

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名

山口 哲志

ポストゲノムの研究成果を基に、今後、組み換えタンパク質医薬品の開発がますます進められると考えられる。このような背景から、安価・迅速なタンパク質大量生産システムの構築が求められている。現在、組み換えタンパク質の大量生産方法として、大腸菌を宿主とし目的タンパク質を不溶性の封入体として発現させる方法が最も一般的である。この方法は、目的タンパク質が濃縮された形で得られるため、その後の回収・単離・精製が容易となるという工業的な利点を有するが、封入体は不活性型の目的タンパク質の凝集体であるため、これを可溶化した後に天然型構造に誘導するリフォールディング操作が必要となる。そのため、リフォールディングによる活性型タンパク質収率の向上は、低コストのタンパク質生産システムの構築に必要な不可欠である。

本研究では、リフォールディング収率の著しい低下を招くリフォールディング中間体の凝集反応を効果的に抑制するために、凝集抑制剤である界面活性剤のリフォールディング中間体に対する作用機序を詳細に検討している。さらに、この検討結果を基に、界面活性剤とそのホスト化合物を用いた、迅速かつ高効率なリフォールディング法の開発に成功している。

第1章では研究の背景、研究目的について述べている。

第2章では表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用したバイオセンサー (SPR センサー) を用いて、センサー表面上に固定化したタンパク質に対する界面活性剤の吸着量が測定できること示し、さらに、非イオン性の界面活性剤の吸着量を疎水性プローブとして、固定化タンパク質の構造変化が追跡できることを実証した結果について述べている。ここでは、SPR センサーの金薄膜表面上のデキストラン担体に $\alpha$ -Glucosidase (Gluc) を共有結合的に固定化し、金薄膜に接する流路系に流した界面活性剤の固定化 Gluc の疎水性表面への吸着に伴う屈折率変化を測定している。まず、吸着に伴うタンパク質立体構造への影響がほとんどないことが報告されている非イオン性界面活性剤 Triton X-100 (TX) を種々の濃度で流路系に流し、各濃度条件下での TX のタンパク質吸着に伴う SPR シグナルの変化量を測定している。実験結果を Brunauer-Emmett-Teller (BET) の吸着等温式を用いて解析し、得られたシグナル変化量 $\Delta S_m$  が TX の第一層吸着量を反映していることを実証している。次に、シグナル変化量を用いて固定化 Gluc の構造変化が追跡できることを実証するために、固定化 Gluc を 0~3M の塩酸グアニジン濃度で変性し、その前後での $\Delta S_m$  の変化量 $\Delta\Delta S_m$  を測定している。また、同時に、各変性操作後の固定化 Gluc の残存活性も測定している。各塩酸グアニジン濃度における $\Delta\Delta S_m$  と残存活性とを、それぞれ不活性型酵素と活性型酵素の二状態平衡を仮定して解析した結果、両者の平衡中点が一致したことから、固定化 Gluc の失活に伴う構造変化を反映して $\Delta\Delta S_m$  が増加することが実証できたと述べている。これらの結果から、SPR センサーを用いて固定化 Gluc への TX の吸着量を測定することが可能であり、その吸着量を指標に固定化 Gluc の構造変化が追跡可能であると結論づけている。

第3章では第2章で開発した TX 吸着量測定法が他のタンパク質にも適用可能であり、得られたシグナル変化量を用いて固定化タンパク質の表面疎水性が定量できることを示している。さらに、固定化 hen egg lysozyme (HEL) に変性還元操作を施し、変性還元操作によって疎水性の高いリフォールディング中間体に誘導されたことを TX 吸着量測定法によって実証した上で、そのリフォー

ルディング中間体と種々の界面活性剤の相互作用を測定している。まず、5種類の固定化タンパク質に対し TX 吸着量の測定を行い、固定化タンパク質の総電荷に応じて SPR シグナルが変化することが示唆されたため、種々の荷電性の低分子量化合物を固定化したセンサー表面を作製し、電荷の影響を調べている。その結果に基づき、電荷の影響を補正した解析式を用いて種々の固定化タンパク質への TX の第一層吸着量を反映する  $\Delta S_m$  を求めている。このような  $\Delta S_m$  が水性二相分配法を利用して求めたタンパク質の表面疎水性の文献値と極めて高い相関があることを示し、 $\Delta S_m$  を用いて固定化タンパク質の表面疎水性を迅速かつ簡便に定量できると述べている。次に、固定化された HEL の凝集性リフォールディング中間体とリフォールディング用添加剤として広く使われている 6 種類の界面活性剤との相互作用を調べ、界面活性剤の凝集性リフォールディング中間体に対する吸着平衡定数  $K_a$  および脱着速度定数  $k_d$  を求めことに初めて成功している。また、これらの界面活性剤の  $K_a$  および  $k_d$  の比較から、一般に  $K_a$  が大きい界面活性剤は  $k_d$  が小さく、 $K_a$  が小さい界面活性剤は  $k_d$  が大きいことを明らかにしている。さらに、これらの界面活性剤を含む緩衝液を用いた希釈法による変性還元 HEL のリフォールディング収率と界面活性剤の  $K_a$  および  $k_d$  との比較の結果、 $K_a$  の大きな界面活性剤を用いると低濃度（数 mM 以下）の添加で最終的に高い収率を達成することが可能であるが  $k_d$  が小さいため収率の向上に長時間（48 時間以上）を要することを見出している。一方  $k_d$  の大きな界面活性剤を用いると短時間（6~12 時間）に収率を向上させることが可能であるが、 $K_a$  が小さいため高濃度（数十~数百 mM）の界面活性剤を添加する必要があり最終的な収率も低いという、界面活性剤添加リフォールディング系における界面活性剤の選定指針、操作指針を見出している。

第 4 章では、 $K_a$  の大きな界面活性剤を用いた場合に、 $k_d$  が小さいため収率の向上に長時間を要するという問題点を解決するために、界面活性剤のホスト化合物である不溶性のシクロデキストリン (CyD) ヒドロゲルビーズを新たに合成し、これを系に添加した新規リフォールディング技術の開発について述べている。すなわち、不溶性 CyD に界面活性剤を迅速に包接させることにより界面活性剤の見かけの  $k_d$  を大きくし、迅速に効率良くリフォールディングを行う固相人工シャペロン法について検討している。Acryloyl 基を導入した  $\beta$ -CyD と Acrylamide, *N,N*-methylene bisacrylamide とを共重合して合成した CyD ヒドロゲルビーズを、陽イオン性界面活性剤である CTAB を用いた変性還元 HEL のリフォールディング系に応用し、CyD 含有量が高いヒドロゲルビーズほどリフォールディング収率が向上することを示している。また、CyD ヒドロゲルビーズを用いた固相人工シャペロン法は、変性 Carbonic anhydrase B や変性 Gluc のリフォールディングにも有効であることも示し、 $\beta$ -CyD と Epichlorohydrin とを共重合した比較的疎水性の高い不溶性シクロデキストリンビーズを用いた場合よりも、リフォールディング中間体の不溶性シクロデキストリンビーズへの吸着を抑制し、高いリフォールディング収率を達成できることも示している。

第 5 章では本論文の総括と展望を述べている。

以上、本論文はこれまで困難であったリフォールディング中間体と界面活性剤との定量的な相互作用測定に初めて成功し、その相互作用がリフォールディング収率に与える影響を明確にした上で、界面活性剤と CyD ヒドロゲルビーズを用いた固相人工シャペロン法を開発したものである。これらの成果は、簡便で迅速、低コストな組み換えタンパク質生産技術の確立ならびに化学生命工学分野の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格であると認められる。