリマーは、酵素の安定性に適した低温環境では親水性のvinylmethylether-maleic acid copolymer(VEMA)を表面とする100-200 nmの高分子ミセル様粒子を形成し、多くの酵素活性に適した37℃付近では均一な溶液状態となる。このような温度に応答する溶解特性を持つグラフトコポリマーで修飾された酵素は、反応効率に優れる均一系での使用が可能であり、また、酵素活性の低下を抑制する低温では不溶性粒子として反応系から回収可能である。本研究成果は高価、希少な有用酵素を有効活用するための酵素機能化法として有益な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：We synthesized a thermoresponsive graft-copolymer consisting of vinylmethylether-maleic acid copolymer(VEMA) backbone and UCST-type thermoresponsive poly(sulfobetaine methacrylate)(PSBMA) side chains. The UCST of the graft copolymers was influenced by the grafting and polymerization degree of the PSBMA side chains. Below the UCST, the graft-copolymers formed micelle-like aggregates with a PSBMA core and a VEMAC outer layer. Trypsin as a model enzyme was successfully immobilized onto the aggregates via a multi-point attachment with VEMA. The resultant trypsin-immobilized particles are then in solution for use above the UCST. Furthermore, by lowering the solution temperature below the UCST, the conjugates can be easily collected from the reaction mixture as precipitates to use again.

研究分野：高分子バイオマテリアル

キーワード：高分子-酵素複合体 バイオコンジュゲーション 温度応答性高分子 原子移動ラジカル重合

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質医薬品の体内動態改善にポリエチレングリコール(PEG)によるタンパク質の修飾(PEG化)の有効性が明らかにされている。一方、タンパク質には複数のPEG結合部位があり、現状、非特異的なPEG化が実施されている。これは、タンパク質医薬品の物性および活性の不均一性の原因となる。しかしながら、位置特異的および効率的なタンパク質のPEG化は、現状、汎用的な方法が確立されていない。

タンパク質の位置特異的な修飾方法の一つとして、酵素の基質特異性を活用した方法がある。たとえば、transglutaminaseは、タンパク質のGlnのアミノカルボニル基とLysのアミノ基を連結する架橋反応を触媒するが、特に、微生物由来のTGase (mTGase) は、タンパク質中のLysに限らず、様々な一級アミン誘導体との反応も触媒するので、末端にアミノ基を導入したPEGを用いて、タンパク質のPEG化に利用可能である。一方、酵素を利用したタンパク質のPEG化においても、タンパク質に複数の酵素の認識部位がある場合、均一な修飾が困難となる場合がある。多くの有用タンパク質が医薬品候補物質として見出されている中、高分子による修飾は、その血中安定性および保存安定性の改善に有益である。そして、その活性発現や品質管理の観点からタンパク質の効率的で位置特異的な高分子修飾法の開発が望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究は、元来基質特異性の高い酵素に高分子修飾を施すことで、高分子により基質の酵素活性部位へのアクセシビリティを制御し、効率的かつ位置特異的なタンパク質のPEG化法を開発するための基盤研究である。その実現のため、本研究では、特に酵素の修飾に用いる機能性高分子の開発に焦点を置いた。酵素修飾用の機能性高分子のデザインコンセプトは次の通りである。

酵素の活性への影響を最小限にする

酵素の安定性を改善できる

酵素を反応系から回収可能とする

修飾高分子により基質の酵素活性部位へのアクセシビリティが制御できる

および を達成することを目的に、酵素の安定性改善に実績のある vinylmethylether-maleic acid copolymer (VEMA)を基幹高分子として選択し、酵素との結合点に利用した。また、を達成するために、VEMA側鎖に上限臨界溶液温度(UCST)をもち、かつ、溶液状態では、高い水溶性を示し生体適合性にも優れる poly(sulfobetaine methacrylate)をVEMA側鎖に導入したグラフト共重合体とすることで、酵素の至適温度では、溶液状態であり、使用後、反応系をUCST未満の低温とすることで、不溶化した高分子とともに酵素を回収できる系を考えた。そして、については、グラフトコポリマーを合成する際、原子移動ラジカル重合(ATRP)法を用いることで、VEMAから鎖長を制御しつつPSBMAを伸長させることとした。実施した高分子の合成スキームを図1に示す。

当初、mTGaseに上記の高分子修飾を施し、タンパク質医薬品のPEG化適用について検討する予定であったが、研究期間内に十分な結果を得ることが出来なかったため、モデル酵素として、トリプシンを本高分子で修飾した際の機能性付与について報告する。

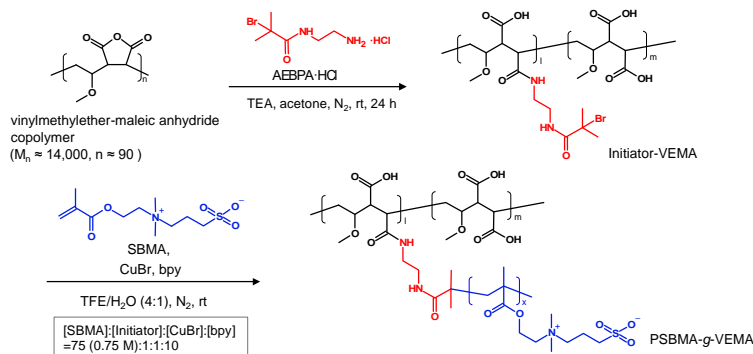


図1 PSBMA-g-VEMAの合成

### 3. 研究の方法

#### (1) VEMA側鎖へのPSBMAの導入(PSBMA-g-VEMAの合成)(図1)

市販品の vinylmethylether-maleic anhydride copolymer は、無水マレイン酸の一部が加水分解しているため、 $100^\circ C$ にて減圧乾燥し、赤外線吸収スペクトルにより、カルボキシル基が脱水縮合したことを確認して用いた。

VEMA側鎖に導入する ATRP 開始剤となる N-(2-Aminoethyl)-2-bromo-2-methylpropanamide (AEBPA) は、Liu らの報告に従って合成した。AEBPA 修飾 VEMA (Initiator-VEMA) は、triethylamine 存在下アセトン中、VEMA と AEBPA を種々の比率で反応させることで、様々な AEBPA 導入率を持つ Initiator-VEMA を合成した。なお、AEBPA 導入率は $^1H$ -NMR により決定した。

Initiator-VEMA を開始剤として、図1の条件にて[2-(Methacryloyloxy)ethyl] dimethyl-(3-sulfo-propyl) ammonium hydroxide (SBMA)の ATRP を実施し、PSBMA-g-VEMA を合成した。なお、

PSBMA グラフト鎖長は ATRP 時間により制御した。また、VEMA 側鎖での PSBMA の平均重合度は、<sup>1</sup>H-NMR により決定した。

#### (2) PSBMA-g-VEMA の物性評価

50 mM リン酸緩衝液 (pH 8) を用い、10 mg/mL の PSBMA-g-VEMA 溶液を調製し、種々の温度での 500 nm の光透過性から、PSBMA-g-VEMA の上限臨界溶液温度 (UCST) を決定した。

UCST を示した PSBMA-g-VEMA については、Zetasizer nano ZS (malvern Panalytical 社) を用い、5 μm でのコロイド粒子の粒度分布および表面電荷を測定した。

#### (3) PSBMA-g-VEMA 修飾トリプシンの合成

UCST を示した PSBMA-g-VEMA を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8) に溶解させ、4 ℃ に冷却してコロイド溶液とした。コロイド粒子表面の VEMA 由来のカルボキシル基を縮合試薬 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) で活性化後、0.5 mg/mL のトリプシン溶液を添加し、4 ℃ にて 24 時間インキュベートした。トリプシン固定化粒子を遠心分離処理を繰り返し、洗浄、回収後、トリプシン濃度が 0.2 mg/mL とした溶液を以降の実験に使用した。トリプシンの酵素活性は、低分子基質として benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide HCl (BAPNA)、高分子基質としてアゾカゼインを用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) PSBMA-g-VEMA の物性評価

PSBMA-g-VEMA の UCST における PSBMA グラフト密度および鎖長の影響を評価する目的で、種々の PSBMA グラフト密度およびグラフト鎖長を持つ PSBMA-g-VEMA を合成した。その溶液の可視光透過性を測定した結果を図 2 に示す。なお、PSBMA-g-VEMA における PSBMA グラフト密度は、Initiator-VEMA における VEMA の無水マレイン酸部位への AEBPA 導入率とした。各 PSBMA-g-VEMA のグラフト密度およびグラフト鎖長は、 $\alpha$  (グラフト密度 (%)) $\times$  P (PSBMA の平均重合度) として表記した。PSBMA ホモポリマーの UCST が 44.0 ℃ であったのに対し、PSBMA-g-VEMA では、UCST が低温側にシフトした。また、PSBMA 側鎖のグラフト密度および平均重合度の増加に伴い、UCST が上昇する傾向が認められた。したがって、PSBMA-g-VEMA では、PSBMA グラフト密度および鎖長を制御することで、その UCST を調整できることが示された。また、トリプシンの至適温度は 37 ℃ 付近であることから、トリプシンとのコンジュゲート後、均一の溶液状態で使用可能であると考えた。

表 1 は、PSBMA-g-VEMA 溶液の 5 μm におけるコロイド粒子の粒子径およびゼータ電位測定結果を、図 2 より決定した UCST とともににまとめたものである。ゼータ電位はマイナスの値を示しており、これらのコロイド粒子は、VEMA を表面に配していることが示唆された。また、評価した PSBMA-g-VEMA のうち、G15-P58、G15-71、G25-P39 および G45-P3 については、比較的分散度が小さく、130-230nm のコロイド粒子であった。また、5 μm において、安定なコロイド溶液を維持することが確認されたため、これらを酵素固定化に利用した。

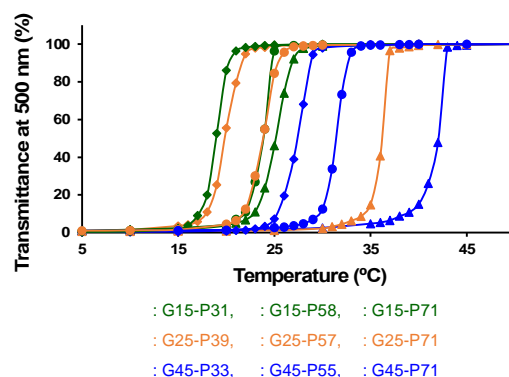


図 2 PSBMA-g-VEMAの温度応答性

表 1 PSBMA-g-VEMAのUCSTおよび粒子物性

polymer	UCST (°C)*	ζ-potential (mV)*	diameter (nm)*	PDI**
PSBMA homopolymer	44.0	—	—	—
G15-P31	19.0	-17.8	—	—
<b>G15-P58</b>	<b>24.5</b>	<b>-15.3</b>	<b>136.2</b>	<b>0.212</b>
<b>G15-P71</b>	<b>26.0</b>	<b>-14.0</b>	<b>189.5</b>	<b>0.093</b>
<b>G25-P39</b>	<b>20.6</b>	<b>-10.3</b>	<b>153.5</b>	<b>0.160</b>
G25-P57	29.6	-13.3	—	—
G25-P71	38.0	-10.5	—	—
<b>G45-P33</b>	<b>27.4</b>	<b>-16.8</b>	<b>223.0</b>	<b>0.216</b>
G45-P55	32.2	-12.3	—	—
G45-P71	43.0	-10.4	—	—

\*Measurement at 5 °C, \*\*PDI: Polydispersity index

#### (2) PSBMA-g-VEMA 修飾トリプシンの活性評価

基質に BAPNA を用いて、酵素活性の温度依存性を評価した結果を図 3 に示す。なお、いずれの PSBMA-g-VEMA 修飾トリプシン溶液も 30 ℃ 以上において、500nm の可視光を 100% 透過することを確認しており、均一な溶液状態として溶解していることが示唆された。いずれの

PSBMA-g-VEMA 修飾トリプシンにおいても最大活性を示す温度が未修飾トリプシンより高温側にシフトしており、また活性値が増大した。これらは、VEMA 修飾トリプシンと同様の結果であり、トリプシン 1 分子が多点多で VEMA と結合していること、そして、トリプシンの自己消化が強く抑制されていることが示唆された。

高分子基質であるアゾカゼインを用いた酵素活性の測定結果を図 4 に示す。なお、未修飾トリプシンは 37 °C、および、高分子修飾トリプシンは、50 °C での活性測定結果を示している。未修飾トリプシンと比較して、VEMA 修飾トリプシンでは大幅に活性が低下しているのに対し、PSBMA-g-VEMA 修飾トリプシンについては、37 °C でのトリプシン活性と同等の活性が認められた。この結果は、PSBMA-g-VEMA によるトリプシン修飾は、不均一系で PSBMA-g-VEMA 粒子表面にトリプシンを固定化しているものであり、その結果、高分子修飾後もトリプシン活性部位への基質のアクセシビリティがある程度維持されるためと考察している。

以上の結果より、不均一系での PSBMA-g-VEMA による酵素修飾は、酵素の安定性を改善し、かつ、高分子を基質とする酵素への適用も可能であると期待される。

活性評価後の PSBMA-g-VEMA 修飾トリプシンについて、反応系を 5 回に冷却後、不溶性成分として回収、再利用についても検討した。その結果、回収成分は 5 回の再利用まで酵素活性を保持していた。一方、回収率が使用毎に大きく低下した。この結果については、使用後、反応系を冷却しても、一部は、凝集せず、溶液の相に分布しているためと考えている。

### ( 3 ) mTGase への適用

トリプシンで確立した条件を mTGase の修飾にも適用し、PSBMA-g-VEMA 修飾 mTGase を調製した。その酵素活性を評価したところ、低分子基質である benzyloxy-carbonyl-L-glutaminyglycine および hydroxamine を用いた酵素活性評価系においても大幅な活性の低下が確認された。その結果を踏まえ、使用する PSBMA-g-VEMA の最適化および mTGase の高分子修飾条件について、現在、最適化している。

### < 引用文献 >

- Y. Sasai, H. Konno, N. Doi, Y. Yamauchi, M. Kuzuya, S. Kondo, Synthesis and characterization of highly stabilized polymer–trypsin conjugates with autolysis resistance, *Catalysts*, 7, 2017, 4/1-4/10
- G. Liu, W. Zhuang, X. Chen, A. Yin, Y. Nie, Y. Wang, Drug carrier system self-assembled from biomimetic polyphosphorycholine and biodegradable polypeptide based diblock copolymers, *Polymer*, 100, 2016, 45-55

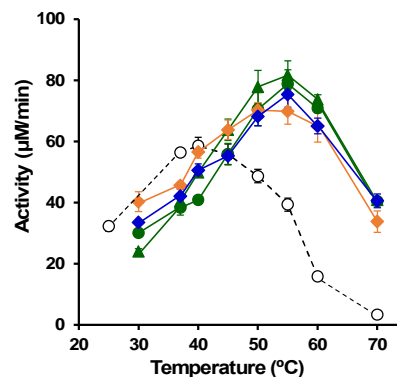
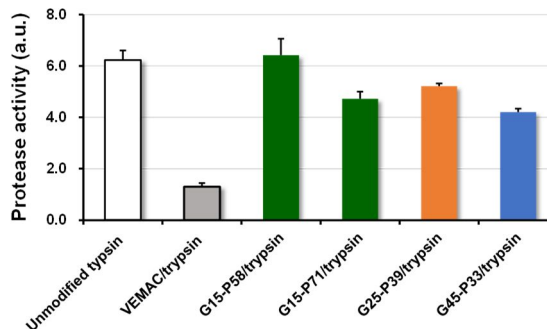


図 3 PSBMA-g-VEMA修飾トリプシンの酵素活性の温度依存性



\*The protease activity of unmodified trypsin was measured at 37 °C.

図 4 高分子基質に対する酵素活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasushi Sasai, Naoki Doi, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuy, Shin-ichi Kondo	4. 巻 32
2. 論文標題 Effects of Plasma Surface Treatment on Cell Adhesion to Biocompatible Polymer Brushes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Photopolymer Science and Technology	6. 最初と最後の頁 529-533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2494/photopolymer.32.529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasushi Sasai, Masao Morita, Naoki Doi, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Shin-ichi Kondo
2. 発表標題 Self-assembly behavior of graft copolymer with thermoresponsive side chains and its evaluation
3. 学会等名 第68回日本高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹井泰志, 土井直樹, 山内行玄, 葛谷昌之, 近藤伸一
2. 発表標題 生体適合性高分子ブラシへの細胞接着におけるプラズマ表面処理の効果
3. 学会等名 第36 回国際フォトポリマーコンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹井泰志, 森田将生, 土井直樹, 山内行玄, 葛谷昌之, 近藤伸一
2. 発表標題 温度応答性グラフト共重合体 - トリプシンコンジュゲートの合成とその評価
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹井泰志、中牟田皓平、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一
2. 発表標題 メタクリル酸系双性イオン高分子のプラズマ誘起反応
3. 学会等名 第35回国際フォトポリマーカンファレンス(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田将生、笹井泰志、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一
2. 発表標題 温度応答性高分子ミセル様粒子の調製とその酵素固定化担体としての応用
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹井泰志、森田将生、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一
2. 発表標題 A strategy for synthesizing polymer-trypsin conjugates by using UCST-type thermoresponsive system
3. 学会等名 The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹井泰志、南田陽日、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一
2. 発表標題 酵素固定化担体への展開を指向したセルロースナノファイバーの表面機能化
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	近藤 伸一  (Kondo Shin-ichi)  (90240944)	岐阜薬科大学・薬学部・教授   (23701)	
連携研究者	土井 直樹  (Doi Naoki)  (00781436)	岐阜薬科大学・薬学部・講師   (23701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------