

## ポリマーを用いた変性還元 Lysozyme のリフォールディング

日大生産工 ○高橋 大輔, 和泉 剛

### 【緒 論】

遺伝子操作技術の進展により、タンパク質の遺伝子配列が明らかとなり、大腸菌などの宿主を生産系としてタンパク質の大量かつ安価な生産が可能となっている。しかしながら、これらのタンパク質は多くの場合、封入体と呼ばれる不活性かつ不溶性の凝集体を形成するという問題点を持っている。これらのタンパク質を利用するためには、変性状態から本来の高次構造へと導き生物的活性を持つ状態に回復するフォールディング操作が必要となる。しかしながら、変性したタンパク質は疎水性アミノ酸残基が露出しているため、容易に凝集体を形成する。したがって、フォールディング操作を効率的に行うためには、凝集すなわちタンパク質分子間の疎水性相互作用を極力抑えなければならない。

近年、タンパク質の再凝集を抑制し、フォールディングを促進する化合物を添加する手法(人工シャペロン)が検討されている。GroEL/GroES 複合体や熱ショックタンパク質に代表される分子シャペロンの機能を模倣した材料を構築する事により、従来のリフォールディング法とは異なる生体環境に調和したリフォールディングプロセスの設計開発が可能であると考えられる。人工シャペロン機能を持つ化合物として、ポリエチレングリコール、界面活性剤、アルギニン、シクロデキストリン、熱応答性高分子ブロック共重合体、両親媒性高分子ナノゲル、チオール基修飾スチレン粒子などが報告されている。この他にも、逆相ミセル内の水相をリフォールディングの反応場として利用するシステム、リポソーム固定化クロマトグラ

フィー、サイズ排除クロマトグラフィーを用いたシステムなどが報告されている。

これまでの研究では、可溶化剤として生体組織中の水に溶けにくいタンパク質の抽出・精製において広範囲に用いられている界面活性剤およびタンパク質に結合した界面活性剤を除去する化合物として、シクロデキストリンに代表される多糖類を選択しそのリフォールディング率について検討を行ってきた。

そこで、本研究ではリフォールディング効率が一番高かったセチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を除去する物質としてアニオン性ポリマーであるポリアクリル酸 (PAAc) およびポリ-L-グルタミン酸 (PLGA) を選択し、ニワトリ卵白由来 Lysozyme のリフォールディング率に及ぼすポリマーの影響(濃度, 分子量)について検討した。また、リフォールディング過程における界面活性剤/Lysozyme の相互作用について UV-VIS, 蛍光および CD スペクトル, 酵素活性, QCM 測定を用いて種々の界面活性剤および尿素濃度において検討を行った。

### 【実 験】

変性還元 Lysozyme 溶液と再生緩衝溶液 (GSSG/GSH, EDTA, CTAB, 尿素) を混合した Lysozyme/CTAB 複合体溶液に所定量の多糖類, PAAc および PLGA 溶液を添加し、リフォールディング操作を行った。その後、混合溶液を基質の *Micrococcu. lysodeikticus* 溶液に添加し、反応時間に対する溶液の吸光度変化からリフォールディング効率を評価した。

### 【結果および考察】

種々のポリマー濃度に対するリフォールディング率の変化を Fig.1 に示す。α-1,6 結合性の Dextran およびβ-1,4 結合性のメチルグリコールキトサン(MGCh)を用いた場合、酵素活性の回復は全く見られなかった。一方、α-1,4 グルコシド結合性のシクロデキストリン(CyD)、デキストリン(Dex)やPAAcを用いた場合には、酵素活性は回復し、濃度の増加に対してリフォールディング率が増加した。Dextran およびMGChの糖鎖構造は剛直であり、親水性である。一方、デキストリン誘導体は両親媒性を示す。したがって、疎水性環境であるCyDの空洞内部やDexのhelix構造内部がCTABを包接するホスト分子として機能し、活性の回復が観察されたと考えられる。しかしながらPAAc(Mw:20,000)を用いた場合、CyDやDexと同様に濃度の増加に対してリフォールディング率の上昇は見られたものの40%以上のリフォールディング率は観察されなかった。これは既に報告したPAAc/Lysozyme複合体の酵素活性と一致しており、CTABの除去によりフォールディングされたLysozymeがPAAcと複合体を形成したためと考えられる。また、高分子量のPAAc(Mw:25,000以上)を用いた場合、酵素活性の回復は確認されなかった。DiannanらはPNIPAAmを用いたリフォールディングにおいて分子量依存性があることを報告している<sup>1)</sup>。したがって、ポリマーの構造、濃度および分子量がリフォールディングにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

図2にLysozyme/CTAB複合体のCDスペクトルを示す。CTABとの複合体形成によりLysozymeのhelix構造が増加した。森山ら<sup>2)</sup>も同様の結果をBSAとSDSの相互作用において報告していることから、複合体形成に

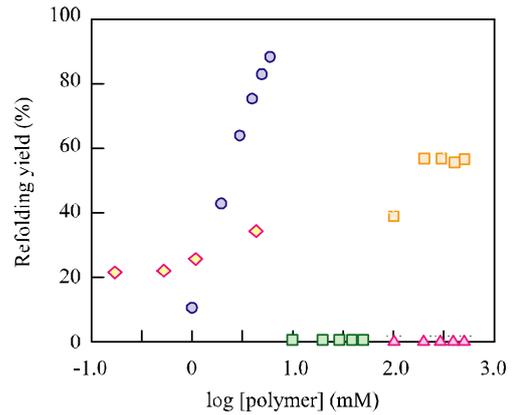


Fig.1 Variations in refolding yield of denatured-reduced Lysozyme with polymer concentration. ●β-CyD, ■Dextrin, ▲Dextran, ■MGCh, ◆PAAc. Polymer concentration is in terms of the concentration of monomer units. Lysozyme 0.125 g/dm<sup>3</sup>, CTAB 1.0 mM, Urea 0.05 M, DTT 0.075 mM, EDTA 1.0 mM, GSSG 0.8 mM, GSH 4.0 mM, Tris-HCl 0.1 M.

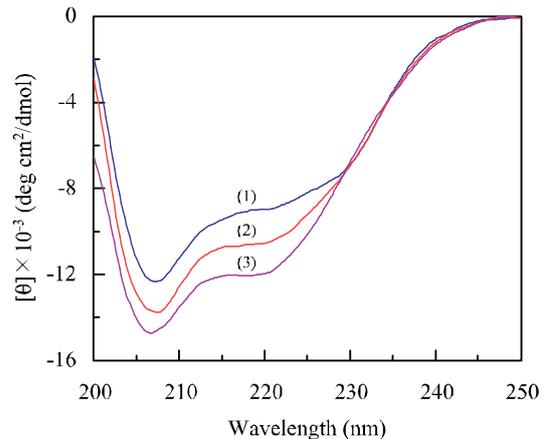


Fig.2 CD spectra of Lysozyme/CTAB complexes in Tris-HCl buffer at pH 8.5.

Lysozyme concentration : 0.125 g/dm<sup>3</sup>

CTAB concentration : (1) 0 mM, (2) 0.6 mM, (3) 1.0 mM

伴う helix 構造変化がリフォールディング操作において重要であることを示唆している。

### 【参考文献】

1) Diannan Lu et.al, *Biochemical Engineering Journal*, 24, 55-64 (2005)

2).Y.Moriyama, K.Takeda, *Langmuir*, 15, 2003 (1999)