

蛋白質の再生に及ぼす安定化剤の影響

松元 俊彦* 安藤 祥司**

Effects of various stabilizers on refolding of protein

by

Toshihiko MATSUMOTO* and Shoji ANDO**

要 旨

高山らは、尿素濃度の低下にともない安定化剤濃度が上昇するよう工夫した画期的方法で、不安定タンパク質である3SSリゾチームの再生を約60%達成している。本研究では、透析法により、より効果的な安定化剤を開発し、さらなる高効率で再生させることを目的とした。

ネイティブリゾチームを用いた安定化剤の影響を20倍希釈法で再生した結果、透析法で得られた結果とほぼ同じ傾向を示した。

次に3SSリゾチームを用いて、100倍希釈法で、再生した結果、グリセロール40%添加のとき、約32%、スクロース1M添加のとき28%の再生収率であった。アルギニンでは、タンパク質の凝集を抑えはしたが再生収率の上昇にはつながらなかった。一方、アセトニトリルは5%添加したとき最大14%の再生収率を得た。40%のグリセロールを含む0.15Mイミダゾール緩衝液中で再生したとき、今回最も高い47%の再生収率を示した。

40%グリセロール含む0.15Mイミダゾール塩酸緩衝液、pH8.0の条件での透析法で再生を試みた結果、高山らの結果とほぼ同じ再生収率が得られた。

Key Words: stabilizer, refolding, lysozyme

1. はじめに

タンパク質のフォルディングの問題はあまりにも複雑な要素を含むのでタンパク質研究のブラックボックスとして放置されてきた。ポストゲノム、「タンパク質の時代」となって、やっと

最近その重要性が認識され、ホットな研究領域となってきた。フォルディング情報に関して、フォルディングが開始する直前の変性構造が重要な鍵を握っていることが示唆されるようになった。

一方、タンパク工学的手法でタンパク質を大量生産する過程でも再生が重要な鍵を握っていることから、変性タンパク質を効率よくフォルディングさせる方法の確立が望まれている。

*崇城大学生物生命学部応用微生物工学科准教授
**崇城大学生物生命学部応用微生物工学科教授

タンパク質は変性しやすく、またタンパク質工学的に生産されたタンパク質はほとんどが変性している。これを活性な形に再生することは、タンパク質の有効利用にとって、必須の過程である。しかしながら、変性タンパク質を効率的に再生させることは至難の業である。この問題を解決することができれば、医薬、食品、生物材料としてタンパク質を有効利用することができ、人類の健康と福祉に大いに貢献できる。

著者らは既に不安定なタンパク質のモデルとしてリゾチーム (HEL) の4個あるSS結合の一番外側のSS結合 (Cys 6-Cys 127) 1個だけを切断してカルボキシメチル化した6, 127 CM-HEL (3 SS リゾチーム) を用い、Fig. 1に示すように、透析法でタンパク質を熱力学的に

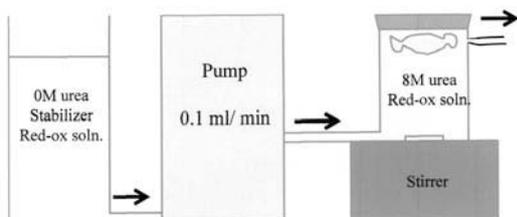


Fig. 1 透析再生法

安定化する添加剤を用いることにより、変性カーブを高尿素濃度側にシフトさせることができることを利用し、0 M 尿素酸化還元液に安定化剤を入れ、尿素濃度の低下にともない安定化剤濃度が上昇するよう工夫した画期的方法を開発した。その結果、安定化剤として40%グリセロールを添加し、約60%の再生効率を達成することができた。

本研究では、より効果的な安定化剤を開発すること、より効果的な再生条件を開発すること、その安定化剤と再生条件を透析法に導入して、さらなる高効率で再生させることを目的とした。より効果的な安定化剤を開発することや、より効果的な再生条件を求める際に、透析法では時間がかかること、さらに近年、巻き戻しが始まる初期構造が巻き戻しに影響していることが分かってきていることなどから、新たな方法で巻き戻しに影響する様々な安定化剤を加えたときの影響を解析した。

2. 実験方法

2.1 希釈法によるリゾチームの変性と還元

リゾチーム 3 mg を 8 M 尿素、5 mM EDTA を含む 0.5 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.6 に溶解 (ネイティブリゾチームの場合は 500 μ l, 3 SS リゾチームの場合は 100 μ l) し変性させた。この変性リゾチームを一部取り、1.3 mM 酸化型グルタチオン、1 mM EDTA を含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0 で希釈 (ネイティブリゾチームの場合は 20 倍、3 SS リゾチームの場合は 100 倍) し、リゾチーム活性を測定した。活性の強さに変化がなくなるまで、この操作を数回行い、その活性を再生率 100% とした。残りの変性リゾチームは窒素置換し、2-メルカプトエタノール 71 mM になるよう加え、窒素置換し、密栓後 40°C で 1 時間インキュベートし還元した。

2.2 希釈法による変性リゾチームの再生

変性還元リゾチームに 1.3 mM 酸化型グルタチオン、1 mM EDTA、安定化剤を含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0 で希釈 (ネイティブリゾチームの場合は 20 倍、3 SS リゾチームの場合は 100 倍) し、2-メルカプトエタノールを 3 mM になるよう加え、40°C でインキュベートし再生させた。再生開始直後から 3 分ごとに再生溶液を取りリゾチーム活性を測定した。

2.3 リゾチーム活性測定法

リゾチーム活性は基質として *Micrococcus luteus* を用いた溶菌活性で調べた。すなわち、*Micrococcus luteus* を 0.05 M リン酸緩衝液、pH 7.0 に懸濁し、350 nm の吸光度をおよそ 1.0 に合わせた基質溶液 2.5 ml を 40°C でプレインキュベートしたのち、リゾチーム 40 μ l を加え、40°C で反応させた。反応開始から 350 nm の吸光度の減少をタイムスキャンで 60 秒間測定した。反応開始 35 秒後と 5 秒後の 350 nm の吸光度の差を活性とした。再生収率は 2.2 に述べた活性に対する比で求めた。

2.4. 3 SS リゾチームの調製

3 SS リゾチームの調製は、Radford ら²⁾の方法をもとに若干の修正を加えて行った。ニワトリ卵白リゾチーム 0.2 g を 0.1 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.8、10 ml に溶解し、20°C で 7 分間インキュベートした。その溶液に、ジチオスレイトール 5 mM を添加し、20°C で 70 分還元した。還元後 0.25 mmol のモノヨード酢酸を添加し、20°C で 60 分間カルボキシメチル化した。なお、モノヨード酢酸溶液は、遮光瓶にモノヨード酢酸を量りとり、0.25 M NaOH に溶解したものを使用した。反応溶液を遠心分離後、上清を 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.0 を用いて平衡化した CM-トヨパールカラム (1.7 × 32 cm) に供与した。同緩衝液を用いて、NaCl 0 ~ 0.5 M のリニアグラジエント法で溶出した。溶出液は試験管 1 本あたり 3 ml ずつ分取し、280 nm の吸光度を測定した。3 SS リゾチームと判断したピークをプールし、脱イオン水に対して低温室で 3 日間透析した。透析後透析内液を凍結乾燥して 3 SS リゾチーム試料とした。

2.5 透析法による再生実験

変性と還元・酸化は 3 SS リゾチーム 5.3 mg を 8 M 尿素、5 mM EDTA を含む 0.5 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.6、2.12 ml に溶解し変性させた。一部を使用し、タンパク質量 (T.A 280) を測定した。変性タンパク質溶液 2 ml に、2-メルカプトエタノールを 71 mM になるよう加え、窒素置換し、密栓後 40°C で 1 時間インキュベートし還元した。還元液に酸化型グルタチオンを 24.6 mM になるよう加え、透析バッグに入れ、Fig. 1 に示したような装置で透析した。透析バッグは 8 M 尿素酸化還元液 (8 M 尿素、3.6 mM 2-メルカプトエタノール、1.3 mM 酸化型グルタチオンおよび 1 mM EDTA を含む 0.15 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.0、100 ml) に入れた。一方、0 M 尿素安定化剤酸化還元液は 0 M 尿素、3.6 mM 2-メルカプトエタノール、1.3 mM 酸化型グルタチオン、1 mM EDTA および 40% グリセロールを含む 0.15 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.0、400 ml を用い、ポンプにより流速 0.1 ml/min で送り込み、再

生させた。再生タンパク質の分析は、再生したタンパク質を遠心分離後、上清を 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.0 を用いて平衡化した CM-トヨパールカラム (1.7 × 30 cm) に供与した。同緩衝液を用いて、NaCl 0 ~ 0.5 M のリニアグラジエント法で溶出した。溶出液は試験管 1 本あたり 3 ml ずつ分取し、280 nm の吸光度を測定した。3 SS リゾチームの溶出位置のピークを再生タンパク質とし、その T.A 280 nm から再生収率を計算した。

3. 実験結果と考察

3.1 ネイティブリゾチームの再生に及ぼす安定化剤の影響

2.2 に示した再生実験に従い、安定化剤としてグリセロールを用い、種々の濃度でネイティブリゾチームを再生させた結果を Fig. 2 に示す。

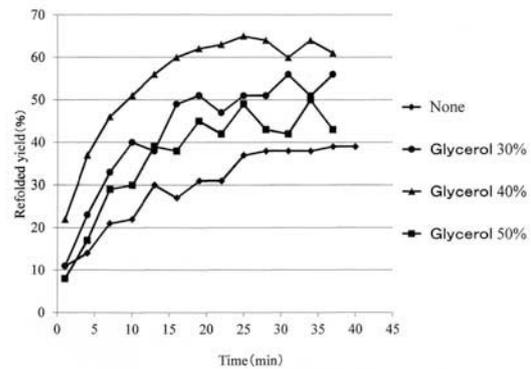


Fig. 2 ネイティブリゾチームの再生に及ぼすグリセロールの影響

本実験では、20 倍希釈で再生実験を行っている。無限大希釈や高濃度尿素中では、再生効率が上がり過ぎ、安定化剤の効果がわかりづらくなる。そのため、安定化剤なし (コントロール) では、悪い条件で再生を行い安定化剤の影響を調べている。横軸は、希釈後の時間 (再生時間)、縦軸は再生収率を示している。グリセロール以外の安定化剤の影響も調べ、新たにその結果を表 1 にまとめた。ネイティブリゾチームの再生実験では、グリセロールがどの濃度でも再生収率の上昇が見られた。若干のばらつきがあるため、曲線から妥当な値を再生収率とした。40% のときに 65% の再生収率が得られた。

表1 ネイティブリゾチームの再生に及ぼす安定化剤の影響

Stabilizer (Conc.)	Refolded yield (%)
None	40
Glycerol (30%)	55
(40%)	65
(50%)	49
Sucrose (1M)	59
Arginine (0.5M)	23
(2M)	32

スクロース 1 M では 59%、アルギニンでは 0.5 M、2.0 M の両方がリボヌクレアーゼ A とは異なり、再生に悪影響を与えた。これらの結果は、透析法によるリゾチームの再生に及ぼす安定化剤の影響とほぼ同じ傾向を示した。このことは、希釈法で、より効果的な安定化剤、より効果的な再生条件を、透析法に導入すれば、さらなる高効率で再生させることが可能なることを示唆している。

3.2 3 SSリゾチームの調製

3 SS リゾチームはネイティブリゾチームより 7.2 kcal/mol³⁾ 不安定であり、不安定タンパク質の再生実験を検討するための良い試料である。2.4 に示したように、還元カルボキシメチル化した試料をイオン交換クロマトグラフィーに供与した結果を Fig. 3 に示す。3 SS リゾチー

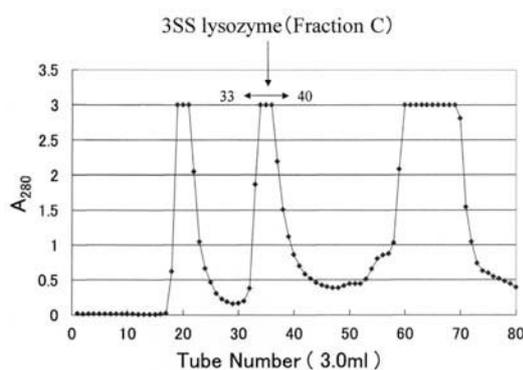


Fig. 3 部分的還元カルボキシメチル化リゾチームの CM-トヨパール 650 M クロマトグラフィー
Column size : $\Phi 1.7 \times 32$ cm
Phosphate buffer, pH 7.0 (0 M \rightarrow 0.5 M NaCl)

ムは 2 つ目のピークと判断した。1 つ目のピークは反応試薬、3 つ目の大きなピークは未反応

のネイティブリゾチームと考えられた。3 SS リゾチームは 1 本の SS 結合が還元カルボキシメチル化されたことで、ネイティブリゾチームより 2 つ多くの負電荷を帯びる。そのため、陽イオン交換カラムである CM-トヨパールカラムで、ネイティブリゾチームより早く溶出されることが考えられる。2 つ目のピークはネイティブリゾチームより早く溶出したことからカルボキシメチル化された 3 SS リゾチームと考えた。高山ら¹⁾は、この画分の温度安定性を調べた結果、既報の 3 SS リゾチームの温度安定性³⁾と同等であると報告している。3 SS リゾチームの収量はおよそ 20 mg であり、収率はほぼ 10% であった。

3.3 3 SSリゾチームの再生に及ぼす安定化剤の影響

2.2 に示した再生実験に従い、安定化剤としてグリセロールを用い、種々の濃度で 3 SS リゾチームを再生させた結果を Fig. 4 に示す。不

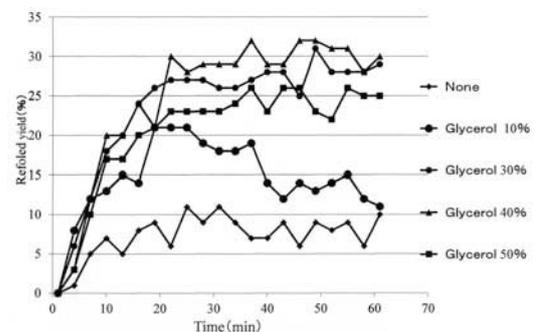


Fig. 4 3SSリゾチームの再生に及ぼすグリセリンの影響

安定なタンパク質の場合、ネイティブ構造を優先的にとる尿素濃度が安定タンパク質よりかなり低くなることが予想される。そのため、本実験では、100 倍希釈で再生実験を行っている。ネイティブリゾチームを使用した実験と比較すると、スムーズな再生収率の上昇は認められず、実験誤差が大きくなったが、おおよその再生収率は決定できた。そこで、グリセロール以外の安定化剤の影響も調べ、新たにその結果を表 2 から表 4 にまとめた。100 倍希釈すると、安定化剤なし (コントロール) の再生収率は約 10% であり、安定化剤の効果がわかりやすい数

表 2 希釈法による 3SS リゾチームの再生に及ぼす種々の安定化剤の影響(1)

Stabilizer(Conc.)	Refolded yield(%)
None	10
Glycerol (10%)	20
(30%)	28
(40%)	32
(50%)	25
Sucrose (0.25M)	22
(0.5M)	20
(1M)	28

値を示した。高再生収率が期待される OH 基を多く含む物質⁴⁾について検討した。グリセロール 40% 添加のとき、約 32% の再生収率が得られた。スクロースでも上昇が見られ、1 M 添加したとき 28% という再生収率を得た。

その他の濃度でも再生収率が上昇したことから安定化剤としては有効であると考えられた。アミノ基を含む化合物も安定化剤として有効であることが知られている。特にアルギニン⁵⁾は、タンパク質の再生における安定化剤として広く使用されている。アルギニンの影響を調べた。

表 3 希釈法による 3SS リゾチームの再生に及ぼす種々の安定化剤の影響(2)

Stabilizer (Conc.)	Refolded yield(%)
None	10
Arginine (0.5M)	11
(1M)	9
(2M)	10
Sarcosine (3M)	10
Acetonitrile (2.5%)	9
(5%)	14
(10%)	3

0.5 M から 2 M では、タンパク質の凝集を抑えはしたが再生収率の上昇にはつながらなかった。同様にサルコシン⁶⁾もほぼ影響しなかった。一方、アセトニトリルは 5% 添加したとき最大 14% の再生収率を得た。このことから不溶性の物質の影響も調べられる可能性があると思われる。次に、緩衝液の影響を検討した。イミダゾール緩衝液は 0.15 M のとき 14% の再生収率を得た。このことから安定化剤と組み合わせることでさらに再生収率を上昇させられると考えられ、40% のグリセロールを加えたところ、今回最も高い 47% の再生収率を示した。ホウ酸

表 4 希釈法による 3SS リゾチームの再生に及ぼす緩衝液の影響

Buffer (Conc.)	Refolded yield(%)
Tris-HCl buffer, pH8.0 (0.1M)	10
40%glycerol	32
Phosphate buffer, pH8.0 (0.1M)	3
Borate buffer, pH8.0 (0.05M)	10
(0.1M)	10
(0.15 M)	8
Imidazole-HCl buffer, pH8.0 (0.1M)	10
(0.15M)	14
+40%glycerol	47
(0.2M)	9

緩衝液はどの濃度でも再生収率を上昇させることができなかった。リゾチームの実験でよく使用されるリン酸緩衝液を用いて、再生実験を行ったところ、0.1 M で、再生収率 3% となり、大変な悪影響を及ぼし、実験にリン酸緩衝液を使用するときは、注意が必要である。

3.4 透析法による再生実験

2.5 に示したように、40% グリセロールを含む 0.15 M イミダゾール緩衝液、pH 8.0 の条件で再生させ、CM- トヨパールカラム (1.7 × 30 cm) に供与した結果を Fig. 5 に示した。試

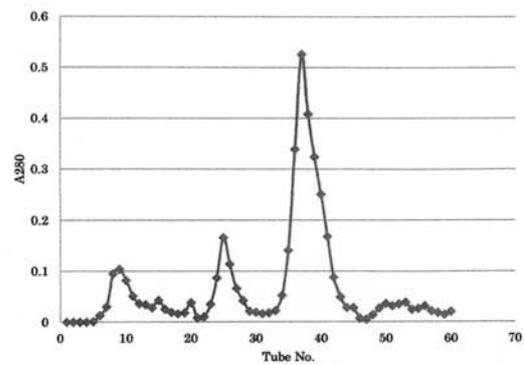


Fig. 5 再生 3SS リゾチームの CM-トヨパール 650M カラムクロマトグラフィー

Column size : Φ1.7×30 cm
Phosphate buffer, pH 7.0 (0 M → 0.5 M NaCl)

験管番号 34 番から 43 番までをプールし A280 nm を測定し、T.A 280 nm を計算した。その結果、T.A 280 nm は 7.95 であった。2.5 で求めたタンパク質量 (T.A 280 nm) は 13.2 であったので、再生収率は $7.95 \div 13.2 = 0.60$ となり、約 60% であった。この値は、高山ら¹⁾の値と同じであった。今後は、さらなる安定化剤の検討

や再生条件の検討が必要である。

4. おわりに

不安定なタンパク質の再生における、より効果的な安定化剤を開発すること、より効果的な再生条件を開発すること、その安定化剤と再生条件を透析法に導入して、さらなる高効率で再生させることを目指すことを目的として本研究を行った。

ネイティブリゾチームを用いた安定化剤の影響を希釈法による再生実験で行った。安定化剤の効果をわかりやすくするため、20倍希釈で再生実験を行った。その結果、グリセロールがどの濃度でも再生収率の上昇が見られ、40%のときに65%の収率が得られた。スクロース1Mでは59%、アルギニンでは0.5M、2.0Mの両方が再生に悪影響を与えた。これらの結果は、透析法によるリゾチームの再生に及ぼす安定化剤の影響とほぼ同じ傾向を示した。このことは、希釈法で、より効果的な安定化剤、より効果的な再生条件を、透析法に導入すれば、さらなる高効率で再生させることが可能になることを示唆していた。

次に、不安定タンパク質の良い試料である3SSリゾチームを用いて、安定化剤の影響を検討した。不安定なタンパク質の場合、ネイティブ構造を優先的にとる尿素濃度が安定タンパク質よりかなり低くなることが予想される。そのため、100倍希釈で再生実験を行った。ネイティブリゾチームを使用した実験と比較すると、スムーズな再生収率の上昇は認められず、実験誤差が大きくなったが、おおよその再生収率は決定できた。そこで、グリセロール以外の安定化剤の影響も調べた。高再生収率が期待されるOH基を多く含む物質について検討した。グリセロール40%添加のとき、約32%の再生収率が得られた。スクロースでも上昇が見られ、1M添加したとき28%という再生収率を得た。その他の濃度でも再生収率が上昇したことから安定化剤としては有効であると考えられた。アミノ基を含む化合物について検討した。アルギニンの影響を調べた結果、0.5Mから2Mで

は、タンパク質の凝集を抑えはしたが再生収率の上昇にはつながらなかった。同様にサルコシンもほぼ影響しなかった。一方、アセトニトリルは5%添加したとき最大14%の再生収率を得た。次に、緩衝液の影響を検討した。イミダゾール緩衝液は0.15Mのとき14%の再生収率を得た。このことから安定化剤と組み合わせることさらに再生収率を上昇させられると考えられ、40%のグリセロール加えたところ、今回最も高い47%の再生収率を示した。ホウ酸緩衝液はどの濃度でも再生収率を上昇させることができなかった。リゾチームの実験でよく使用されるリン酸緩衝液を用いて、再生実験を行ったところ、0.1Mで、再生収率3%となり、大変な悪影響を及ぼした。

希釈法により、40%グリセロール含む0.15Mイミダゾール塩酸緩衝液、pH8.0での再生が最も良い結果を示したので、その条件で透析法での再生を試みた。高山らの結果を上回る収率を得られなかった。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、元崇城大学応用微生物工学科の井本泰治教授に心より深く感謝いたします。また、本実験を遂行していただいた本学科の修士保田達哉さん⁷⁾、4年生松窪兼蔵さん⁸⁾、野稲俊宏さん⁹⁾に深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kohyama K., Matsumoto T., and Imoto T.(2010) Refolding of an unstable lysozyme by gradient removal of soluble and gradient addition of a stabilizer. *J. Biochem.* 147(3): 427-431
- 2) Radford, S. E., Woolfson, D. N., Martin, S. R., Lowe, G. and Dobson, C. M(1991) A three-disulphide derivative of hen lysozyme. *Biochem. J.* 273, 211-217
- 3) So, T., Ito, H. O., Koga, T, Watanabe, S., Ueda, T., and Imoto, T.(1997) Depression of T-cell-epitope generated by stabilizing hen lysozyme. *J. Biol.*

Chem. 272, 32136-32140

- 4) Ueda, T., Nagata, M., Imoto, T.,(2001) Aggregation and chemical reaction in lysozyme caused by heating at pH 6 are depressed by osmolytes, sucrose and trehalose. *J. Biochem.* 130, 491-496
- 5) Tsumoto, K., Ejima, D., Kita, Y., and Arakawa, T.(2005) Why is arginine effective in suppressing aggregation? *Protein Pept. Lett.* 33, 12613-12619
- 6) Santro, M. M., Liu, Y., Khan, S. M., Hou, L. X., and Bolen, D. W.(1992) Increased thermal stability of protein in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 31, 5278-5283
- 7) 保田達哉（平成24年）崇城大学大学院工学研究科応用微生物工学科応用微生物工学専攻修士論文、再生困難なタンパク質の普遍的再生法の確立
- 8) 松窪兼蔵（平成21年）崇城大学大学生物生命学部応用微生物工学科卒業論文、再生に及ぼす再生初期構造の影響の解析
- 9) 野稻俊宏（平成24年）崇城大学大学生物生命学部応用微生物工学科卒業論文、リゾチームの巻き戻しに関する研究