

種々のシクロデキストリンを用いた変性還元リゾチームのリフォールディング

日大生産工(院) ○古園 智洋
日大生産工 高橋 大輔・和泉 剛

【緒論】

遺伝子組み換え技術の進展により、大腸菌をはじめとする外来の宿主を生産系として、タンパク質の大量生産が可能となった。しかし、得られたタンパク質はインクルージョン・ボディと呼ばれる不溶性の凝集体として存在することが多い。これらの変性タンパク質の活性を回復させるためには、リフォールディングによりタンパク質の高次構造を本来の状態に導く必要がある。

一般的に、リフォールディングは変性タンパク質を高濃度の変性剤に可溶化させた後、変性剤の効果が無視できる程度まで希釈することにより達成される¹⁾。しかしながら、希釈の際にタンパク質の再凝集が起こり、効率の良いリフォールディングを行うことができない。近年、タンパク質間の再凝集を防止し、リフォールディングを促す化合物を添加する方法が検討されている。このような方法は生体内における分子シャペロンの役割に類似していることから“人工シャペロン”と呼ばれている²⁾。

そこで、本研究では凝集抑制効果を持つ界面活性剤と低分子化合物を包接することが知られるシクロデキストリン(CyD)を順次添加することにより、タンパク質のリフォールディングを行った。モデルタンパク質に鶏卵白由来リゾチームを用い、従来の希釈法と比較するとともにリフォールディングの最適条件の検討を行った。

【実験】

尿素8Mおよびジチオスレイトール3~30mMを含むTris-HCl緩衝液(pH 8.5)中でリゾチーム(5~50g/dm³)を38℃で2時間放置し、変性および還元した。この溶液をカチオン性界面活性剤である臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)、酸化型グルタチオンおよび還元型グルタチオンを含むTris-HCl緩衝液で希釈し、リゾチーム/CTAB複合体を調製すると

ともにリゾチーム分子間の凝集を抑制した。この複合体溶液にCyD(α -, β -, γ -CyD)溶液を添加することにより、複合体からCTABを取り除き、リフォールディングを行った。その後、上澄みの活性を*Micrococcus lysodeikticus*を基質として測定し、Native状態のリゾチームの反応初速度に対する得られた反応初速度の割合をリフォールディング率として評価した。本発表では変性還元リゾチームのリフォールディング率に及ぼすCTAB濃度、CyD濃度、リゾチーム濃度依存性について得られた知見について報告する。

【結果および考察】

<CyD濃度依存性>

Fig.1にCyD添加後のリゾチームの活性回復率とCyD濃度の関係を示した。その結果、どのCyD濃度においても、 β -CyD > α -CyD > γ -CyDの順でリフォールディングが促進されることが確認された。したがって、リフォールディングはCyDの空洞内径に依存すると考えられる。この現象を確認するため、CTAB濃度一定(0.5mM)条件下において、CyD/CTAB混合溶液(CyD濃度0~2mM)の伝導率を測定した。その結果、[CyD]/[CTAB]=1付近で混合溶液の伝導率は明瞭な屈曲点を示した。この結果から、CyDとCTABは主に1:1の包接錯体を形成していることが示唆される。CyDとCTABの結合定数はリフォールディング率と同様に β -CyD > α -CyD > γ -CyDの順であった。このことから、変性・還元リゾチームのリフォールディングは凝集を抑制するCTABとCyDの結合定数に依存することが分かった。

<CTAB濃度依存性>

タンパク質と界面活性剤との混合系において、界面活性剤は高分子イオンの対イオン凝縮により、界面活性剤の臨界ミセル濃度より低濃度で集合体を形成する。したがって、両者の混合割合はリフォールディング率に影響

を及ぼすと考えられる。

そこで、CyD濃度一定(5.0mM)条件下においてリフォールディング率に及ぼすCTAB濃度の影響を検討した。その結果、CTABが低濃度(～0.1mM)の場合、活性回復率は直線的に増加した。CTAB濃度が0.1mM以上になると、リフォールディング率はCTAB濃度増加に伴い、協同的に増加した。その後、リフォールディング率は減少した(Fig.2)。したがって、CTABは0.1mM付近を境に疎水性相互作用によりタンパク質上でミセル状に会合し、タンパク質間における凝集体形成を抑制していると考えられる。この分散状態のリゾチーム/CyD複合体に最適な量のCyDを添加すると、高収率なリフォールディングが達成できることが示された。また、CyDの空洞内径に依存して最大リフォールディング率に相違が出たが、それは前述したCyDとCTAB間の結合定数に依存する。

<リゾチーム濃度依存性>

タンパク質のリフォールディングにおいては系中に存在するタンパク質濃度が収率に最も大きな影響を及ぼす。

そこで、人工シャペロンを用いた系と用いない系でリフォールディング率に及ぼす変性時のリゾチーム濃度の影響を検討した。その結果、Fig.3に示したように、希釈のみのリフォールディングでは、リゾチーム濃度が高濃度になるにつれ、収率が低下した。タンパク質の正常なフォールディングと凝集は競争反応であり、タンパク質高濃度でのリフォールディングはタンパク質間の相互作用を促進し、凝集を引き起こしやすい。それに対し、人工シャペロンを用いたリフォールディングは高濃度条件下においても高い収率を保持した。このことから、本手法を用いてタンパク質高濃度条件下においても高収率なリフォールディングが達成できることが示された。

講演時には非イオン性界面活性剤であるBrij 58, 両イオン性界面活性剤であるSB 3-16を用いた系についても報告する予定である。

【参考文献】

- 1) E. De Bernardes Clark et al., *Methods Enzymol.* **309**, 217 (1999)
- 2) D. Rozema et al., *J.Am.Chem.Soc.* **117**, 2372 (1995)

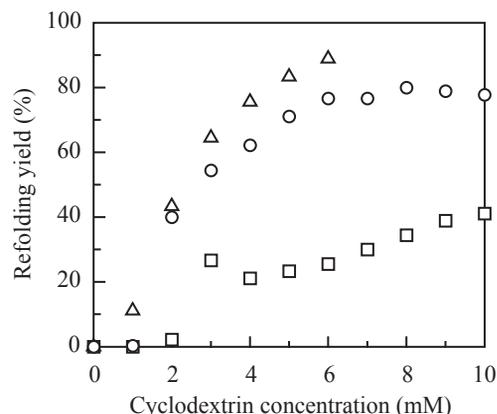


Fig.1 Effect of Cyclodextrin concentration on Refolding yield of Denatured-Reduced Lysozyme.
○: α-CyD, △: β-CyD, □: γ-CyD.
Lysozyme 0.125 g/dm³, CTAB 1.0 mM.
* The experiments could not be carried out above 6mM in β-CyD system because of its poor solubility.

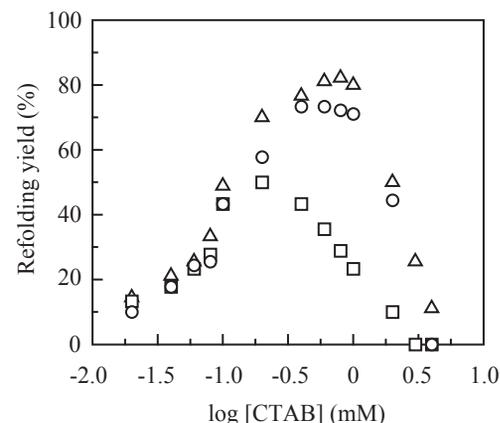


Fig.2 Effect of CTAB concentration on Refolding yield of Denatured-Reduced Lysozyme with Cyclodextrins as a removal agent.
○: α-CyD, △: β-CyD, □: γ-CyD.
Lysozyme 0.125 g/dm³, CyD 5.0 mM

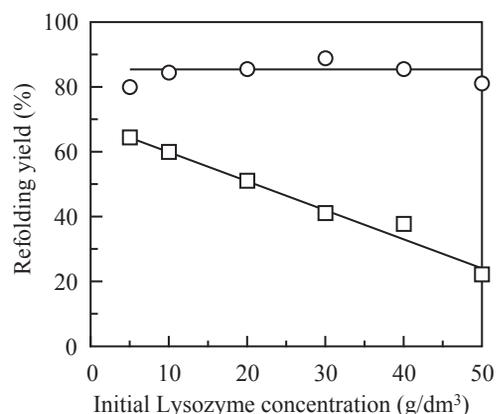


Fig.3 Effect of Lysozyme concentration at denaturation on Refolding yield of Denatured-Reduced Lysozyme.
○: Artificial-chaperone assisted refolding.
□: Unassisted refolding (simple dilution).
Final Lysozyme 0.125 g/dm³, β-CyD 5.0 mM, CTAB 1.0 mM.