

## N208

## タンパク質リフォールディング支援膜の開発および性能評価

(東工大資源研) ○(学)渡辺麻衣子・(正)大橋 秀伯・(正)田巻孝敬・  
(東大院医疾患セ)(正)伊藤 大知・(東工大資源研)(正)山口 猛央\*

## 1. 緒言および目的

酵素や抗体といったタンパク質は触媒や分子認識素子などとして医療、分析、産業、研究などに広く利用されている。しかしながら、タンパク質は熱、pH、溶媒などの条件で容易に失活するために長期耐性が低く持続的な利用が出来ないという問題がある。タンパク質は複雑な立体構造によって高い機能が発現するため、変性して立体構造が壊れることが失活の原因である。失活したタンパク質の構造を元に戻し、繰り返し利用できるようにすることでタンパク質の利用をさらに拡大することが期待できる。

変性したタンパク質を元の立体構造に折りたたむことをリフォールディングという。生体外でリフォールディングを行う場合、可溶性タンパク質を緩衝液で希釈する大希釈法や、カラムを用いたリフォールディング法の研究が用いられてきた。しかしながらタンパク質濃度が高い溶液での凝集体の生成等によりリフォールディング効率の大幅な低下、処理時間の長さ、タンパク質の濃縮や大容量の装置が必要であるなどの問題点がある。

これらの既往の手法の問題点を一度に解決できる可能性のある手段の一つとして、本研究ではタンパク質のリフォールディング支援膜の提案を行う (Fig.1)。これはリフォールディング促進剤を多孔質基材細孔中に固定化した膜に、可溶化させたタンパク質を透過させることでリフォールディングを行うシステムである。膜を用いる利点としては高速・大量処理、連続処理、小型化が可能であり、将来的には持続的なリフォールディングシステムの構築が考えられる。本研究ではモデルタンパク質として Lysozyme を用いて膜のリフォールディング性能の評価を行う。

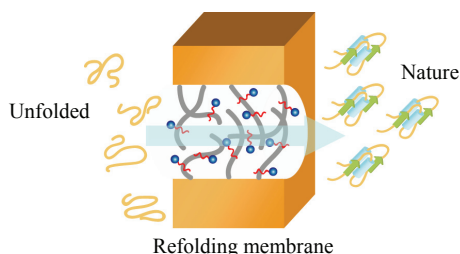


Fig.1 Concept of this study: Refolding agent is immobilized to pore surface of porous porous substrate, and unfolded protein through the pore becomes native.

## 2. 実験

Denaturing buffer 中(0.1 M Tris-HCl (pH8.5), 8 M urea, 10 mM DTT, 1 mM EDTA)に lysozyme を 20 mg/ml 溶かし、38 °C、2 h インキュベートして変性させた。その

後、変性 lysozyme 溶液 5 ml をシリンジポンプを用いて一定速度で膜を通過させ透過セル側 refolding buffer 100 ml (0.1 M Tris-HCl (pH8.0), 1 M urea, 3 mM 還元型グルタチオン, 5 mM 酸化型グルタチオン, 1 mM EDTA)に注入した(20 倍希釈)。膜は、今回は細孔の効果を調べるために親水化処理されたポリカーボネート基膜を用いた。また膜の効果を調べるための比較として膜を透過させずリフォールディングを行った (fed-batch 法)。透過側セルの溶液をサンプリングし、酵素回収量とその活性評価から膜のリフォールディング性能の評価を行った。

## 3. 結果

Fig.2 は透過開始からの透過セル側の溶液の吸光度の時間変化について表しており、実験値が計算値と一致していることから酵素が基膜細孔内でほとんど詰まらず通過していることが分かる。さらに Table1 の膜透過法の質量回収率は 92 %と、膜を透過した場合には凝集体の生成がほとんど起こらずに非常に高い効率で回収できることが示された。高酵素濃度条件下においても凝集を抑制して効率よくリフォールディングを行えることを期待し、希釈率を下げた膜透過実験を行っている。さらに多孔質基材細孔中に poly(*N*-isopropyl acrylamide)をグラフトさせた膜を用い、細孔空間でグラフトポリマーが lysozyme のリフォールディングに及ぼす影響について検討を行っている。

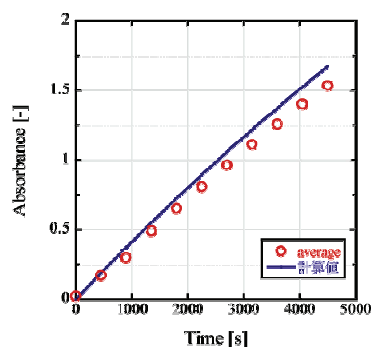


Fig.2 Time dependency of absorbance at 280 nm

Table 1 Summary of the refolding efficiency of membrane-permeate method and fed-batch method.

	Mass recovery [%]	Activity recovery [%]	Refolding efficiency [%]
膜透過法(基膜)	92	94	86
Fed-batch 法	79	95	75

\*Refolding efficiency = mass recovery × activity recovery

\*Tel: 045-924-5254, Fax:045-924-5253, E-mail: [yamag@res.titech.ac.jp](mailto:yamag@res.titech.ac.jp)