

変性 Lysozyme のリフォールディングにおよぼす人工シャペロンの影響
～界面活性剤の電荷と HLB 値の影響～

日大生産工（院）○麻生拓弥

日大生産工 高橋大輔 和泉剛

1. 諸論

タンパク質は、生命活動において免疫機構や化学反応に関わる重要な構成成分である。タンパク質の活性はそれぞれ特有の構造に折りたたまれることで発現される。しかし、アンフォールディングによりタンパク質は失活し、疾患の原因となることがある。そこで、変性タンパク質を特有の構造へと導くリフォールディング操作が注目されている。生体内において、タンパク質は GroEL/GroES 複合体のような分子シャペロンの補助を受け、凝集体の形成を免れて特有の構造へと導かれる¹⁾。また、大腸菌を用いて工業的にタンパク質を大量発現させた際に、不活性なタンパク質である封入体を生じることがある。この封入体をタンパク質特有の構造に戻す工程において分子シャペロンを模倣したリフォールディング方法を人工シャペロン法と呼ぶ。この方法は、分子シャペロン機能を示す化合物を添加することでタンパク質を特有の構造へと導くことができる。このような化合物として界面活性剤やシクロデキストリン、ポリエチレングリコールなどが挙げられる^{2),3)}。界面活性剤は変性タンパク質と可溶性の複合体を形成し、変性タンパク質の凝集を抑制する。しかし、界面活性剤が結合した状態ではタンパク質は不活性であるため、シクロデキストリンのような界面活性剤と包接体を形成する化合物を添加する必要がある。タンパク質と界面活性剤の複合体から界面活性剤を分離することにより、タンパク質は特有の構造へと導かれる⁴⁾。

本研究では種々の界面活性剤と β -シクロデキストリン(β -CyD)を用い、変性 lysozyme(Lyz)のリフォールディングを行った。*Micrococcus lysodeikticus*(M.l.)を用いた吸光度測定を行い、界面活性剤の電荷と HLB(Hydrophilic Lipophylic Balance)値がおよぼす変性 Lyz のリフォールディングへの影響を検討した。

2. 実験

2-1 変性還元 Lyz 溶液の調製

8 M 尿素, 12 mM Dithiothreitol を添加した 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液を用いて 20 g dm³変性還元 Lyz 溶液を調製した。

2-2 アルコール添加系 Lyz 溶液の調製

LiCl を添加した希塩酸(pH 2.0)を用いて 90 %(v/v) の Methanol と Ethanol 水溶液を調製した。また、CaCl₂ を用いて同様のアルコール水溶液の調製を行った。これらを溶媒として調製した 2.0 g dm³ Lyz 溶液を 50 °C で静置した。

2-3 Lyz-界面活性剤複合体溶液の調製

1.6 mM Glutathione oxidized(GSSG), 8.0 mM Glutathione reduced(GSH), 2.0 mM Ethylene diamine tetraacetic acid, 0~2.0 mM Cetyltrimethyl ammonium bromide(CTAB, HLB:10)を添加した Tris-HCl 緩衝溶液 3.95 cm³と変性還元 Lyz 溶液またはアルコール添加系 Lyz 溶液 0.05 cm³を混合し、Lyz-界面活性剤 複合体溶液を調製した。また、Octadecylamine hydrochloride(HLB:5.3), Sodium dodecyl sulfate(SDS, HLB:40), Lauric

Effect of surfactants as artificial chaperon on refolding of denatured Lysozyme

～ Effect of charge and HLB value of surfactants on refolding of denatured Lysozyme ～

Takuya ASO, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

acid sodium salt(HLB:20), Polyethylene glycol hexadecylether (Brij 58 , HLB:16) , Polyoxyethylene(2)oleylether(Brij 92 , HLB:4.0) を用いて同様の Lyz-複合体溶液を調製した。

2-4 複合体溶液- β -CyD 混合溶液の調製

複合体溶液 0.5 cm^3 , 12.5 mM β -CyD 溶液 0.4 cm^3 と Tris-HCl 緩衝溶液 0.1 cm^3 を混合し, 複合体溶液- β -CyD 混合溶液を調製した。

2-5 *M.L.*を用いた混合溶液の吸光度測定

リン酸緩衝溶液(pH 6.5, $I=0.05 \text{ mol dm}^{-3}$)を用いて, 0.16 g dm^{-3} *M.L.*溶液を調製した。*M.L.*溶液 2.3 cm^3 に混合溶液 0.2 cm^3 を添加し, 15 秒間攪拌した。その後, 60 秒間波長 450 nm における吸光度を測定した。リフォールディング率は(1)式より求めた。

リフォールディング率 =

$$\frac{\text{混合溶液の 10 秒間における吸光度の変化}}{\text{ネイティブ Lyz 溶液の 10 秒間における吸光度の変化}} \times 100 \quad (1)\text{式}$$

3. 結果および考察

Fig.1 に種々の界面活性剤濃度における変性還元 Lyz のリフォールディング率を示す。カチオン性の CTAB を 0.3 mM 以上添加した系において 80 %以上活性の回復がみられた。アニオン性の SDS を 1.5 mM 添加した系において約 20 %活性の回復がみられた。また, ノニオン性の Brij 58 添加系においては約 40 %以上活性の回復がみられた。不規則な凝集体である変性還元 Lyz の疎水性部位を CTAB が効果的に保護した為, 高い活性の回復がみられたと考える。

Fig.2 に Brij 58 と Brij 92 を用いた変性還元 Lyz のリフォールディング率におよぼす界面活性剤濃度依存性を示す。Brij 92 添加系において約 20 %活性の回復がみられた。Fig.1 と Fig.2 より, Brij 58 と Brij 92 添加系を比較したとき, リフォールディング率に違いがあるのは HLB

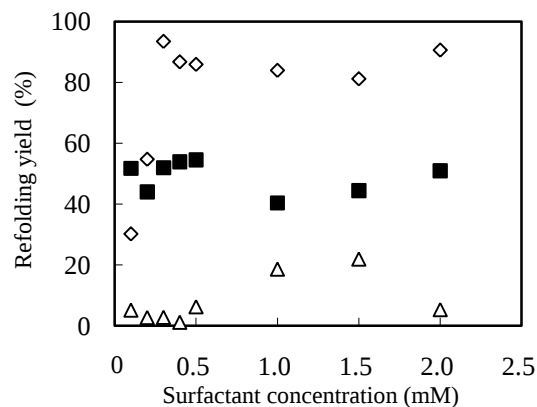


Fig.1 Changes in refolding yield of denatured Lyz with surfactant concentration ($\diamond$: CTAB , $\blacksquare$: Brij 58 , $\triangle$: SDS).

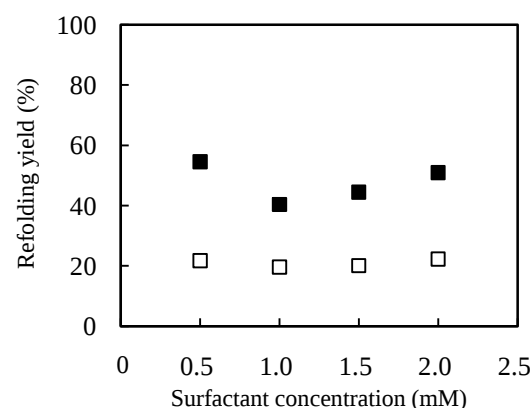


Fig.2 Changes in refolding yield of denatured Lyz with surfactant concentration ($\blacksquare$: Brij 58 , $\square$: Brij 92).

値が影響していると考え。変性 Lyz の疎水性部位と界面活性剤が相互作用する際と, β -CyD を添加し, 界面活性剤と包接体を形成する度合いに HLB 値が影響を与えたため, 変性還元 Lyz のリフォールディング率に違いがあったと考える。本講演会では, アミロイド線維のリフォールディングについても併せて発表する。

4. 参考文献

- 1) 後藤祐児ら, タンパク質科学:構造・物性・機能, 化学同人, 291-302 (2005)
- 2) Sachiko Machida *et al*, *FEBS Letters*, **486**, 131-135 (2003)
- 3) S.H.Gellman *et al*, *Biochemistry*, **35**, 15760-15771 (1996)
- 4) 小宮山眞, 酵素利用技術大系, エヌティーエス, 204-225 (2010)