

審査結果の要旨

論文提出者氏名 座古 保

大腸菌内で組換え蛋白質を大量発現させると封入体を形成する場合が多い。このような封入体を可溶化剤で一旦変性させた後、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小規模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基礎研究は少なく、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。また、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。

本論文では、凝集しやすい蛋白質の代表例の一つであるホタル・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バッファー条件、固定化方法、固相修飾条件などが高蛋白質濃度での巻き戻し条件、巻き戻り時間、収率に及ぼす影響や、巻き戻り過程の新規なモニタリング手法に関する研究の成果を述べており、以下の6章から構成されている。

第1章は序論であり、本研究の背景と目的を述べている。

第2章では固相上での巻き戻し、ホタル・ルシフェラーゼの発光反応機構及び巻き戻しに関する既往の研究、SPR（表面プラズモン共鳴）センサーの原理及び使用例について述べている。

第3章では、PpLの固相での巻き戻しについて、バッファー条件、固定化方法、固相修飾条件などが巻き戻し収率に与える影響の検討結果について述べている。すなわち、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のに対して、PpLを固相上にアミンカップリング法で固定化することによって、巻き戻し時の蛋白質濃度を100倍以上に高濃度化することに成功したことを報告している。さらに、固相上での巻き戻しバッファー条件の最適化を行い、液相中での巻き戻し条件とほぼ同じであることを明らかにしている。しかし、液相と固相では、pHに対する依存性がかなり異なっており、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ることから、このpH領域で負に帯電するゲル担体と、正に帯電する蛋白質間の静電的相互作用が蛋白質の巻き戻りを抑制したものと考察している。この結果をもとに、PpL固定化時の残存NHS(N-hydroxysuccinimide)基のブロッキングが、収率に与える影響を調べ、負電荷を持ったカルボキシル基が固相上に多く存在する、ブロッキ

ングを行わない方が収率が低いことを報告している。さらに、様々なアミノ酸で固相を修飾した場合の巻き戻し収率を調べたところ、負電荷を持つアスパラギン酸以外のほとんどのアミノ酸による修飾が収率の向上に寄与することを明らかにしている。特に、疎水性の高いバリンと、疎水性、極性両方の性質を合わせ持つシステインで修飾すると巻き戻し収率が顕著に向上することを報告している。また、アミンカップリング法では、N末端アミノ基以外に、表面上のリジン残基も固定化に用いられる、すなわち多点固定の可能性があるため、システイン残基によるジスルフィド(SS)結合を用いた単点固定化法を検討している。その結果、単点固定の場合には、約20時間で巻き戻りがほぼ終了し、多点固定、液相の場合の約72時間と比較して巻き戻し時間を短縮することに成功している。

第4章では、PpLのN端ドメインのみを発現する系を遺伝子工学的手法を用いて構築し、N端ドメインの固相上での巻き戻しについて得られた成果について述べている。すなわち、PpLがN端ドメインのみで発光活性を持つことを世界で初めて確認し、活性測定条件を最適化し、固相上での巻き戻しを行ったところ、野生型に比べ、非常に短時間（6時間以内）に巻戻ることを報告している。これは、PpLがN端、C端の複数ドメインから成り、巻き戻しの過程でドメイン間の相互作用があったのが、単一ドメインにしたためその影響が無くなったことが原因だと考察している。

第5章では、SPRセンサーを用いた固相上の蛋白質の巻き戻りの新規モニタリング法の開発についての成果を述べている。すなわち、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。ここでは、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るSRPセンサーを用いて、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する手法を提案し、その手法の有用性を実験的に検証している。さらに、固相修飾条件の差異が巻き戻りに与える影響をSPRシグナル変化でとらえることができることを示し、SPRセンサーを固定化蛋白質の巻き戻し条件の検討などに用いることができる可能性を示している。

第6章は本論文の総括と結言である。

以上、本論文は、凝集しやすく、巻き戻りにくい蛋白質の一つのPpLとそのN端ドメインを対象として、固相上での巻き戻しバッファー条件や固定化法、固相修飾条件などが高蛋白質濃度での巻き戻し条件、巻き戻り時間、収率に及ぼす影響を検討し、新たな知見を得ている。また、SPRセンサーによる、固相上の巻き戻りの新規なモニタリング方法を提案するなど、蛋白質巻き戻し技術の向上に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。