

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580119

研究課題名（和文） 再生困難なタンパク質の普遍的な高濃度再生法の確立

研究課題名（英文） Establishment of high concentration Refolding of unstable protein

研究代表者

松元 俊彦（MATSUMOTO TOSHIHIKO）

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：60133568

研究成果の概要（和文）：私たちは以前尿素のような可溶化剤の濃度勾配的除去により、タンパク質の効果的な再生方法を確立した。しかし、この方法は不安定なタンパク質には効果的ではなかった。そこで、不安定なタンパク質が凝集体を形成しない可溶化剤濃度のもとで相当量の再生タンパク質を得るために、安定化剤を加える方法を開発した。多くの安定化剤を試した結果、最も良い安定化剤であった 40%グリセロール存在下で、高濃度(2.5mg/ml)の不安定タンパク質の 60%を再生することができた。この方法は不安定タンパク質の再生に対して、広く適応可能である。

研究成果の概要（英文）：Earlier, we formally established an effective refolding procedure for a protein by gradient removal of a solubilizer such as urea. However, this procedure was less effective for unstable proteins. We developed here an excellent method to add protein stabilizer so as to get reasonable amounts of folded protein under the concentration of solubilizer where the unstable protein does not form aggregate. We examined many stabilizers and found that 60% of a concentrated (2.5 mg/ml) unstable protein can be refolded using 40% glycerol as the best stabilizer. This procedure can be widely applicable for the refolding of unstable proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：再生・フォルディング・安定化剤・可溶化剤・不安定蛋白質

1. 研究開始当初の背景

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さが認識され、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。

2. 研究の目的

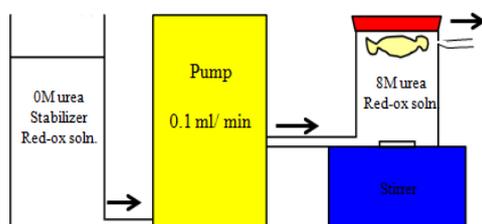
タンパク質は変性しやすく、またタンパク質工学的に生産されたタンパク質はほとんどが変性している。これを活性な形に再生することは、タンパク質の有効利用にとって、必須の過程である。しかしながら、変性タンパク質を効率的に再生させることは至難の業である。この問題を解決することができれば、医薬、食品、生物材料としてタンパク質を有効利用することができ、人類の健康と福祉に大いに貢献できる。

私たちは既に安定なタンパク質については、尿素の可溶化剤としての性質を利用して凝集を抑えながら再生させる画期的方法を開発した。この方法を再生困難なタンパク質(特に不安定なタンパク質)にまで広げることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 図に示すような申請者等が既に確立したタンパク質の再生法(酸化還元液中尿素濃度を徐々に8Mから0Mに薄めていくことより効率的に再生する)とイオン交換クロマトを用

Systematic renaturation device



いた再生率の追跡で行う。

不安定なタンパク質の再生にまで応用範囲を広げるために、安定化剤の共存を検討する。効果的な安定化剤については、安定化剤の最適濃度、最適液送時間等詳細な再生条件を決定する。

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(Cys6-Cys127)1個だけを切断してカルボキシメチル化した6,127CM-HELを調製してまずは用いる。この誘導体はHELに比べて24度も変性移転温度が低下しており、7.2Kcal/molも不安定になっている。この誘導体は溶菌活性で再生率を追跡できる利点

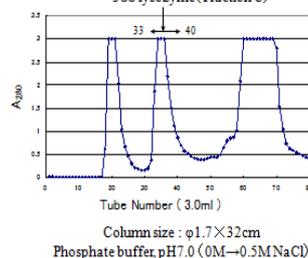
もある。申請者等はこの誘導体を既に調製した経験がある。

(2) 更なる効率再生を求めて、再生初期構造に影響を与える諸条件を検討する。透析法では時間がかかることより、新たに希釈法と溶菌活性を用いて、再生率を追跡しより有効な安定化剤を開発する。

4. 研究成果

(1) 3SS リゾチームの調製は、ニワトリ卵白リゾチーム 0.2g を 0.1M トリス塩酸緩衝液 pH7.8 10 ml に溶解し、ジチオスレイトール 5mM を添加し、20°C で 70 分還元した。還元後 0.25 mmol のモノヨド酢酸を添加し、20°C で 60 分間カルボキシメチル化した。遠心分離後 CM-トヨパールカラムに供与し、0~0.5M 食塩のリニアグラジエント法で溶出した。Fig.1 に示すように3つのピークが見られ、2つ目のピークをプールし脱イオン水に2日透析し、凍結乾燥した。収率は約10%であった、1つ目のピークは過剰の試薬による吸収であり、3つ目のピークはネイティブリゾチームの吸収である。2つ目のピークは、文献とほぼ同じ比活性及び熱安定性を示したことより、この標品を3SS リゾチームとし以下の実験に使用した。

Fig. 1 CM-Toyopearl 650M chromatography of partially reduced and CM-lysozyme 3SS lysozyme(Fraction C)



尿素濃度の低下に応じて、安定化剤濃度が上

Table1 Refolding yield of 3SS lysozyme renatured by gentle removal of solubilizerS in the presence of various stabilizers

Stabilizer (Conc.) [solubilizer]	Refolded yield(%)
None(-)[Urea]	30
None(-)[GuHCl]	11
Glycerol(40%) [Urea]	60
Glycerol(45%) [GuHCl]	56
Sucrose(0.5M) [Urea]	40
Sucrose(1M) [Urea]	33
Sucrose(2M) [Urea]	30
Sucrose(4M) [Urea]	34

As solubilizer, 8 M urea [Urea] and 5 M guanidium hydrochloride [GuHCl] were employed.

昇するような工夫を取り入れ、種々安定化剤を用いてその効果を検討した。可溶化剤として 8M 尿素または、5M グアニジン塩酸塩を用い、安定化剤として種々濃度のグリセリン、スクロース、サルコシン、硫酸アンモニウム、アルギニン等で検討した。その結果を表 1 および表 2 に示した。

Table2 Refolding yield of 3SS lysozyme renatured by gentle removal of solubilizerS in the presence of various stabilizers

Stabilizer (Conc.) [solubilizer]	Refolded yield(%)
Ammonium sulfate(2M)[Urea] ^a	11
Arginine(0.5M) [Urea]	40
Arginine(0.5M) + Glycerol(40%) [Urea]	39
Arginine(0.5M) + Glycerol(45%) [GuHCl]	22

As solubilizer, 8 M urea [Urea] and 5 M guanidium hydrochloride [GuHCl] were employed.

^a The dialyzate was redialyzed against deionized water for 1 day to desalt and then applied to the ion exchange column.

可溶化剤として尿素と塩酸グアニジンをを用いた結果、尿素が約 20%再生率を上昇させた。安定化剤として多価アルコールであるグリセリンおよびスクロースの影響を調べた結果、グリセリンでは、いずれの濃度でも再生収率を上昇させた。40%のとき最も高い再生収率 60% が得られた。スクロースでは、0.5M で最も高い再生収率 40% が得られた。アミノ基を含む化合物であるサルコシン、硫酸アンモニウム、アルギニンでは、効果的な再生収率を示すことはできなかった。

アルギニンは、タンパク質リフォールディングにおける添加剤として広く使用されている。しかし 3SS リゾチームのアルギニンを用いた再生実験より再生タンパク質として本来の構造に正しく巻き戻ってない可能性が示唆された。そこで、タンパク質再生反応に与えるアルギニンの影響の解析を進める

Table3 Refolding yield of native lysozyme and ribonuclease A renatured by gentle removal of solubilizers in the presence of various stabilizers

Protein: stabilizer (Conc.) [solubilizer]	Refolded yield(%)
Native lysozyme: none(-)[Urea]	80
Native lysozyme: Arginine(0.5M) [Urea]	51
Native lysozyme: Arginine(0.5M)[GuHCl]	40
Ribonuclease A: none(-)[Urea]	94
Ribonuclease A: Arginine(0.5M) [Urea]	100

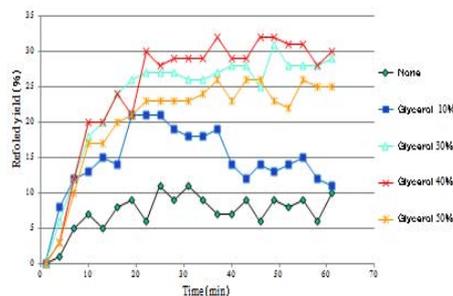
As solubilizers, 8 M urea [Urea] and 5 M guanidium hydrochloride [GuHCl] were employed.

ことにした。ネイティブリゾチーム再生反応への影響を解析後、比較実験としてリボヌクレアーゼ A 酸性反応へのアルギニンの影響の解析を行った。その結果を表 3 に示す。リゾチームの再生では、ピークはシャープさを欠き広がって溶出され、正しく巻き戻った産物の位置のピークが減少していた。以上の結果から、アルギニンはある種のリゾチーム再生中間体を安定化し、これから SS 結合が掛け違った不完全に巻き戻ったタンパク質が生産された。このような反応によりアルギニンはリゾチームの再生に対しては有害な影響を及ぼしたと思われる。一方、アルギニンのリボヌクレアーゼ A の再生では、巻き戻しは正しく行われ、再生効率はおよそ 100%であった。なお、アルギニン未添加の場合でも 94% 再生できた。したがって、アルギニンは試料とするタンパク質によっては有害な影響を及ぼす場合があることが分かった。このことはアルギニンが再生効率向上試薬として広く利用されている現状からして、非常に重要な発見である。

現在までの結果では、可溶化剤として 8M 尿素を用い安定化剤としてグリセリン (40%) を用いたときに最も良い再生率 60% を得た。この値は安定化剤を用いないときの 30% に比べ格段の向上である。かくして、かなり不安定なタンパク質を高濃度 (2.5mg/ml) で効率よく再生する方法が確立できた。

(2) 更なる効率再生を求めて、再生初期構造に影響を与える諸条件を検討した。透析法では時間がかかることより、新たに希釈法を用いて、3SS リゾチーム、リボヌクレアーゼ、完全還元リボヌクレアーゼの再生を行った。3SS リゾチームの再生は 8M 尿素及び 2-メルカプトエタノールで変性還元状態にし、様々な添加剤を含む溶液を用い 100 倍希釈で行っ

Fig.2 Refolding yeild of 3SS lysozyme renatured by dilution in the presence of glycerol



た。希釈後所定時間放置後の溶菌活性を測定し、還元なしの変性のみ溶菌活性を 100%とし、再生収率とした。添加剤としてグリセロールを用いた時の結果を図 2 に示した。それ以外の安定化剤の影響も調べ、新たにその結果を表 3~5 に示す。

Table3 Refolding yield of 3SS lysozyme renatured by dilution in the presence of various stabilizers(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

この条件では、添加剤なしの場合、再生収率は約 10%と低かった。安定化剤として多価アルコールであるグリセリンおよびスクロースの影響を調べた。グリセリンの場合においては、どのグリセリン濃度添加でも再生収率を向上させることができた。40%の濃度で

Table4 Refolding yield of 3SS lysozyme renatured by dilution in the presence of various stabilizers(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

Table 5 Refolding yield of 3SS lysozyme renatured by dilution in various buffer

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 (0.2M)	47
	9

添加したとき、最も高い再生収率 30%を得ることができた。

スクロースの場合においても、どのスクロース濃度添加でも再生収率を向上させることができ、1M 濃度添加したとき最大約 25%の再生収率を示し、無添加より約 2 倍上昇した。

それ以外のアミノ基を含む化合物であるサルコシンやアルギニンは顕著な上昇は認められず有害な影響を及ぼした。

一方、アセトニトリルは 5%添加で約 4%の上昇を示したことより、水に不溶性化合物の影響を調べられることが期待できる。

緩衝液の影響を調べた結果、リゾチームの実験で良く用いられているリン酸緩衝液では有害な影響を示した。イミダゾール塩酸緩衝液では、0.15M で約 4%の上昇を示し、さらに、40%グリセロールを含む 0.15M イミダゾール塩酸緩衝液を用いて再生を試みたところ、今回の実験で最も高い再生収率 47%を得ることができた。

現在はリゾチーム以外のリボヌクレアーゼ、完全還元リボヌクレアーゼを用いた再生を行っている。今後は高分子量のタンパク質やサブユニット構造をもつタンパク質に広げていき、普遍的な方法を確立していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kohyama K, Matsumoto T, and Imoto T. Refolding of an unstable lysozyme by gradient removal of a solubilizer and gradient addition of a stabilizer. J. Biochem. 査読有、143 巻 2010 427-431

[学会発表] (計 1 件)

保田達哉、野稻俊宏、松元俊彦、安藤祥司、井本泰治、不安定タンパク質の効率的な再生法の確立、日本農芸化学会、平成 24 年 3 月 24 日、京都女子大

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井本 泰治(IMOTO TAIJI)(H21 年)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：90038282

松元 俊彦 (MATSUMOTO TOSHIHIKO)
(H22~23 年)
崇城大学・生物生命学部・准教授
研究者番号：60133568

(2) 研究分担者

松元 俊彦 (MATSUMOTO TOSHIHIKO)

(H21 年)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：6013356

山浦 泉 (YAMAURA IZUMI) (H21 年)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：30133565