

ポリ-N-ヒドロキシエチルアクリルアミドを用いた変性 Lysozyme のリフォールディング

日大生産工（院）古沢 保明

日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

1. まえがき

今日、タンパク質の用途は薬剤, 研究試薬, さらには洗剤など様々な分野で使用されている。これらは全て消耗品であり, 薬剤などの研究は益々盛んになるため大量のタンパク質試薬が必要となってきた。そして現在, 遺伝子工学の発展によって大腸菌や酵母を使用してタンパク質が大量に生産されるようになった。しかしながら, それらのタンパク質のほとんどは酵素活性がなく不溶性凝集体となってしまう場合がある。そこで近年, タンパク質の高次構造と活性の再生を試みる研究が行われるようになりこれはリフォールディングと言われる。リフォールディングは生体内で行われているタンパク質のフォールディング過程を模倣して行われる。生体内ではタンパク質のフォールディングを助ける GroEL-GroES というシャペロンがある。GroEL は分子内に空洞を持ち, その空洞の入口付近は, 疎水性アミノ酸残基が多く存在する。生体内で合成されたばかりの未完成のタンパク質は疎水性アミノ酸残基が外側に露呈される。その結果, 疎水性相互作用の影響で不溶性凝集体となってしまう。この現象を防ぐために GroEL-GroES は空洞入口付近の疎水性環境を利用し, 未完成のタンパク質を取り込むことによって未完成のタンパク質は活性のある形へとフォールディングされている。このように GroEL-GroES は未完成のタンパク質同士の会合を防ぐことによってタンパク質をフォールディングしている。このような

性質を利用したリフォールディングに界面活性剤-シクロデキストリンを使用した系がある。これは不溶性凝集体となってしまったタンパク質を尿素などによって可溶化させた後, 界面活性剤を添加することによって疎水性アミノ酸残基と積極的に結合し, タンパク質同士の会合を防ぐ。さらにシクロデキストリンを添加することで徐々に界面活性剤をタンパク質から取り除きタンパク質自身の持つ水素結合, イオン結合, 疎水性相互作用などの力によって本来の高次構造を持つタンパク質へと導く。これは疎水性, 親水性をうまく使用したリフォールディングである。この他に, 両親媒性物質として poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) を使用してのリフォールディングが報告されている。そこで本研究では官能基をイソプロピル基からヒドロキシエチル基に変化させた poly-N-hydroxyethylacrylamide (PHEAA) を使用し, リフォールディングへの影響を調査した。

2. 実験方法および測定方法

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 緩衝液を使用して変性させた。この変性 Lysozyme 溶液を EDTA 1 mM, GSSG 0.8 mM, GSH 4 mM PHEAA を含んだ 0.1 M Tris HCl 緩衝液に添加した。PHEAA 濃度は 0~20 g/dm³ に調整し, 最終 Lysozyme 濃度は 0.125 g/dm³ とした。この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

Refolding of Denatured Lysozyme using Poly-N-hydroxyethylacrylamide

Yasuaki FURUSAWA, Daisuke TAKAHASHI, Tsuyoshi IZUMI

酸緩衝溶液を用いて 0.16 g/dm^3 *M.I.*溶液を調製した。リフォールディング溶液 0.2 cm^3 と *M.I.*溶液 2.3 cm^3 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 で 60 秒間吸光度を測定した。リフォールディング率は 0.125 g/dm^3 Native Lysozyme 溶液添加時の *M.I.*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 *M.I.*溶液吸光度変化の割合から算出した。

3. 実験結果

PHEAA の Lysozyme への影響を調査するためにリフォールディング条件における Native Lysozyme 溶液の活性測定を行った。

Fig.1 は活性測定時の Native Lysozyme 溶液添加時の *M.I.*溶液の吸光度変化とリフォールディング条件における Native Lysozyme 溶液添加時の *M.I.*溶液の吸光度変化の割合を示した。活性測定比は濃度上昇とともに穏やかに減少した。これは溶液中に PHEAA が増加したことによって Lysozyme と *M.I.*が衝突する確率が減ったと考える。このため PHEAA が高濃度になった場合、吸光度変化が鈍くなったと考える。またこれらの溶液をリフォールディング条件同様、24 時間静置後、溶液の活性測定をしたところ、溶液調整直後の吸光度変化と変化は見られなかった。この結果から PHEAA は Lysozyme に対して活性を妨げる効果はないと考える。

Fig.2 は PHEAA 濃度に対するリフォールディング率を示した。リフォールディング率は PHEAA 濃度の上昇に伴って増加した。高濃度の PHEAA が変性 Lysozyme の凝集を抑制することによってタンパク質自身の持つ水素結合、イオン結合、疎水性相互作用などを促したと考える。

また Diannau lu らの発表によると $2\sim 12 \text{ g/dm}^3$ PNIPAAm 溶液を使用した場合は約 80%から 100%へ緩やかに上昇した¹⁾。界面活

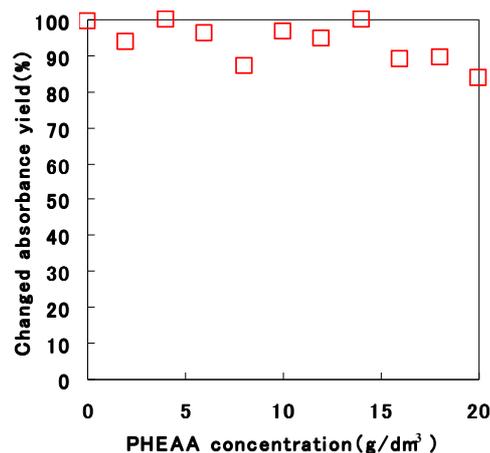


Fig.1 Changed absorbance yield of native lysozyme solution in refolding condition and native lysozyme solution in activity determination. Changed absorbance yield=(changed absorbance of *M.I.*solution added Native Lysozyme in refolding condition/changed absorbance of *M.I.*solution added Native Lysozyme) $\times 100$

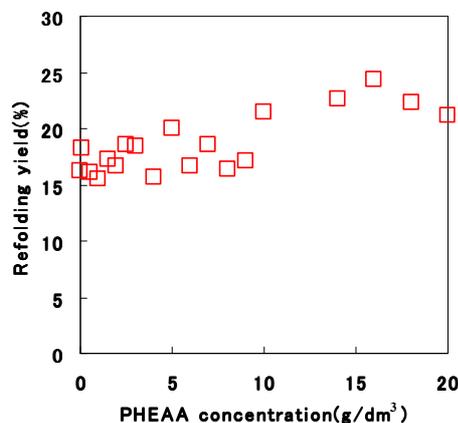


Fig.2 Changed refolding yield of Denatured Lysozyme in different PHEAA concentration. Refolding yield(%)=(changed *M.I.*solution absorbance added refolding solution/changed *M.I.*solution absorbance added Native Lysozyme solution) $\times 100$

性剤-シクロデキストリン系においては、界面活性剤が最適な疎水性を保持し、タンパク質と複合体を形成しなければならない。このことから PNIPAAm は最適な疎水性を有しているのに対して PHEAA は最適な疎水性ではないと考える。

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