

変性 Lysozyme のリフォールディングにおける界面活性剤とポリエチレングリコールの影響

日大生産工 (院) ○麻生拓弥

日大生産工 高橋大輔 和泉剛

1. 緒論

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 Cyclodextrin, Polyethylene glycol(PEG)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、Cyclodextrin 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⁾。この分子シャペロン機能を示す化合物は親水基と疎水基のバランスが重要であることが報告されている⁵⁾。本研究では界面活性剤/ β -Cyclodextrin(β -CyD)や PEG 添加系において変性還元 Lysozyme(Lyz)とそのアミロイド線維のリフォ

ールディングを行った。*Micrococcus lysodeikticus(M.L.)*を用いた活性測定より、変性 Lyz のリフォールディングにおける界面活性剤や PEG 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 dm⁻³ 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(Met.)と Ethanol(Et.)水溶液を調製した。これらを溶媒として調製した 2.0 g dm⁻³ Lyz 溶液を 50 °C で静置し、失活が確認されたアルコール添加系 Lyz 溶液について原子間力顕微鏡を用いて表面形状観察を行った。

2-3-1 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(EDTA), 0.2~2.0 mM 界面活性剤を用いた 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。Table 1 に使用した界面活性剤およびその HLB 値を示す。

2-3-2 Lyz/PEG 複合体溶液の調製

1.6 mM GSSG, 8.0 mM GSH, 2.0 mM EDTA, 0.5 ~3.0 mM PEG1000 を用いた 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/PEG 複合体溶液を調製した。また、PEG4000, PEG6000, PEG8000, PEG20000 を用いて同様に Lyz/PEG 複合体溶液を調製した。

Effect of surfactants and polyethylene glycol on refolding of denatured Lysozyme

Takuya ASO, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

2-4 複合体/ β -CyD 混合溶液の調製

Lyz/界面活性剤複合体溶液 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/ β -CyD 混合溶液を調製した。

2-5 M.I.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.I.溶液を調製した。M.I.溶液 2.3 cm^3 に複合体/ β -CyD 混合溶液または Lyz/PEG 複合体溶液 0.2 cm^3 を添加し、15 秒間攪拌した。その後、波長 450 nm における吸光度を 60 秒間測定した。リフォールディング率は(1)式より求めた。

$$\text{リフォールディング率 (\%)} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (1)$$

A : 混合溶液の 10 秒間における吸光度の変化

B : Native Lyz 溶液の 10 秒間における吸光度の変化

3. 結果および考察

Table 2 に Brij58, Brij97 を用いた Met.添加系 Lyz 溶液由来のアミロイド線維のリフォールディング結果を示す。Met.添加系 Lyz 溶液においては Brij58, Brij97 を用いることで約 30 %以上の活性の回復がみられた。一方, Et.添加系 Lyz においては溶液の活性の回復はみられなかった。他の界面活性剤を用いた際も溶液の活性はみられなかった。

Fig.1 に種々の界面活性剤の HLB 値における変性還元 Lyz のリフォールディング率を示す。Fig.1 より、カチオン性においては HLB 値 2.7 から 5 付近にかけてリフォールディング率は急激に増加し、その後一定となった。ノニオン性においては構造内の $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ の繰り返し単位の増加に伴い、リフォールディング率は増加した。アニオン性においては HLB 値 6 を極大として、その後リフォールディング率は減少した。HLB 値が同程度の界面活性剤を用いたとき、変性還元 Lyz のリフォールディング率は電荷に依存することが分かった。以上の結果から、アミロイド線維のリフォールディングにおいては HLB 値が高いノニオン性界面活性剤、変性還元 Lyz のリフォールディングにおいては HLB 値 5 付近のカチオン性界面活性剤が効果的であることが示された。

Table 1 The surfactants used in refolding of denatured Lyz

Surfactant	HLB value
Cation	
Octadecyl amine hydrochloride	2.7
Hexadecyl dimethyl ethyl ammonium bromide	4.9
Myristyl trimethyl ammonium bromide	5.6
Cetyl trimethyl ammonium bromide	7.6
Nonion	
Poly oxy ethylene(2) oleyl ether	4.0
Poly oxy ethylene(4) lauryl ether	9.0
Poly oxy ethylene(10) oleyl ether (Brij97)	12
Poly oxy ethylene(20) cetyl ether (Brij58)	16
Poly oxy ethylene(100) stearyl ether	18
Anion	
Lauric acid sodium salt	4.7
Stearic acid salt	6.0
Sodium dodecyl sulfate	8.3

Table 2 Activity of denatured Lyz in aqueous methanol solution during refolding process

Surfactant	Activity (%)	
	Without surfactant	With surfactant
Brij97	0	30
Brij58	6.3	44

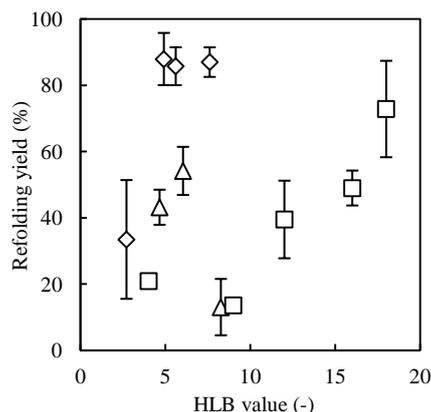


Fig.1 Changes in refolding yield of denatured Lyz with HLB value of surfactant (\diamond :cation, \square :nonion, \triangle :anion)

講演会では、PEG を用いた変性 Lyz のリフォールディングについても併せて報告する。

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)
- 5) D.Lu *et al*, *Biochem. Engineering Journal*, **24**, 55-64 (2005)