

## 酵素反応を利用したアルカリ処理コラーゲン／甜菜由来ペクチン複合ゲルの作製

福本 晃平 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, k9126027@kadai.jp)

吉富 滉生 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, k5454229@kadai.jp)

武井 孝行 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, takei@cen.kagoshima-u.ac.jp)

大角 義浩 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, ohzuno@cen.kagoshima-u.ac.jp)

吉田 昌弘 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, myoshida@cen.kagoshima-u.ac.jp)

### Preparation of toxic chemical cross-linker-free alkali-treated collagen/pectin composite hydrogel by enzyme reaction

Kohei Fukumoto (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

Hiroki Yoshitomi (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

Takayuki Takei (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

Yoshihiro Ohzuno (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

Masahiro Yoshida (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

#### 要約

一般的に広く使用されるコラーゲンは酸性水溶液中で抽出されたものであり、その等電点は7-9である。一方、アルカリ水溶液中で抽出されるアルカリ処理コラーゲン (AC) の等電点は5.0付近であり、酸処理コラーゲンと同様に細胞や生体組織との親和性が高い。その特異的な等電点を利用し、われわれはこれまでにACゲルが血管新生促進因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の徐放担体として有用であることを見出している。しかし、そのゲルの調製に、毒性の高い化学架橋剤であるグルタルアルデヒドを使用していた。本研究ではこの問題を解決するために、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) による甜菜由来ペクチン (SBP) の酸化的重合反応に注目した。その酵素反応によりAC/SBP複合ゲルを調製できた。また、HRPおよび過酸化水素濃度を調整することで1分以内に迅速にAC/SBP複合ゲルを調製できた。さらに、中性の水環境下においてbFGFのモデルタンパク質であるシトクロムCがそのゲルに静電的に吸着できた。以上より、AC/SBP複合ゲルは、bFGFの徐放性を有したインジェクタブルゲルとして有望であることが示唆された。

#### キーワード

アルカリ処理コラーゲン, 西洋わさび由来ペルオキシダーゼ, 甜菜由来ペクチン, インジェクタブルゲル, 酵素反応

#### 1. はじめに

再生医療分野においてヒドロゲルは、生体組織再建用の細胞培養担体や薬物徐放担体として使用されている。ヒドロゲルは柔軟性に富み、生体に埋植後も周囲の生体組織を過度に圧迫することがないため、一般的に生体適合性が高い。そのゲル材料として、われわれはこれまでにほとんど使用されてこなかったアルカリ処理コラーゲン (AC) に注目した。一般的に広く使用されるコラーゲンは、酸性水溶液中で抽出されたものであり、その等電点は7-9であるが、アルカリ水溶液中で抽出されるACの等電点は5.0付近であり、酸処理コラーゲンと同様に細胞や組織との親和性が高い (Hattori et al., 1999)。その特異的な等電点を利用し、これまでにわれわれはACが血管新生促進因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の徐放担体として有用であることを見出している (Takei et al., 2014)。しかし、そのゲルの調製に、毒性の高いグルタルアルデヒドを使用していた。そこで本研究では、そのような毒性の高い化学架橋剤を使うことなく、酵素反応を利用してACゲルを調製することを目的とした。

最も有望な酵素反応は微生物由来トランスグルタミナーゼによるアシル基転移反応である (Moriyama et al., 2011)。実際に、上記酵素反応は、酸処理コラーゲンの架橋に使用されて

いる (Orban et al., 2004)。しかし、ACではトランスグルタミナーゼの基質となるグルタミン残基のγ-カルボキシルアミド基が加水分解されており、それにより上記酵素反応によってAC分子を架橋することは困難であると考えられる。そこで本研究では、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) による甜菜由来ペクチン (SBP) 分子中のフェルロイル基の酸化的重合反応に注目した (図1) (Takei et al., 2011)。この酸化反応では、SBP分子中のフェルロイル基は同じ官能基同士だけでなく、タンパク質中のアミノ基とも架橋できると報告されており (Takei et al., 2013)、この反応によってACを架橋できると考える。また、この反応は生物の体内で起こっている反応であるため、得られるゲルの毒性は低いと考える。

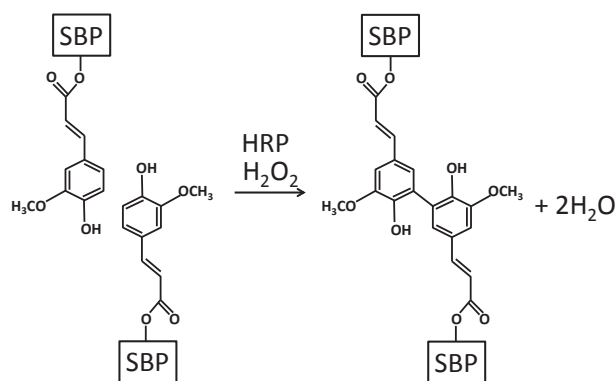


図1: SBP分子中のフェルロイル基の酸化的重合反応

## 2. 実験

### 2.1 試薬

ACおよびSBPはそれぞれ、新田ゼラチン株式会社および三栄源エフ・エフ・アイ株式会社より提供頂いたものを使用した。HRP、過酸化水素水およびウシ由来シトクロムCは和光純薬工業株式会社製のものを使用した。

### 2.2 HRP による SBP の酸化的重合反応を利用した AC/SBP 複合ゲルの調製

ACおよびSBPをCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>不含リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解した。また別途、HRPもPBSに溶解した。過酸化水素水はPBSで希釈した。AC/SBP混合水溶液、HRP水溶液および過酸化水素水を体積比で8:1:1の割合で混合した。なお、過酸化水素水は最後に加えた。ゲル化の確認には試験管倒立法を用いた。

### 2.3 シトクロムCのAC/SBP複合ゲルへの吸着

濃度が1.5 mg/mlとなるようにシトクロムCを精製水に溶解し、0.01 M水酸化ナトリウムを用いてそのpHを7.4に調整した。その水溶液内にAC/SBPゲルを投入し37℃で振盪した。分光光度計(株式会社島津製作所製)を用いて経時的にシトクロムC水溶液の吸光度(450 nm)を測定し、AC/SBPゲルへのシトクロムCの吸着量を算出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 HRP による SBP の酸化的重合反応を利用した AC/SBP 複合ゲルの調製

HRPによるSBP分子中のフェルロイル基の酸化的重合反応を利用してAC/SBP複合ゲルを作製することを試みた。これは、上記反応によりSBP分子中のフェルロイル基とタンパク質中のアミノ基を架橋できると報告されており、これによりACとSBPも架橋できると考えられたためである。まず、水溶液中のAC、SBP、HRPおよび過酸化水素濃度をそれぞれ、4.0 % (w/v)、4.0 % (w/v)、10 unit/mlおよび1 mMに固定して、ゲル化するか調査した。その結果、過酸化水素水添加後、数分でその高分子溶液がゲル化することを確認した(図2)。そこで以下の検討を行った。

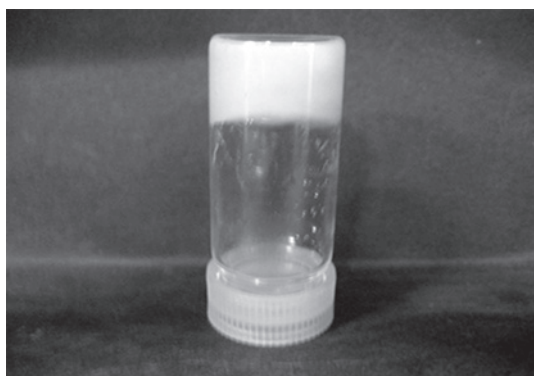


図2：S HRP および過酸化水素を加えて数分後のAC/SBP水溶液

### 3.2 AC/SBP 複合ゲル調製に必要な SBP 濃度の調査

ゲル化に必要なSBP濃度を調査した。なお、本検討では水溶液中のAC、HRPおよび過酸化水素濃度をそれぞれ、4.0 % (w/v)、10 unit/mlおよび1 mMに固定して、SBP濃度を0~4 % (w/v)とした。各SBP濃度におけるAC/SBP溶液の状態を表1に示す。SBP濃度1.5 % (w/v)以上の条件においてゲル化を確認できた。SBP濃度が3.5 % (w/v)以上では、溶液の粘度が高く、取り扱いが困難であるため、以降の実験ではSBP濃度を3.0 % (w/v)とした。

表1：SBP濃度と溶液の状態

SBP濃度 [% (w/v)]	溶液の状態
0	×
0.5	×
1	×
1.5	○
2	○
2.5	○
3	○
3.5	○
4	○

注：○ゲル化、×ゲル化せず

### 3.3 AC/SBP 複合ゲル調製に必要な AC 濃度の調査

ゲル化に必要なAC濃度を調査した。なお、本検討では水溶液中のHRPおよび過酸化水素濃度をそれぞれ、10 unit/mlおよび1 mMに固定して、AC濃度を0~4 % (w/v)とした。各AC濃度におけるAC/SBP溶液の状態を表2に示す。全ての条件においてゲル化を確認できた。AC濃度が1.0 % (w/v)以上では、溶液の粘度が高く、取り扱いが困難であるため、以降の実験ではAC濃度を0.5 % (w/v)とした。

表2：AC濃度と溶液の状態

AC濃度 [% (w/v)]	溶液の状態
0	○
0.5	○
1	○
1.5	○
2	○
2.5	○
3	○
3.5	○
4	○

注：○ゲル化、×ゲル化せず

### 3.4 HRP 濃度がゲル化時間に及ぼす影響

HRPによるSBP分子中のフェルロイル基の酸化的重合反応は極めて素早く進行することが知られている (Takei et al,

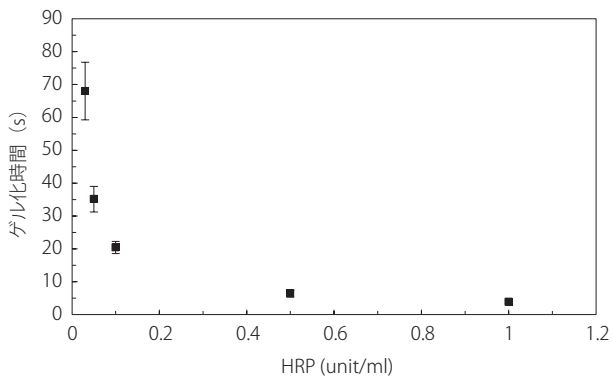


図3：各HRP濃度におけるゲル化時間

2011)。もし、ACを加えた場合でも同様に短時間でゲル化できれば、AC/SBP複合ゲルは、水溶液のまま生体内に注入した後に素早くゲル化する“インジェクタブルゲル”として利用できる。酵素反応の代表的な速度式であるミカエリス・メンテン式より、本酵素反応によるAC/SBP混合溶液のゲル化時間は、酵素であるHRPの濃度と基質成分の一つである過酸化水素の濃度に依存すると考えられる。そこで、本検討ではHRP濃度とゲル化時間との関係を調査した。なお、本検討では水溶液中の過酸化水素濃度を1 mMに固定した。各HRP濃度におけるAC/SBP溶液のゲル化時間を図3に示す。HRP濃度の増加とともにゲル化時間は減少した。また、1分以内に迅速にゲル化させることが可能であった。これより、AC/SBPゲルは、インジェクタブルゲルとして有用であると考えられる。

### 3.5 過酸化水素濃度がゲル化時間に及ぼす影響

本検討では、過酸化水素濃度がゲル化時間に及ぼす影響を調査した。なお、本検討では水溶液中のHRP濃度を10 unit/mlに固定した。各過酸化水素濃度におけるAC/SBP溶液のゲル化時間を図4に示す。過酸化水素濃度の増加とともにゲル化時間は減少した。また、HRP濃度を変化させた場合と同様に1分以内に迅速にゲル化させることが可能であった。

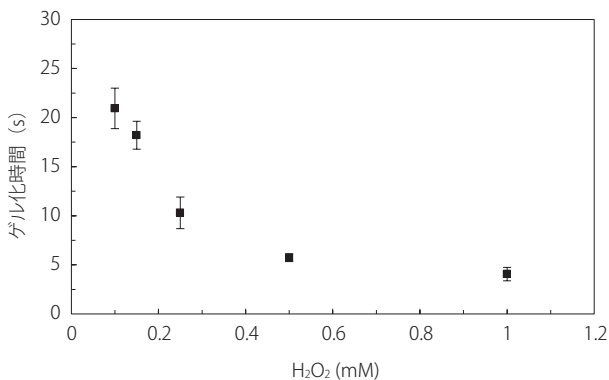


図4：各過酸化水素濃度におけるゲル化時間

### 3.6 シトクロムCのAC/SBPゲルへの吸着実験

われわれは、前報においてACゲルがbFGFの徐放担体とし

て有用であることを証明している(Takei et al., 2014)。ACゲルがbFGFの徐放担体として機能する理由は以下のとおりである。前述のようにACの等電点は5.0付近である。一方、bFGFの等電点では9.6である。したがって、中性の水環境下において、ACおよびbFGFはそれぞれマイナスおよびプラスに帯電するため、bFGFはACゲルに静電的に吸着する。そのbFGF含有ACゲルを生体に移植すると、生体内に存在するコラーゲン加水分解酵素によりAC分子が徐々に分解され、その分子断片がゲルより放出される。その際、bFGFもそのAC分子断片に吸着した状態で徐々に放出される。このように、ACゲルがbFGFの徐放担体として機能する主要原理は、生体内と同じ中性の水環境下において、bFGFがACゲルに静電的に吸着することにある。そこで、本検討では同じ中性環境下において、bFGFがAC/SBP複合ゲルに静電的に吸着するかを調査することにより、AC/SBP複合ゲルのbFGFの徐放担体としての可能性を評価した。なお、実際に使用するbFGFの量は極めて少なく(数μgから数百ngのオーダー)、かつbFGFは容易に変性することから、正確な定量が極めて困難であるため、そのモデルタンパク質として等電点ならびに分子量がbFGF(等電点：9.6、分子量：約180 kDa)に近いウシ由来シトクロムC(等電点：9.6、分子量：約120 kDa)を採用した。図5にAC/SBP複合ゲルへのシトクロムCの吸着挙動を示す。中性の水環境下においてシトクロムCはAC/SBP複合ゲルに吸着した。以上より、AC/SBP複合ゲルはbFGFの徐放担体として有望であることが示唆された。

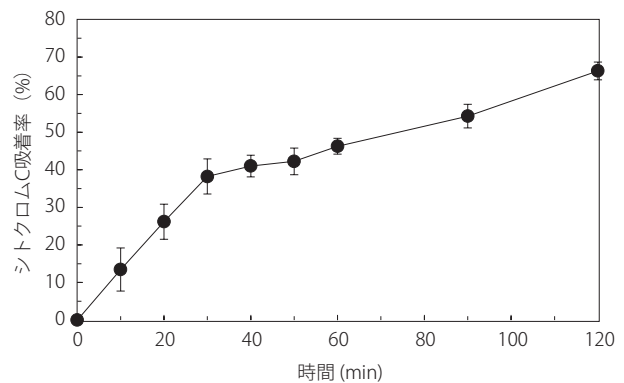


図5：AC/SBPゲルへのシトクロムCの吸着挙動

## 4. まとめ

HRPによるSBPの酸化的重合反応を利用することでAC/SBP複合ゲルを調製できた。また、HRPや過酸化水素濃度を調整することで、1分以内に迅速にゲルを調製できることを確認した。さらに、そのゲルはbFGFの徐放担体として有望であることが示唆された。

## 謝辞

ACは新田ゼラチン株式会社より提供頂いた。SBPは三栄源エフ・エフ・アイ株式会社より提供頂いた。また、本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団助成金によって遂行され

---

た。ここに付記して謝意を表する。

#### 引用文献

- Hattori, S., Adachi, E., Ebihara, T., Shirai, T., Someki, I. and Irie, S. (1999). Alkali-treated collagen retained the triple helical conformation and the ligand activity for the cell adhesion via  $\alpha 2\beta 1$  integrin. *The Journal of Biochemistry*, Vol. 125, 676-684.
- Moriyama, K., Sung, K., Goto, M. and Kamiya, N. (2011). Immobilization of alkaline phosphatase on magnetic particles by site-specific and covalent cross-linking catalyzed by microbial transglutaminase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 111, 650-653.
- Orban, J. M., Wilson, L. B., Kofroth, J. A., El Kurdi, M. S., Maul, T. M. and Vorp, D. A. (2004). Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 68, 756-762.
- Takei, T., Sugihara, K., Ijima, H. and Kawakami, K. (2011). In situ gellable sugar beet pectin via enzyme-catalyzed coupling reaction of feruloyl groups for biomedical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 112, 491-494.
- Takei, T., Sugihara, K., Yoshida, M. and Kawakami, K. (2013). Injectable and biodegradable sugar beet pectin/gelatin hydrogels for biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 24, 1333-1342.
- Takei, T., Yoshitomi, H., and Yoshida, M. (2014). Alkali-treated collagen hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor for enhanced angiogenesis. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, Vol. 47, 424-428.

(受稿：2015年11月4日 受理：2015年11月11日)