

論文の内容の要旨

論文題目 Development of protein refolding additives and their applications
(タンパク質リフォールディング用添加剤の開発および利用に関する研究)

氏名 山本 悦司

1. 緒言

タンパク質の大量生産には、動物細胞に比べて培養コストが安くかつ増殖速度も速い大腸菌を宿主とした発現系が広く用いられている。大腸菌を宿主とした異種タンパク質大量発現系では、発現産物の多くは不活性・不溶性の目的タンパク質の凝集体(封入体)を形成するため、工業スケールにおいて目的タンパク質の回収および精製を容易にする利点がある。ただし、活性を有する目的タンパク質を得るためには、封入体を可溶化し、天然型の構造へ誘導するリフォールディング操作が必要となる。しかしながら、その過程でリフォールディング中間体の凝集反応が生じ、リフォールディング収率低下の原因として問題となっている。

上記の問題を解決するために、凝集反応を抑制し、収率を向上させるリフォールディング用添加剤が開発されてきた。しかしながら、既存の添加剤では、十分な収率向上効果を得られない場合が多いため、より効果的な添加剤が求められている。また、添加剤の構造や物性と、収率向上効果の関係はほとんど明らかにされていない。そのため、添加剤の合理的な設計や、添加剤の合理的な選択や利用が困難であるのが現状である。

本研究では、これらの課題を解決するため、まず、コンビナトリアルアプローチによる新規の添加剤の開発を行った。コンビナトリアルアプローチの利点として、①目的の機能を有する添加剤の合理的な設計が不必要である点、②系統的に構造が異なる多様な添加剤が同時に調製できる点が挙げられる。後者の利点より、得られた機能と各パーツの分子構造との比較が可能となり、添加剤の構造と機能との相関を帰納的に明確にすることができる。次に、水溶性有機溶媒を併用して、リフォールディング用添加剤の作用を調節する技術の開発も行った。有機溶媒を調節剤として用いることにより、添加剤単体では得られないリフォールディングに適した水溶液環境を簡便に創出することができる。この様に、新規添加剤の利用や、添加剤と調節剤の併用により、目的タンパク質のリフォールディングに最適な溶媒環境の創出することを目的として以下の研究を行った。

2. イオン液体群のリフォールディング用添加剤としての効果

本研究室で、リゾチームのリフォールディング収率向上効果が確認されたイオン液体の

N¹-methyl-N-octylimidazolium chloride をリード化合物とし、炭素鎖部位およびカチオン部位の構造を分割して、コンビナトリアルに変化させたイオン液体ライブラリーを調製した。この化合物群のリフォールディング用添加剤としての効果を調べた。

モデルタンパク質には、リフォールディング時に凝集反応が起こりやすいリゾチームを用いた。リフォールディングは、変性還元リゾチーム溶液を、添加剤を含むバッファーで大希釈することにより行った。添加剤のタンパク質凝集抑制効果は凝集体の濁度を測定することにより、リフォールディング収率は回復した酵素活性により評価した。

イミダゾリウム塩の凝集抑制効果を調べたところ、イミダゾリウム塩の炭素鎖が長いほど、低濃度で凝集を抑制できることが分かった。イオン液体のカチオン部の疎水性が増大し、リフォールディング中間体の疎水性表面と強く疎水性相互作用するためだと考えられる。

次に、イミダゾリウム塩のリフォールディング収率への影響を調べた。添加剤なしでは、凝集反応のため、10%以下の収率しか得られなかった。イミダゾリウム塩を添加すると、凝集抑制効果が現れる添加濃度付近から収率が上昇し始め、凝集を完全に抑制する濃度付近で収率が最大となることが分かった。特に、炭素鎖が短いイミダゾリウム塩を添加すると80%前後の高収率が得られた。また、最も一般的に用いられている添加剤である L-アルギニン塩酸塩の最大収率46%を超える収率向上効果を示すイミダゾリウム塩が複数種得られ、コンビナトリアルアプローチによる添加剤開発に成功した。

イミダゾリウム塩の炭素鎖が、凝集およびリフォールディング速度に与える影響を調べるため、速度論的解析を行ったところ、炭素鎖を有するイミダゾリウム塩は、凝集反応速度定数のみを大幅に低下させることが分かった。一方、長い炭素鎖のイミダゾリウム塩は、凝集反応速度定数とリフォールディング反応速度定数の両方を大幅に低下させるため、収率向上効果が低いことが明らかとなった。なお、ピリジニウム塩、ピロリジニウム塩のイオン液体でも同様の傾向が見られた。

3. 非イオン性界面活性剤 polyethylene glycol monooleyl ether のリフォールディング用添加剤としての効果

上述のイオン液体群は、カチオン性タンパク質のリフォールディング収率を効果的に向上できることが分かったが、アニオン性タンパク質では、添加剤とタンパク質間の静電的相互作用により凝集が促進され、収率が低下する場合も見られた。そこで、タンパク質の総電荷の影響を受けにくい添加剤の開発のため、非イオン性界面活性剤に着目した。非イオン性界面活性剤は、疎水部と親水部からなり、これらの構造を系統的に変化させることで効果的な添加剤の探索ができると考えた。これまで、非イオン性界面活性剤の疎水部の構造とリフォールディング収率の関係についての報告例はあるが、親水部の効果については報告例がなく、非イオン性界面活性剤の凝集抑制効果および収率向上効果は未だ明らかではない。そのため、親水部の構造と機能を調べることにより、リフォールディングに効

果的な非イオン性界面活性剤選択の指針を示すこともできると考えた。

非イオン性界面活性剤のモデルとして、polyethylene glycol (PEG) ユニット数 2 から 90 を有する polyethylene glycol monooleyl ether (PGME) を用い、PGME の親水部の PEG 鎖長と凝集抑制効果およびリフォールディング収率向上効果の関係を詳細に調べた。

タンパク質の凝集抑制効果を調べたところ、PEG 単体では凝集を抑制できなかったが、長い PEG 鎖を有する PGME では凝集を効果的に抑制できることが分かった。この結果より、凝集抑制には、タンパク質表面に付着するための疎水部のオレイル基と、中間体同士の会合を立体障害により抑制するための比較的長い親水部の PEG 鎖が必要であることが考えられた。

次に、凝集抑制効果が見られた PGME20, 50, 90 のリフォールディング収率向上効果を調べたところ、総電荷の異なるリゾチーム、乳酸脱水素酵素、 α -グルコシダーゼのリフォールディング収率が向上することが分かった。特に、適度な PEG 鎖長を有する PGME20 を用いた場合は、乳酸脱水素酵素のリフォールディング収率を 5% から 68% まで向上できることが分かった。PGME50, 90 では 35% 程度の収率だったことから、PGME の PEG 鎖が短すぎると凝集が抑制できず収率が向上しないが、長すぎると PEG 鎖の立体障害により分子内のリフォールディングも阻害するため、収率が向上しにくいと考えられる。

4. 界面活性剤および有機溶媒併用によるリフォールディング収率の相乗的向上効果

長い炭素鎖のイオン液体や界面活性剤など疎水性の高い添加剤を用いた場合は、強い疎水性相互作用により、凝集だけでなく、リフォールディングも阻害する。そこで、これらの添加剤のリフォールディング阻害効果を弱める調節剤として、有機溶媒の併用を試みることにした。モデルタンパク質としてリゾチームを用いた。

リフォールディング用添加剤として一般的に用いられている陽イオン界面活性剤の cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) と非プロトン性極性溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO) を併用したところ、CTAB や DMSO のみでは 13% および 9% の収率が、35% まで相乗的に向上することが分かった。なお、PGME50 のみでは 12% の収率が、DMSO を併用することにより 56% まで向上することも分かった。

次に、界面活性剤併用時におけるリフォールディング収率向上効果に必要な有機溶媒の性質を調べた。その結果、比較的疎水性の低い DMSO や dimethylformamide などが CTAB の凝集抑制効果を弱めない上、収率を向上させることが分かった。一方、比較的疎水性が高い acetonitrile, isopropanol などを併用すると濁度の上昇が見られた。疎水性が高い有機溶媒は、CTAB とリフォールディング中間体の疎水性表面との疎水性相互作用を弱め過ぎ、CTAB の凝集抑制効果を阻害するため、収率が向上しないと考えられる。

最後に、CTAB と DMSO 併用時のリゾチームのリフォールディングの速度論的解析を行い、DMSO が凝集反応速度定数とリフォールディング反応速度定数に与える影響を調べた。その結果、DMSO の添加濃度の増大に伴い、これらの速度定数が増大することが分かった。

DMSO 添加により、CTAB とタンパク質間の疎水性相互作用を弱める調節ができたといえる。また、リフォールディング反応速度定数と凝集反応速度定数の比から、適量の DMSO を添加することによりリフォールディング収率向上に最適な溶媒環境を作り出せることが速度論的解析によっても確認できた。

5. 結言

コンビナトリアルアプローチによる新規なリフォールディング用添加剤の開発を試みたところ、短い炭素鎖を有するイオン液体群は、凝集のみを効果的に抑制し、リフォールディング収率を既存の添加剤以上に向上できることが分かった。また、PEG 鎖長を変化させた非イオン性界面活性剤の PGME 群を添加剤として用いたところ、適度な長さの PEG 鎖を有する PGME は凝集抑制効果および収率向上効果が優れていることが分かった。これらの結果から、添加剤の構造と収率向上効果の関係を明らかにすることができた。

次に、調節剤として水溶性有機溶媒を併用して、界面活性剤の作用を調節する技術の開発も行った。その結果、界面活性剤や有機溶媒のみを添加した場合に比べ、リフォールディング収率のみを相乗的に向上できる溶媒環境の創出に成功した。

本研究で得られたこれらの知見は、目的タンパク質のリフォールディング収率向上を目指した溶媒環境創出のための新しい指針を与えるものと期待される。