

## 論文の内容の要旨

論文題目 Refolding of firefly luciferase immobilized on a solid surface  
(ホタル・ルシフェラーゼの固相上リフォールディングに関する研究)

氏名 座古 保

### 1. 緒言

大腸菌内で大量発現させると封入体を形成してしまう組換え蛋白質を変性させた後、固相上に固定化して巻き戻しを行う方法は、変性蛋白質の再凝集を防げるので、蛋白質の巻き戻しを高濃度条件で行うことが可能となり、工業的な蛋白質巻き戻しプロセスの簡略化に有効だと考えられる。しかし、固相上での蛋白質の巻き戻しに関する研究は少なく、特に溶液中（液相）での巻き戻しとの差異については知見がほとんどない。又、これまで固定化蛋白質の巻き戻りを、活性以外でモニタリングする手法はなく、活性の評価が困難な場合には巻き戻し条件の検討ができないという問題点もあった。本研究では、ホタル・ルシフェラーゼ（北アメリカ生息の *Photinus pyralis* 由来：以下 PpL と略）をモデル蛋白質として、固相上での巻き戻し条件の検討や、固定化方法の検討、新規なモニタリング手法の検討などを行った。PpL をモデル蛋白質とした理由は以下の通りである。1) ルシフェリンを基質とした発光により、活性を簡便に感度良く測定することができる。2) 液相での巻き戻りについての既知の知見との比較が可能である。3) 液相では、PpL は非常に凝集しやすく、低蛋白質濃度でしか効率的に巻き戻らないので、巻き戻し時における蛋白質の高濃度化への固定化の効果を確かめるのに適している。

## 2. アガロースビーズに固定化した PpL の巻き戻しについて

PpL は溶液中では凝集しやすく、巻き戻しは低蛋白質濃度(2~5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )条件下で行う必要がある。本実験では、PpL を固相上に固定化することによって、巻き戻し時の蛋白質の高濃度化を試みた。固相としては NHS-activated Sepharose 4E(Pharmacia)を用い、PpL をアミンカップリング法により固定化した。これを変性バッファー(6M GdnCl)で12時間変性させた後、巻き戻しバッファー(100 mM potassium phosphate, pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)によるバッファー交換により巻き戻しを開始し、活性の回復率を測定した。また、液相での巻き戻しには、変性させた PpL をバッファーで100倍希釈することで巻き戻しを開始した。PpL の固相上での巻き戻り収率の経時変化を Fig. 1 に示す。巻き戻りに数十時間を要しているが、溶液中での巻き戻りでも同様のことが観測されている。

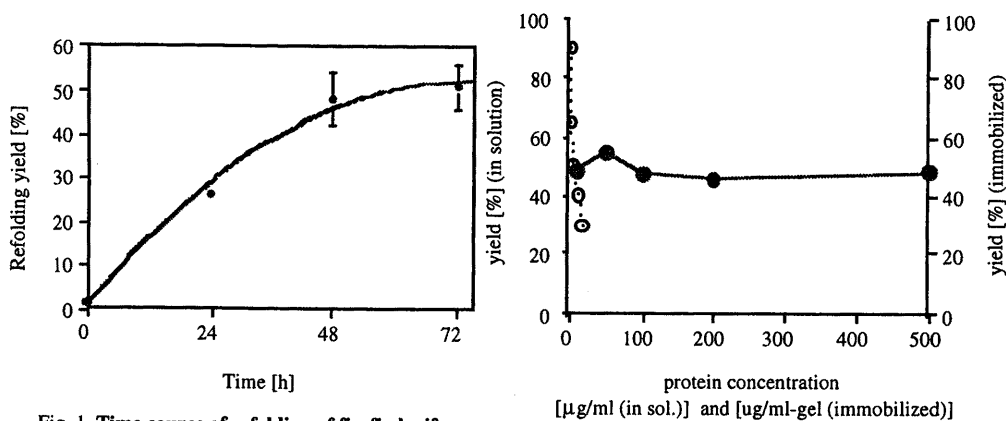


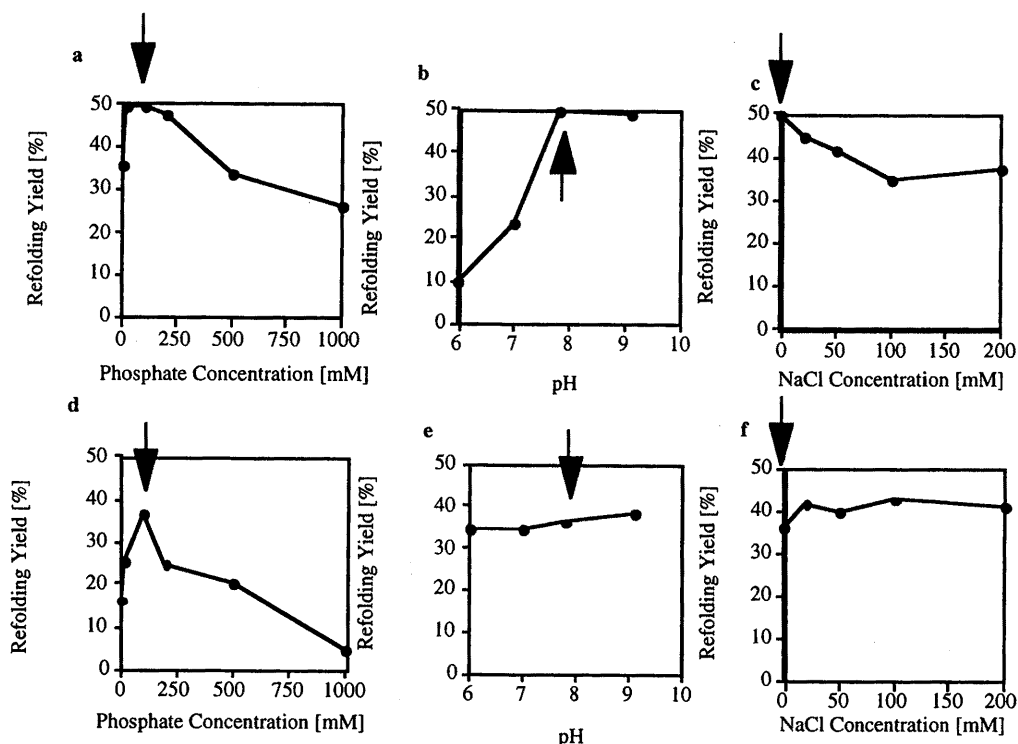
Fig. 1 Time course of refolding of firefly luciferase immobilized on agarose beads.

Fig. 2 protein concentration dependence of refolding yields. Symbol: open circle, refolding of soluble luciferase; closed circle, refolding of immobilized luciferase. Data of refolding yield of soluble luciferase was taken from R. Herbst *et al.* (97) *J. Biol. Chem.* 272, 7099

次に巻き戻り収率(巻き戻し開始72h後)の、濃度依存性を調べたところ、液相では、蛋白質濃度が高くなるにつれ、回復率が著しく低下するのに対し、固相ではほとんど変化しなかった(Fig. 2)。これは、固相に固定化されることにより、変性蛋白質分子間の相互作用が低減したためと考えられる。巻き戻り収率が50%となる蛋白質濃度を比較すると、固相に固定化することで、液相の場合と比べて約100倍の高濃度化に成功した。

さらに、巻き戻しバッファー条件についても検討し、液相中での巻き戻しの結果との比較を行った。ここでは、potassium phosphate濃度、pH、添加塩濃度を変えて、巻き戻り収率をそれぞれ求めた。すると、液相と固相では、pHに対する依存性がかなり異なっていた(Fig. 3)。すなわち、液相ではpH依存性がほとんど見られないのに対して、固相

では pH 8 未満では収率が下がっており、これは固相に特有であった。低 pH で低収率なのは、ゲル担体と蛋白質間の正負の静電的相互作用が蛋白質の巻き戻りを抑制したためと考えられる。このように、固相と蛋白質間の相互作用は、巻き戻り収率を下げる可能性があることが分かった。



**Fig. 3 Refolding yields of immobilized firefly (*Photinus pyralis*) luciferase (a, b, c) and luciferase in solution (d, e, f) under various phosphate buffers.**  
 Arrows in the figure indicates the standard buffer condition for the renaturation of luciferase in solution (100 mM potassium phosphate, pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)

### 3. Cystein による単点固定化の後の巻き戻しについて

上記の実験では固定化にアミンカップリング法を用いているが、N 末端アミノ基以外に、表面上の Lys 残基も固定化に用いられている可能性がある。しかし、実際の工業プロセスで、固相上での巻き戻しを行い、蛋白質を回収するには、可逆的に固定化と解離を行うことができる方法で変性蛋白質を単点で固定化する必要がある。固定化には affinity tag を用いる方法もあるが、ここでは Cys 残基によるジスルフィド(SS)結合を用いた。PpL には元来4つの Cys 残基があるが、それらを全て Ser 残基に置換した PpL 遺伝子を手に入れ、次にこの遺伝子の N 末端と C 末端にそれぞれ Cys 残基を導入した遺伝子

を製した(PpL(N-cys), PpL(C-cys)). これらの遺伝子を導入した大腸菌から発現、精製した改変体を PDEA で活性化した NHS-activated Sepharose に固定化し、2. と同様に変性、巻き戻しを行った(Fig. 4). すると、単点固定の方では、約 12 時間で巻き戻りがほぼ終了し、液相の場合の約 72 時間と比較して巻き戻りが早いことが分かった. この理由についてはさらなる検討を要する.

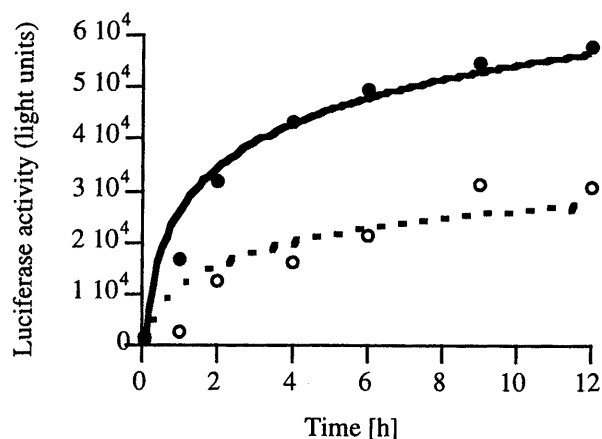


Fig. 4 Time course of refolding of firefly luciferase single-point-immobilized on agarose beads. Symbol: closed circle, N terminus immobilized PpL; open circle, C terminus immobilized PpL.

#### 4. SPR センサーを用いた固相上の蛋白質の巻戻りのモニタリングについて

ラベル化されていない蛋白質の固相での巻き戻りについては、例外的な場合を除き今まで酵素活性以外でこれをモニタリングする方法はなかった. しかし、酵素活性を測定することが困難な蛋白質もあり、他のモニタリング方法の開発が必要である. 液相系で蛋白質の二次構造情報を得る手段としては、CD スペクトルが一般的に使われているが、固相に固定化した蛋白質の巻き戻りのモニタリングに用いるのは困難であった. そこで今回我々は SPR センサーを用いることを考えた. SPR センサーは、センサーチップ表面の屈折率変化をリアルタイムで測定することができ、通常は、チップ表面に固定化されたりリガンドに対する、アナライトの結合・解離を観察するものである. 今回、屈折率変化と蛋白質の構造変化との相関から、チップに固定化した蛋白質の変性、巻き戻り過程をモニタリングできないかと考えた.

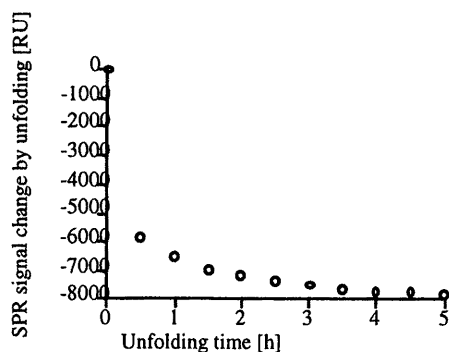


Fig. 5 SPR signal change of the luciferase-immobilized surface by unfolding treatment.

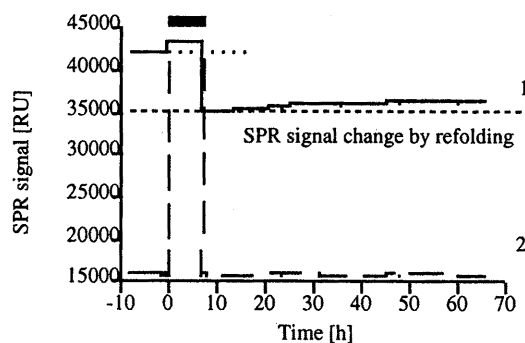


Fig. 6 Typical SPR signal time courses of the luciferase-immobilized (1: solid line) and reference (2: broken line) surface in response to GdnCl injection.

SPR センサーとしては BIAcore2000 を用いた。センサーチップに PpL をアミンカップリング法で固定化した。次にランニングバッファーとして巻き戻しバッファーを流した後、変性バッファーに切り替えた。すると、変性バッファーにより、SPR シグナルが低下した (Fig. 5,6)。蛋白質を固定化していない対照レーンでは変性前後でのシグナル変化はなかったため、そのシグナル低下は変性によるものだと考えられる。さらに、PpL 固定化レーンについては、巻き戻しバッファー中でシグナルの上昇が見られた (Fig. 6)。これは、固定化 PpL の巻き戻しを反映していると考えられる。

次に、変性処理による SPR シグナル変化についてさらに検証を行った。すなわち、SPR シグナルは屈折率を反映しているため、変性によるシグナル変化 (dRU) と屈折率変化 (dRI) は一致するはずである。そこで、PpL 溶液の屈折率を直接測定することで、蛋白質の変性による屈折率変化を求め、それとシグナル変化を比較した (Fig. 7)。変性による

屈折率量と、変性処理によるシグナル低下量がほぼ一致することから、変性処理によるシグナル低下は、変性に伴う蛋白質の屈折率変化に起因することが強く示唆された。

ランニングバッファーを変性バッファーから巻き戻しバッファーに切り替えた後のシグナルの回復率の経時変化を Fig.8 に示す。SPR シグナルの回復率は、変性処理によるシグナル低下量に対するシグナル増加量の割合によって示した。ここで巻き戻り終了に数十時間かかっているが、これは溶液中での巻き戻りや、アガロースビーズに固定化した PpL の巻き戻りの結果と一致する。シグナルの増加と巻き戻りの相関を示すために、以下の 2 つの実験を行った。まず BIAcore のセンサーチップを取り出し、直接基質を加えることでセンサーチップに固定化した PpL の 72h 後の巻き戻りを確認した。さらに別途、変性剤処理直後のセンサーチップを取り出すことで、失活も確認した。ただし、センサー

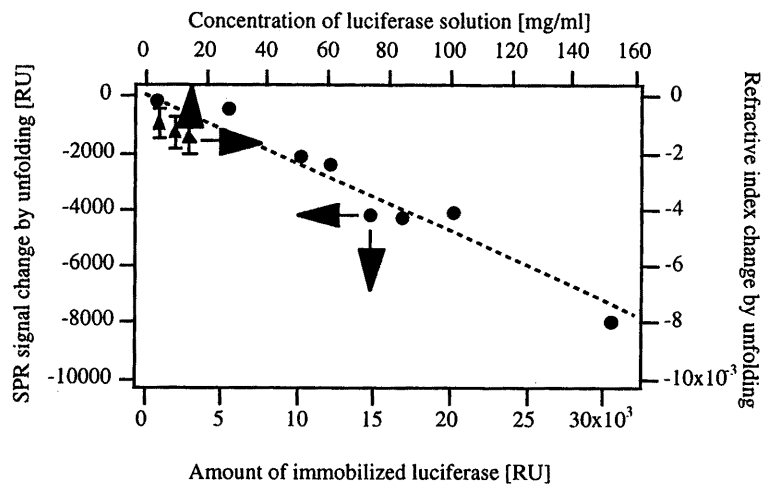


Fig. 7 Correlation of SPR signal change by unfolding with refractive index change by unfolding. Symbol: circle, correlation of SPR signal change by unfolding and immobilized protein amount; triangles, correlation of refractive index change by unfolding and concentration of luciferase solution. Arrows indicates the correspondence of each symbol to the x- and y axis.

チップ上に固定化された PpL の量が極めて少量であるため、活性の有無は見られたが、巻き戻り途中での収率を定量的に議論できるほどの精度が得られなかった。よって次に表面に同じ活性基を持つアガロースビーズに固定化した場合の実験結果との比較を行った (Fig. 8,9)。特に、固定化時での、過剰 NHS 基のエタノールアミンによるブロッキングの有無による収率の違いを比較したところ、ブロッキングをした方が収率が高いという点で一致した。これは、ブロッキングを行わない場合、NHS が加水分解され、カルボキシル基が露出することになり、COO が巻き戻りを阻害しているからだと考えられる。これは 2 での考察と一致する。これらの結果より、SPR センサグラムの上昇は巻き戻りと相関があることが強く示唆される。しかし、アガロースビーズに固定化した場合の結果とは収率に差異が見られ、モニタリングは定性的であると考えられる。さらに、この結果は、センサグラムが、固定化時の条件の差異が巻き戻りに与える影響を反映していることを示し、SPR センサーが固定化蛋白質の巻き戻り条件検討などに用いることができる可能性を示唆するものである。

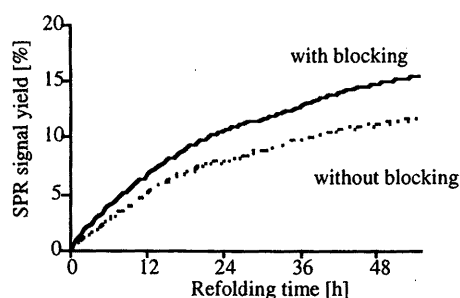


Fig. 8 Time course of refolding of firefly luciferase immobilized on the sensor surface with/without blocking of the excess NHS-groups.

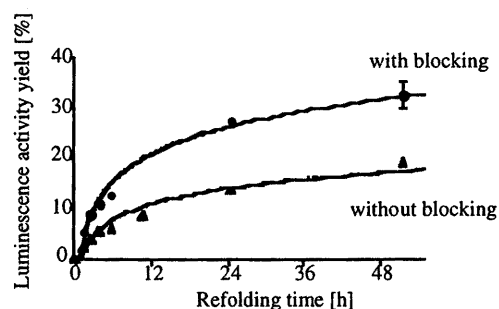


Fig. 9 Time course of refolding of firefly luciferase immobilized on agarose beads with/without blocking of the excess NHS-groups.

## 5. 結言

凝集しやすく、巻き戻りにくい蛋白質の一つのホタル・ルシフェラーゼ(PpL)を、固相上で巻き戻すことで、凝集を抑え、高濃度で巻き戻すことに成功した。また、固相上での巻き戻し条件と液相中での巻き戻り条件の違いについて議論した。さらに遺伝子改変により、システイン残基を導入した改変体を作製し、単点で固定化した PpL の巻き戻しを行った。また、SPR センサーを用いて、固相上の巻き戻しをモニタリングできる可能性があることを示した。