

D206

ポリエチレングリコール脂質を用いたタンパク質のリフォールディング

(東大院工) ○ (学) 山本 悦司, (正) 山口 哲志, (正) 長棟 輝行*

【緒言】 大腸菌を用いたタンパク質発現系は、しばしば目的タンパク質を不活性・不溶性の凝集体として発現するため、活性を有する構造へと再生するリフォールディング操作が必要となる。リフォールディング操作では、目的タンパク質の再凝集反応が進行し、リフォールディング収率が著しく低下することが多い。そのため、再凝集反応を抑制し、収率を向上させるリフォールディング用添加剤が開発されてきた[1]。しかしながら、タンパク質の種類によっては、既存の添加剤では収率向上効果が不十分な場合がある。また、添加剤の構造や物性と、収率向上効果との関係はほとんど明らかにされておらず、合理的な設計は困難であるのが現状である。

PEG 脂質であるポリエチレングリコールモノオレイルエーテル (polyethylene glycol monooleyl ether; PGME) は非イオン性の両親媒性分子であり、タンパク質の電荷の影響を受けにくく、幅広い種類のタンパク質に対して効果的な添加剤になると考えられる。実際に、PEG 脂質の一種である Brij 58 が、いくつかのタンパク質に対しては、リフォールディング収率を向上させることが報告されている[2]。

本研究では、PEG 鎖長を系統的に変化させた PGME 群を添加剤として用い (Fig. 1)、PEG 鎖長と収率向上効果の関係を明らかにし、PEG 脂質からなるより汎用性の高い添加剤の開発を試みた。

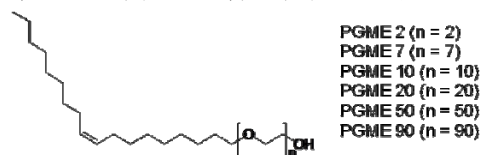


Fig. 1 本研究で用いた PGME

【実験方法】 ニワトリ卵白リゾチームをモデルタンパク質とし、変性還元操作を行った。種々の濃度の PGME を含むリフォールディング緩衝液で 30 倍希釈後 (リゾチームの終濃度は 1.0 mg/mL)、25°C でインキュベートした。

添加剤のタンパク質凝集抑制効果は、1 時間後に 450 nm の波長による濁度測定により評価した。リフォールディング収率は、24 時間インキュベート後の溶菌活性から算出した。データは 3 回の実験の平均値を示した。

【結果及び考察】 PEG 鎖長の異なる PGME 群を試したところ、PEG 鎖長が短い PGME 2, 7, 10 は、ほとんど凝集抑制効果を示さなかった (Fig. 2A)。一

方、PEG 鎖長が 20 以上の PGME は、PEG 鎖長が長い程、低濃度で凝集を効果的に抑制できることが分かった (Fig. 2B)。オレイル鎖及び PEG 鎖がリゾチームの凝集性中間体の疎水性表面と相互作用し、中間体同士の凝集を抑制していることが考えられる。

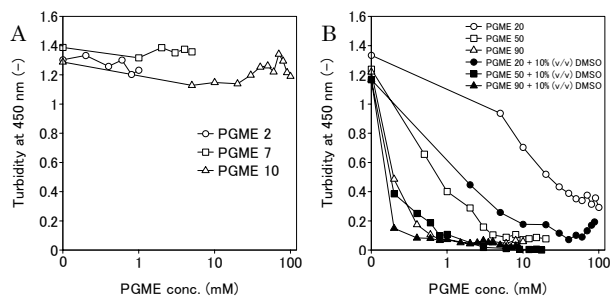


Fig. 2 PGME の凝集抑制効果

凝集を抑制できた PGME 20, 50, 90 に関して、リフォールディング収率を調べた。その結果、完全に凝集を抑制した添加濃度条件下でも 20% 程度のリフォールディング収率しか得られなかった (Fig. 3)。タンパク質と PGME 間の強固な疎水性相互作用が、凝集だけでなくリフォールディングも阻害するため、顕著な収率向上効果が得られないと考えられた。

そこで、タンパク質と PGME 間の疎水性相互作用を弱めるため、非プロトン性極性溶媒である DMSO を 10% (v/v) 添加したところ、PGME 50 及び 90 の収率向上効果が顕著に向上した (Fig. 3)。一方、Brij 58 と同じ PEG 鎖長を持つ PGME 20 では、DMSO の添加効果は見られなかった。

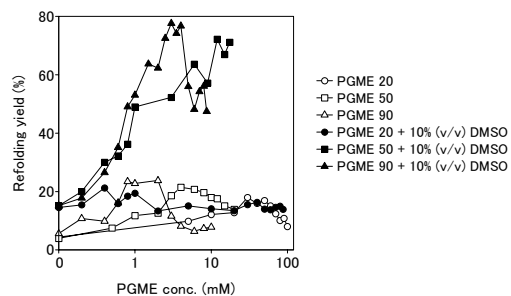


Fig. 3 PGME のリフォールディング収率向上効果

【結言】 長い PEG 鎖を有する PGME と DMSO を併用することで、従来の PEG 脂質では効果のないリゾチームのリフォールディング収率が向上できることが明らかとなった。

【参考文献】 [1] 山口哲志, 長棟輝行, 酵素工学ニュース 2004, 52, 27-35. [2] Krause M. et al., FEBS Lett. 2002, 532 253-255

*Tel: 03-5841-7356, E-mail: nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp