

変性 Lysozyme のリフォールディングにおけるポリアクリルアミド誘導体の
官能基の影響

日大生産工（院）○古沢 保明

日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

1. 緒言

タンパク質は遺伝子工学の発展によって大腸菌や酵母を使用したタンパク質の大量生産が可能となった。そのため医薬品や食品など様々な用途に利用されるようになった。しかしそれらのタンパク質は不溶性かつ不活性な凝集体となる場合が多く、生物活性を持つタンパク質の収率はかなり低くなっている。そのため、それらの凝集体の生物活性を回復させる研究が行われている。この研究は生体内でのタンパク質の折りたたみ機構を模倣している場合が多い。生体内では GroEL/GroES などの分子シャペロンがタンパク質の折りたたみを補助している。GroEL/GroES は内部に空洞を持つ高次構造を持っており、空洞の入口付近は疎水性アミノ酸残基が豊富に存在している。これらの疎水性アミノ酸残基が変性タンパク質を認識している。空洞内部は親水性アミノ酸残基が豊富に存在し、タンパク質が折りたたまれやすい環境となっている。このように GroEL/GroES は疎水性アミノ酸残基と親水性アミノ酸残基を有効に利用し変性タンパク質の折りたたみを補助している。このような分子シャペロンの機能を模倣した人工シャペロンとして界面活性剤/シクロデキストリンが存在する。これは界面活性剤が主に変性したタンパク質の疎水性アミノ酸残基を認識し、他の変性タンパク質分子との凝集を防ぐ。さらにシクロデキストリンを添加し、界面活性剤をタンパク質から取り除くことによって、タンパク質の自発的な折りたたみに適した環境を与えることができる。こ

れらの人工シャペロンも GroEL/GroES と同様に疎水性部位と親水性部位を有効に利用し、変性タンパク質の折りたたみを補助しているこのようにタンパク質の折りたたみを補助する物質は疎水性と親水性のバランスが重要であることが報告されている。²⁾ そこで本研究では Poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm) 誘導体の人工シャペロン能と疎水性を評価し、それらのポリマーおよび既に人工シャペロンとしての機能を示す PNIPAAm の疎水性および官能基が変性 Lysozyme のリフォールディングに及ぼす影響を調査した。

2. 実験

＜液液抽出によるポリマーの疎水性評価＞

使用したポリマーは PNIPAAm, Poly-hydroxyethylacrylamide (PHEAA), Poly-*N,N*-dimethylacrylamide (PDMAA), Poly-*N,N*-diethylacrylamide (PDEAA), である。ポリマーの疎水性は、水/クロロホルム相を使用した液液抽出による分配比の大きさから評価した。各種ポリマーを 5 g/dm³ になるようにクロロホルムに溶解し、50 cm³ 調整した。等量の蒸留水と混合し、攪拌した。一定時間静置後、水相 40 cm³ を蒸発乾固し、得られたポリマーの質量から水相中のポリマー濃度を算出した。そこから有機相中のポリマー濃度を算出した。これらの濃度から分配比を算出した。分配比の大きさから疎水性を評価した。

Effect of Poly Acrylamide Derivative of Functional Groups on Refolding of Denatured Lysozyme

Yasuaki FURUSAWA, Daisuke TAKAHASHI, Tsuyoshi IZUMI

<リフォールディング>

Lysozyme は尿素 8 M, ジチオトレイトール 12 mM を含んだ 0.1 M Tris HCl 緩衝液 (pH 8.5) を使用し, 2 時間, 38 °C で静置させ, 変性させた。この変性 Lysozyme 溶液 (Lysozyme 20 g/dm³) を EDTA 1 mM, GSSG 0.8 mM, GSH 4 mM および各種ポリマーを含んだ 0.1 M Tris HCl 緩衝液に添加し, 混合した。各種ポリマー濃度は 0~10 g/dm³ に調整し, 最終 Lysozyme 濃度は 0.125 g/dm³ とした。この混合溶液をリフォールディング溶液とした。24 時間静置後, 活性測定を行った。0.1 M リン酸緩衝溶液を用いて 0.16 g/dm³ M.L. 溶液を調製した。リフォールディング溶液 0.2 cm³ と M.L. 溶液 2.3 cm³ を混合し, 15 秒間攪拌した。その後, U-2800 spectrophotometer を用いて波長 450 nm における吸光度変化を 60 秒間測定した。PDEAA を使用したリフォールディングにおいては, M.L. 溶液と混合の際, 白濁が生じるため, 基質として *p*-Nitrophenyl Di-*N*-Acetyl- β -chitobioside (pNp-(GlcNAc)₂) を使用した。pNp-(GlcNAc)₂ は Lysozyme によって分解され *p*-ニトロフェノールを生成するため, この生成量を波長 405 nm の吸光度変化から測定した。リフォールディング率は 0.125 g/dm³ Native Lysozyme 溶液添加時の基質溶液の吸光度変化に対するリフォールディング溶液添加時の基質溶液吸光度変化の割合から算出した。

3. 結果および考察

<疎水性評価>

液液抽出によって得られたポリマーの分配比を Table.1 に示す。分配比の大きさは PDEAA>PNIPAAm>PDMAA となった。PHEAA はクロロホルムに溶解しなかった。官能基の炭素数は PDEAA が 4 個, PNIPAAm が 3 個, PDMAA が 2 個である。PDEAA, PNIPAAm, PDMAA は官能基の炭素数の順に分配比は高くなった。そのため疎水性の強さを PDEAA>PNIPAAm>PDMAA とした。そして PHEAA の炭素数が 2 個であるがヒドロキシ

Table.1 Distribution Ratio of polymer

Sample	Distribution Ratio (-)	Carbon Number
PHEAA	0.000	2
PDMAA	0.309	2
PNIPAAm	31.419	3
PDEAA	90.264	4

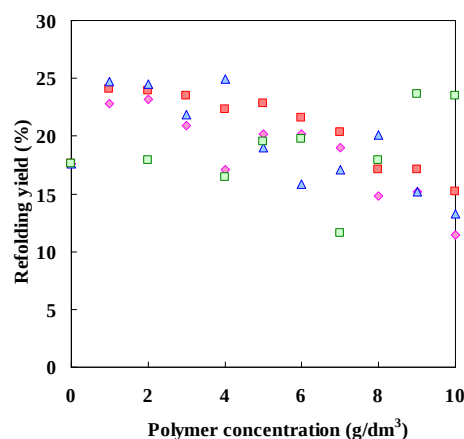


Fig.1 Changes in refolding yield of denatured lysozyme with polymer concentration

■ PDMAA ◆ PNIPAAm ▲ PHEAA ■ PDEAA

ル基を有しているためクロロホルムに不溶である原因であり, 最も低い疎水性を有すると考える。

<リフォールディング>

Fig.1に各種ポリマー濃度におけるリフォールディング率を示す。PHEAA, PNIPAAm, PDMAA は濃度上昇とともにリフォールディング率が低下した。一方, PDEAA は濃度上昇とともにリフォールディング率は上昇した。この結果から変性 Lysozyme のリフォールディングに対して, ヒドロキシ基の影響はないと考える。PDEAA は分配比が他のポリマーより大きいので, ポリマー濃度の上昇とともにリフォールディング率が上昇するという特有の挙動を示していると考えられる。

4. 参考文献

- 1) Diannan lu, The mechanism of PNIPAAm-assisted refolding of lysozyme denatured by urea, *Biochemical Engineering Journal*, 24(2005)55-64
- 2) 後藤祐児, 化学同人, 2005.10