

変性還元 Lysozyme のリフォールディングに及ぼす Poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)濃度の影響

日大生産工(院) ○軽部 憲太郎

日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

【緒論】

大腸菌を発現系とするようなタンパク質の生産は、操作が簡便で時間やコストもかからなく、大量生産が可能である。しかしながら、ヒトなどの植物由来の組み換えタンパク質を大腸菌等、外来の宿主を発現系として生産する場合、得られた多くのタンパク質は不溶性かつ不活性な凝集体(封入体)として存在することが問題となっている。そこで、これらの変性状態にあるタンパク質の間違った構造を解きほぐし、正しい立体構造に巻き戻す、いわゆるリフォールディング操作で生理的活性を回復させる研究が行われている。

GroEL/GroES のような分子シャペロンは、タンパク質の凝集体を解きほぐして本来の活性のあるタンパク質に巻き戻す作用があり、タンパク質のフォールディングを補助する役割がある。

分子シャペロンの機能はタンパク質のリフォールディングにおいて寄与している。近年、ポストゲノム研究、バイオ計測やバイオマテリアル設計においてシャペロン機能を積極的に利用した人工シャペロンシステムが重要となってきた。

人工シャペロンの機能を持つ化合物として、ポリエチレングリコール、アルギニン、界面活性剤、シクロデキストリン、Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)等が報告されている。

特にPNIPAAmは変性タンパク質と疎水性相互作用を介して三次構造まで導くことが報告されている。さらに、PNIPAAmは熱応答性高分子で

あることから、温度に伴う親和性の変化によりリフォールディングの制御も可能となっている。このことから、PNIPAAmは優れた人工シャペロンと考えられる。

AAc 部位は高分子弱電解質であるため、カルボキシル基の解離でタンパク質との静電的相互作用が、そして親水化と分散化によるリフォールディングの促進が期待される。そこで、NIPAAmに親水基のアクリル酸(AAc)を共重合させたP(NIPAAm-co-AAc)をタンパク質のリフォールディングに用いることを考えた。そこで本研究は、変性還元 Lysozyme のリフォールディングに及ぼすP(NIPAAm-co-AAc)の濃度の影響について検討した。

【実験】

モノマー試料であるNIPAAmおよびAAcと重合開始剤であるアゾイソブチロニトリル(AIBN)の添加する組成比を変化させ、3種類のP(NIPAAm-co-AAc)を調製した(Table1)。Lysozymeを変性還元するために尿素およびジチオトレイトール(DTT)を使用した。リフォールディング操作として、変性還元 Lysozyme 溶液と再生緩衝溶液(P(NIPAAm-co-AAc), EDTA, GSSG/GSH)溶液を混合した。その後、*Micrococcus lysodeikticus*を基質として混合溶液の経時的な吸光度変化を測定し、Native Lysozymeと混合溶液の活性を比較することでリフォールディング率を評価した。

【結果】

リフォールディング後の溶液中に存在する Lysozyme の凝集体を除去するため透析を行った。Fig. 1 は活性測定の結果である。これより、10 % 以上のリフォールディング率は確認できなかった。これは、変性還元 Lysozyme のリフォールディングが不完全であったこと、さらに透析チューブ内と外液間において Lysozyme の濃度勾配が少なかったため、透析チューブへの浸透が少なかったこと等が結果に影響したと考えられる。

また、透析操作をしない3種類の P(NIPAAm-co-AAc)濃度に対するリフォールディング率の変化を Fig. 2 に示した。5 g/dm³ の L-P(NIPAAm-co-AAc)において最も高いリフォールディング率を示した。また、M-P(NIPAAm-co-AAc)および H-P(NIPAAm-co-AAc)においては P(NIPAAm-co-AAc)濃度変化に伴うリフォールディング率の上昇が確認されたが、全体的にフラットな挙動を示した。pH8.5 の緩衝液中において PAAc のカルボキシル基は完全解離状態であるため、Lysozyme と複合体を形成する。この複合体の酵素活性はモル比の増加と共に低下することが報告されている。したがって、溶液中に存在する AAc の割合が多いほど Lysozyme が強く相互作用してしまうため、フォールディングがある程度までしか促進されてないと考えられる。すなわち、AAc は PNIPAAm と Lysozyme 間の疎水性相互作用によるフォールディングを阻害する可能性が示唆された。今後は P(NIPAAm-co-AAc)の共重合比に関して検討する必要性がみいだされた。

【参考文献】

- 1) Diannan Lu et.al, *Biochemical Engineering Journal*, 24, 2005, 55-64
- 2) Mi Kyong Yoo et al, *Polymer*, 16, 1998, 37 03-3708

Table 1 Ratio of NIPAAm to AAc composition ratio of three kinds of P(NIPAAm-co-AAc

NIPAAm:AAc(%)	
L-P(NIPAAm-co-AAc)	97.71 : 2.29
M-P(NIPAAm-co-AAc)	96.69 : 3.31
H-P(NIPAAm-co-AAc)	97.66 : 2.34

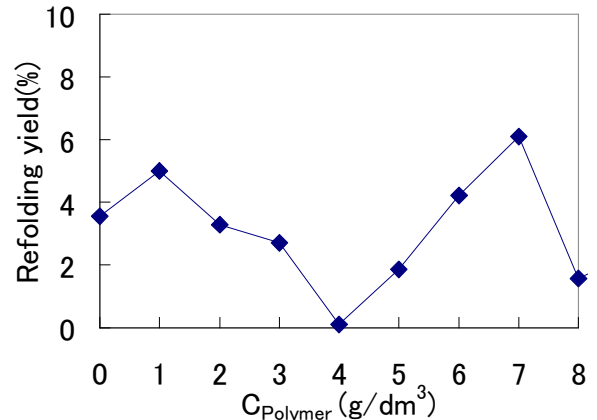


Fig. 1 Change in refolding yield of denatured-reduced Lysozyme with L-P(NIPAAm-co-AAc) Concentration after dialysis
Lysozyme 0.125 g/dm³, Urea 0.05 M, DTT 0.075 mM, EDTA 1.0 mM, GSSG 0.8 mM, GSH 4.0 mM

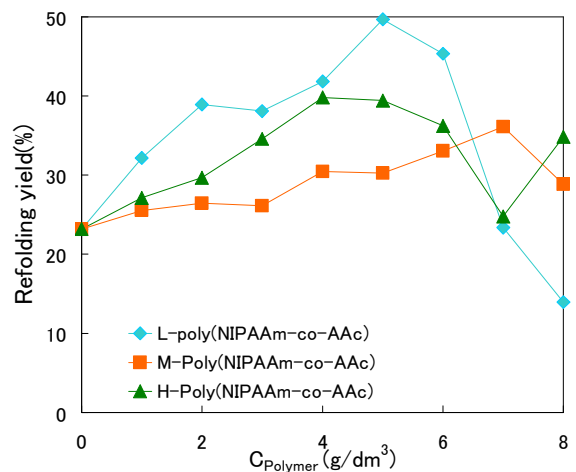


Fig. 2 Change in refolding yield of denatured-reduced Lysozyme with three kinds of P(NIPAAm-co-AAc)