

## 審査結果の要旨

論文提出者氏名 萬年 輝久

組換えタンパク質性医薬品の需要の拡大を背景に、大腸菌を宿主とした異種タンパク質発現系は、工業生産プロセスにおけるタンパク質生産法の一つとして現在広く用いられている。大腸菌による発現産物は、しばしば封入体と呼ばれる不活性な不溶性タンパク質粒子として得られる。従来は、活性を持った天然型のタンパク質を得るために、まず強力なタンパク質変性剤を用いて封入体を可溶化し、目的タンパク質を変性状態で高純度に精製した後で、リフォールディングと呼ばれる操作によって天然型のタンパク質立体構造に巻き戻している。この操作は、研究開発費や生産コストに大きな影響を与えるステップであるにも関わらず、工業生産プロセスの観点から行われたリフォールディング研究の例は少なく、大幅なコスト削減や、スケールアップが容易に行えるリフォールディング手法の開発が望まれていた。

本論文は、現在最も広く用いられている大希釈法と呼ばれるリフォールディング手法が抱える問題点の解決の方向性について論じている。まず、既に臨床試験が行われている医療用タンパク質、GDF5（骨形成誘導因子の一種）の現行生産プロセスをダイレクトリフォールディング法によって改良することにより、大幅なコスト削減を実現している。次に、固相化人工シャペロンを用いた新しいリフォールディング手法を提案し、この固相化人工シャペロンがリサイクル可能であり、リフォールディング系のスケールアップも容易であること、また、高いリフォールディング効率を得られることをモデルタンパク質 $\alpha$ -glucosidase を使って示している。最後に、固相を用いたリフォールディング条件の最適化のためには、固相上タンパク質の新しい構造追跡法が不可欠であることを指摘し、表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したバイオセンサーを用いて、そのモニタリング系の構築を試みている。

論文の構成は以下の通りである。

第一章は序論であり、研究の背景と目的について述べている。

第二章では、医療用タンパク質 GDF5 のリフォールディングプロセスの大幅な改良について報告している。天然型 GDF5 は疎水性が極めて高く、イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィー樹脂に不可逆的に吸着するという性質を有しているため、精製操作の大部分を変性型モノマーの状態で行わなければならない。したがって、現行の精製プロセスでは、リフォールディングステップが精製工程後期に位置し、これ以前に使用されるすべての緩衝液に、変性状態の維持剤として 6 M 以上の尿素および還元剤 DTT が含有されている必要が有る。ここではまず、リフォールディング操作を封入体可溶化の直後に行う方法（ダイレクトリフォールディング法）を提案し、リフォールディング条件の再検討を行っている。その結果、3 倍の GDF5 濃度において、リフォールディング効率を 36% から 63% に向上させることに成功している。さらに、続く精製操作を限外ろ過膜による溶媒置換を中心に再構築することにより、精製プロセス全体の収率を 8% から 20% に改善している。また、得られた最終産物とその不純物プロファイルを同定し、従来法と同等の品質が達成されていることを確

認している。以上の結果をもとに、上市後 10 年間の生産コストを試算し 42%のコスト削減が可能となったことを示している。

第三章では、人工シャペロン法に基づく新しい固相リフォールディング法の開発について述べている。既往の液相人工シャペロン法では、その構成成分である SDS などの界面活性剤および $\beta$ -シクロデキストリンが溶解した状態で添加される。したがって、リフォールディング終了後、タンパク質とこれらを分離するゲルろ過クロマトグラフィーなどの精製ステップが不可欠であり、コストと手間がかかっていた。また、これら SDS、 $\beta$ -シクロデキストリンを回収して再利用することもコスト的な点から容易ではなかった。ここでは、これらの問題点の解決を目的として、 $\beta$ -シクロデキストリンのポリマービーズを固相化人工シャペロンとして利用することを試みている。 $\alpha$ -glucosidase 濃度 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の条件では、従来の大希釈法、液相人工シャペロン法では最適条件でのリフォールディング効率がそれぞれ約 8%、60%程度であるのに対して、固相化人工シャペロンを用いた場合には 75%を達成できることを見い出している。続いて、SDS を捕捉した $\beta$ -シクロデキストリンのポリマービーズを遠心分離操作で回収することにより、上清中のリフォールディングしたタンパク質を簡単に分離精製できることを示している。さらに、この系のスケールアップを目的として、このビーズを充填した流動床型カラムを組み込んだリフォールディング精製装置を構築している。この装置により、スモールスケールのバッチ法と同じリフォールディング効率が得られることを示し、また、スケールアップも容易に行えることを明らかにしている。さらに、このビーズの再生を純水による洗浄のみで簡便に行うことができ、固相人工シャペロンのリサイクル使用が可能であると述べている。

第四章では、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサを用いた固相上タンパク質の新規構造追跡法について述べている。一般に、タンパク質のリフォールディング効率は、その酵素活性を指標に評価されるが、医療用タンパク質の場合には、生物活性の測定が簡便でないことが多い。さらに、種々の分光学的構造追跡法は、固相上のタンパク質に対しては適用が困難である。ここでは、固相上タンパク質の構造追跡に SPR センサの利用を提案している。具体的には、まずセンサ表面に固定化したタンパク質に、酸およびアルカリを作用させて構造変化を誘導し、その際に得られるシグナルを分析することにより、二種の変化量が検出されることを見い出している。さらにそれらが、固定化タンパク質の荷電状態の変化およびコンフォメーション変化をそれぞれ反映していることを示し、SPR センサによって、固相上タンパク質の構造変化が追跡できる可能性を明らかにしている。

第五章は本研究の総括と展望を述べている。

以上、本論文は、工業生産プロセスに適用可能なリフォールディング手法の開発を目標として、「ダイレクトリフォールディング法」、「固相人工シャペロン法」および「SPR センサによる固相上タンパク質の構造追跡法」を開発し、それらの実用性を実験的に示したものであり、固相利用に基づくリフォールディング手法の開発と発展に大きく寄与するところ大である。

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。