



1. 研究課題名

より良い透析膜の開発を目指して

-人工透析膜における変性タンパク質の吸着特性と相互作用の解明-

2. 研究成果

【緒言】 PMMA(ポリメチルメタクリレート)膜は 東レ(株)製の内表面から外表面まで均一な均質構造を有する合成高分子膜であるが、中・大分子量物質の除去性能が高く、特に除去が困難とされている透析アミロイド症を引き起こすβ2-ミクログロブリン(β2-MG)の吸着除去に優れている。しかしながら、その吸着メカニズムははまだ解明されていない。より高効率にβ2-MGを取り除くことができる透析膜の開発のために透析膜-タンパク質間の吸着特性を明らかにする必要がある。本研究では、β2-MGのモデルタンパク質として、同等の分子量を有するリゾチームを用いる。あらかじめ変性剤により変性させた試料を作製し吸着実験を行い、タンパク質立体構造に起因する透析膜-タンパク質間の吸着特性の検討を行った。

【実験操作】 リゾチーム(卵白由来, 14.3 kDa)を0.01 M及び0.02 M NaOH溶液を用いて変性させた。透析により水に置換した後、凍結乾燥装置を用いて変性リゾチームの粉末試料を作製した。未変性及び作製した各変性リゾチームの構造解析を行った。また、作製したPMMA中空糸膜内臓ミニモジュールを用いて、各塩濃度溶液内での未変性及び各変性リゾチームの吸着実験を行った。循環時間後における溶液中のリゾチーム濃度をDC™ (界面活性剤対応) プロテインアッセイ(BIO-RAD)により定量し、初濃度の差から吸着率を算出した。

【実験結果】 分光蛍光光度計を用いてTrp蛍光における最大蛍光波長の測定を行った結果、波長に大きな違いは確認されなかったため、未変性及び各変性リゾチーム内におけるTrp残基は同様の親水性・疎水性環境であることが明らかとなった。Fig. 1 に円二色性(CD)分散計を用いて2次構造の解析を行った結果を示す。各ピークの特徴より、未変性及び変性リゾチームは同じα-ヘリックスにより構成されていることが明らかとなった。Fig. 2 (a) にSDS-PAGEにより各リゾチームの分子量の評価を行った結果を、Fig. 2 (b) にNative-PAGEにより分子量・電荷・高次構造の評価を行った結果を示す。各リゾチームのバンドが同じ位置に出現したため、未変性及び各変性リゾチームはこれらの評価方法において明確な違いは観察されなかった。また、水相二相分配法により各リゾチームの表面疎水度の測定を行った結果、同様の表面疎水性を有することが明らかとなった。しかしながら、未変性リゾチームおよび0.01M NaOH、0.02M NaOH変性リゾチームを用いて吸着実験を行った結果、未変性リゾチームと各変性リゾチームでは塩濃度の違いによって吸着挙動に違いが観察された(Fig. 3)。このことから、PMMA膜へのリゾチームの吸着は、リゾチームの微小な構造変化が関係しており、静電相互作用による吸着に影響を与えていると推察された。

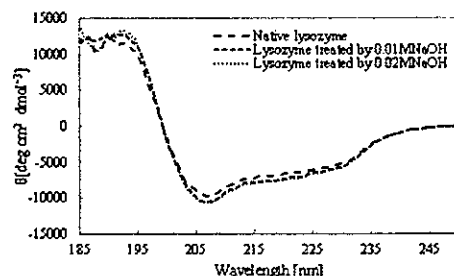


Fig.1 CD spectrum of each lysozyme.

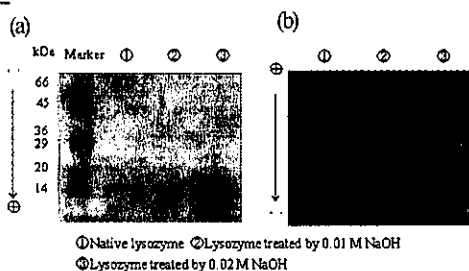


Fig.2 (a) SDS-PAGE (b) Native-PAGE

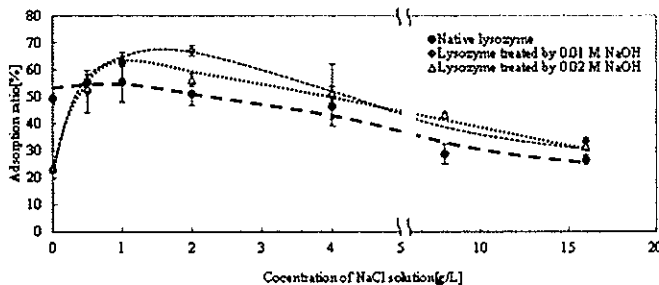


Fig.3 Adsorption ratio of each lysozyme in the various concentration of NaCl solution.

3. 助成金使用内訳 (助成額 200,000円)

備品費	0円
消耗品費	200,000円
旅費	0円
その他の経費	0円