

Poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)を用いた 変性還元 Lysozyme のリフォールディング

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】

遺伝子工学の進展により, 産生速度が高い大腸菌などを宿主としたタンパク質の大量発現が可能である。しかし, 大量発現させたタンパク質は多くの場合, インクルージョンボディ(封入体)と呼ばれる不溶性かつ不活性な凝集体を形成することが問題となっている。これは, フォールディング過程における合成されたポリペプチド同士の相互作用, ポリペプチドが単独であることなどが原因となっている。従って, この変性したタンパク質の生物活性を回復させるには, 可溶化させ, タンパク質本来の高次構造へと巻き戻す操作(リフォールディング)が必要不可欠となる。

細胞内において, 分子シャペロンと呼ばれるタンパク質が ATP の加水分解機構を利用して新生タンパク質や変性タンパク質の疎水性アミノ酸残基と疎水性相互作用することでタンパク質のフォールディングは補助をする。このような分子シャペロンの機能を模倣した化合物は人工シャペロンと呼ばれ, これを構築する事により, 従来のリフォールディングとは異なる, 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。人工シャペロンは局所的な両親媒性を有する分子集合体表面と基質タンパク質間の相互作用を積極的に利用したものである。化合物を添加することで, 変性に伴うタンパク質の再凝集を防ぎ, さらにフォールディングを促進する。このような人工シャペロン機能を持つ化合物として親水性共重合体である Poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)(P(NIPAAm-co-AAc))に着目した。NIPAAm 部位は下限臨界溶解温度(LCST)型熱応答性高分子で知られており, 親水性基のアミド基と疎水性基のイソプロピル基を持つ両親媒性物質であり, 分子シャペロンと類似の機能を持つ。また, AAac 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を介し, 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。また, AAac 部位で解離したカルボキシル基に他の化合物を結合することもできる。

従って, P(NIPAAm-co-AAc)を用いた変性還元 Lysozyme のリフォールディングを行い, リフォールディングに影響を及ぼす P(NIPAAm-co-AAc)の分子量, 濃度などについて検討をした。

Refolding of Denatured-Reduced Lysozyme by Poly(*N*-isopropylacrylamide -co-acrylic acid)

Kentaro KARUBE, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

【実験】

モノマー試料である NIPAAm, 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 Table1 に従って変化させ、分子量の異なる 3 種類の P(NIPAAm-co-AAc)を調製した。重合反応は溶媒を 1,4-ジオキサンとして 70℃, 5 時間で行った。変性還元 Lysozyme 溶液は尿素およびジチオトレイトールによって調製した。P(NIPAAm-co-AAc)濃度を変化させた再生緩衝溶液を調製した。それらの再生緩衝溶液に変性還元 Lysozyme 溶液を混合させ、リフォールディングを行った。その後、*Micrococcus lysodeikticus* を基質として混合溶液の吸光度の経時変化を測定し、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。

【結果および考察】

3 種類の分子量の異なる P(NIPAAm-co-AAc)の濃度変化に伴うリフォールディング率の変化を Fig.1 に示す。P(NIPAAm-co-AAc)無添加時では活性がみられたことから変性剤の希釈に伴い変性還元 Lysozyme の凝集を抑制できたと考えられる。一方で、P(NIPAAm-co-AAc)の添加によって多くの場合高い活性を示した。このことから P(NIPAAm-co-AAc)は人工シャペロンとして機能するということができる。

また、L-P(NIPAAm-co-AAc)が M-P(NIPAAm-co-AAc), H-P(NIPAAm-co-AAc)より比較的高い活性が示唆された。これは、L-P(NIPAAm-co-AAc)の粒径が小さいため、Lysozyme と疎水性相互作用をする部位が増加するためと考えられる。一方で H-P(NIPAAm-co-AAc)は分子の粒径が大きいため、タンパク質との疎水性相互作用が強くなり活性に影響を及ぼしたと考えら

Table1 Monomer ratio of NIPAAm,AAc to AIBN in the synthesis of three kinds of P(NIPAAm-co-AAc)

Monomer: Initiator	
L-P(NIPAAm-co-AAc)	10:1
M-P(NIPAAm-co-AAc)	100:5
H-P(NIPAAm-co-AAc)	100:1

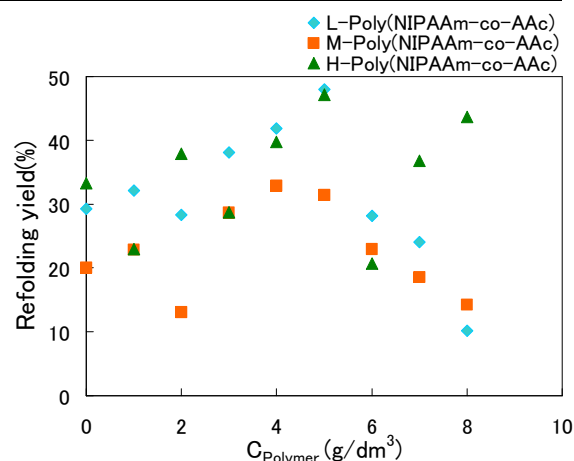


Fig.1 Change in refolding yield of denatured-reduced Lysozyme with three kinds of P(NIPAAm-co-AAc)

Lysozyme 0.125g/dm³, Urea 0.05M, DTT 0.075 mM, EDTA 1.0mM, GSSG 0.8mM, GSH 4.0mM

れる。

しかし、最大リフォールディング率は 48.0%であり、それ以上の高収率なりフォールディング率は確認されなかった。これは、Diannan らの報告より PNIPAAm を用いた場合と比較すると、活性が低くなる。NIPAAm 部位が Lysozyme に及ぼす疎水性相互作用の影響で AAc 部位と Lysozyme の解離基が 1:1 で結合できなくなる部位が存在し、リフォールディングが促進されなかったと考えられる。

【参考文献】

- 1) Diannan Lu et.al, *Biochemical Engineering Journal*, 24, 2005, 55-64
- 2) 古園智洋, 日本大学生産工学部 平成 16 年度 修士論文