

Title	添加剤を用いた高温でのタンパク質リフォールディング方法
Author(s)	坂本, 龍祐
Citation	
Issue Date	2004-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3115
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 材料科学研究科, 修士

添加剤を用いた高温でのタンパク質リフォールディング方法

坂本 龍祐 (高木研究室)

【背景および目的】遺伝子工学の進展にともない、今日では様々なタンパク質が組換え体から大量に調製され、医薬品開発や食品加工、臨床診断等の産業に利用されている。しかし、組換え体で発現させたタンパク質は、不活性な封入体と呼ばれる小粒子顆粒を形成することが多い。例えば医薬品に用いる抗体や一本鎖抗体、サイトカインは、必ず封入体を形成することが知られている。封入体はタンパク質が凝集し不活性化したものである。しかし、封入体は目的タンパク質だけで構成されているので、遠心分離で狭雑タンパク質を容易に除去することができる。封入体から活性のあるタンパク質を得るために、還元変性状態からのリフォールディング法を開発する必要がある。現在までに、希釈法や透析法、段階的透析法などの方法が開発されているが、コストや時間などに問題が残る。本研究では最も単純な希釈法を改良し、添加剤を含む 98℃の希釈溶液中でリフォールディングさせることで収率を増加させる方法を開発した。

【方法】ニワトリリゾチームをモデルタンパク質に用いた。100 mg/ml のリゾチームを 6 M 塩酸グアニジンおよび 30 mM ジチオトレイトール中に 20℃で 12 時間放置して還元変性リゾチームを調整した。また、終濃度 100 mM トリス緩衝液(pH7.4)および任意の濃度の添加剤を混合した溶液を希釈溶液とした。高温リフォールディング法 (Thermal Refolding Method; TRM) はあらかじめ 98℃に加熱しておいた希釈溶液中に終濃度が 6 mM 還元型グルタチオン、3 mM 酸化型グルタチオンを添加し、直後に還元変性したタンパク質溶液を終濃度 1.0 mg/ml (100 倍希釈) となるように希釈して、これを 98℃で 5 分間で保温した後、1 分間氷上で急冷し、20℃で 24 時間放置した。残存活性を天然リゾチームの活性と比較することで収率を算出した。また、TRM での収率と、定法に従った 20℃で希釈法によるリフォールディングでの収率を比較し、TRM を評価した。

【結果・考察】20℃で添加剤なしの条件で、還元変性リゾチームを希釈法でリフォールディングさせたところ、5%程度の収率であった。しかし、TRM でトリス緩衝液など、アミンを持つ緩衝液を希釈溶液中に共存させてリフォールディングさせると、収率は 10%に増加し、さらに 1 M L-アルギニンと 100 mM トリス緩衝液(pH7.4)を希釈溶液とした場合の収率は 60%にまで増加した。また、TRM においては添加剤にアミン構造を含む緩衝液を用いた場合、特に効果が高いことが分かった。

希釈法の収率が低い理由は、還元変性タンパク質を希釈する際に、タンパク質中間体が相互作用して凝集することによる。TRM は 20℃での希釈法に比べて、リフォールディング後の上清に残るタンパク質濃度が多い。つまり、熱変性によってリフォールディング時の相互作用を弱め、さらに添加剤によって分子間の凝集を防いでいると考えた。それにより変性構造が活性のある構造へと戻る機会が増え収率が増加するのだろう。

本方法は、トリス緩衝液やアルギニンを添加しておき高温で希釈するという単純な方法である。従来法と比べてコストや時間の欠点も無く、収率が数倍に増加するため、様々なタンパク質のリフォールディングにも応用が期待できる。(特願 2003-370290 号)

キーワード: 封入体、リフォールディング、ジスルフィド結合、高温リフォールディング