

B205

ペルオキシダーゼを利用した蛋白と多糖の複合技術の開発

(九大工)〇(学)廣瀬 圭介・(正) 境 慎司*・(正) 武井 孝行・(正)井嶋 博之・(正)川上 幸衛

【緒言】生体の構成成分でもある各種のタンパク質や多糖は、高い安全性などから医薬品、食品など様々な分野で広く用いられている。また、再生医療の分野においては、これらからなる鋳型基材を使用した組織再生の検討が行われている。本研究では、さらなる機能の向上を目的として、ゲル化と同時にタンパク質と多糖の複合化が可能な技術の開発を行った。これを達成するために、我々がこれまでに多糖やタンパク質の単独成分のゲル化に対して有効であることを実証してきた¹⁻³⁾分子中に存在するフェノール性水酸基同士を架橋することが可能な西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応を利用した。

【実験】①試料の作製 ゼラチン、アルブミン、アルギン酸ナトリウムをそれぞれ溶解させた 50 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) に、チラミン塩酸塩を溶解させた後、*N*-ヒドロキシコハク酸イミド、水溶性カルボジイミド塩酸塩を適量添加することによって、1 mg あたりそれぞれチラミン塩酸塩 1.35×10^{-10} mol、 1.36×10^{-10} mol、 1.47×10^{-10} mol に相当するフェノール性水酸基を有するゼラチン (Gela-Ph)、アルブミン (Alb-Ph) およびアルギン酸ナトリウム誘導体 (Alg-Ph) を作製した。

②ゲル上での細胞培養 ①で得られた各試料を所定の濃度になるように Hepes 緩衝液 (pH7.4) に溶解した後、HRP と過酸化水素を添加し、6 well 細胞培養ディッシュの各ウェル上にゲルシートを作製した。得られたゲルを洗浄後、マウス結合組織由来繊維芽細胞 (L929) を 5×10^5 cells/well および 5×10^4 cells/well で播種し、播種 4 時間後の細胞接着率および細胞増殖挙動を測定した。

③ゲルファイバー作製への応用 HRP (10 units/ml) を添加した 1% Gela-Ph と Alg-Ph 混合溶液、3% Gela-Ph 溶液、1% Alg-Ph 溶液をシリンジに充填した後、15mM 過酸化水素含有 CaCl_2 溶液 (100 mM) 中に押し出すことで、ゲルファイバーを作製した。その後、L929 細胞懸濁培地中にゲルファイバーを浸すことで細胞被覆ゲルファイバーの作製を試みた。

【結果及び考察】各成分の単独ゲルとタンパク質と多糖の複合ゲルを比較すると、細胞接着率やゲル上での細胞増殖挙動の面で有意な差が生じた (図 1, 2)。これは、ゲル化と同時に Gela-Ph と Alg-Ph が複合化することにより、多糖単独ゲルと比較して細胞との親和性が向上したためであると考えられる。また、ゲルファイバー作製の結果、複合ゲルを用いた条件でのみ細胞被膜ゲルファイバーの作製が可能であった (図 3)。これは細胞接着性の高

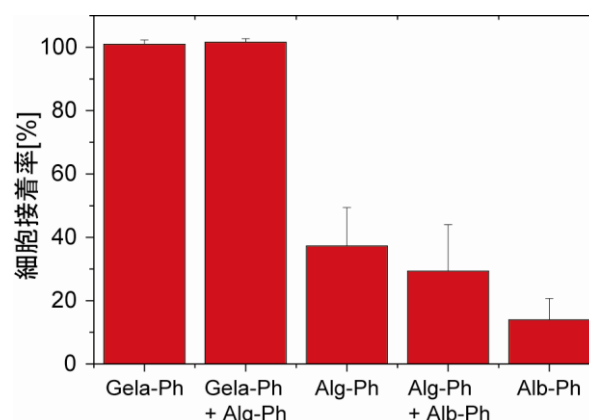
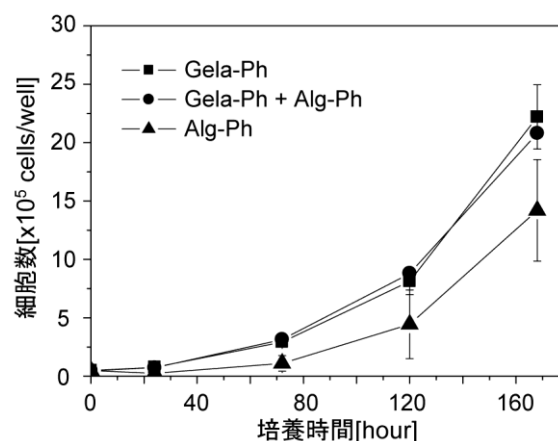
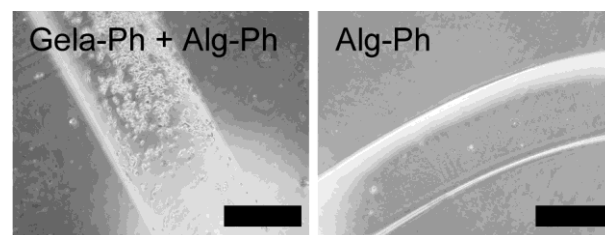
図 1. 細胞接着率 ($n=3-6$, Bars: SD).図 2. 細胞の増殖挙動 ($n=3-6$, Bars: SD).

図 3. ファイバーへの細胞接着 (bar 500μm).

い Gela-Ph と、瞬間的なゲル化が可能な Alg-Ph の複合ゲルを作製したことによる効果であると考えられる。

【結言】ペルオキシダーゼの酵素反応を利用してゲル化と同時にタンパク質と多糖が複合化したゲルを得ることに成功した。

【参考文献】

- 1) Sakai S, Kawakami K, *Acta Biomaterialia*, 3:495(2007).
- 2) Sakai S, Hirose K, Kawakami K, *Biomaterials*, 30: 3371(2009).
- 3) Sakai S, Yamada Y, Zenke T, Kawakami K, *J Mater Chem*, 19:230(2009).

*E-mail: sakai@chem-eng.kyushu-u.ac.jp