

審査の結果の要旨

氏 名 山 本 悦 司

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、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が低下することが問題となっている。こ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、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ため、現状では添加剤の合理的な設計、選択や利用が困難である。本論文は、コンビナトリアルアプローチによる新規のリフォールディング用添加剤の開発、ならびに添加剤とリフォールディング中間体疎水性部位との疎水性相互作用を、水溶性有機溶媒を併用することによって調節する技術の開発により、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指したものである。本論文は以下の5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、目的と概要を述べ、本論文の構成を示している。

第2章ではリフォールディング時に凝集反応が起こりやすい高塩基性タンパク質リゾチームをモデルタンパク質として選び、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について検討している。すなわち、イオン液体である *N*'-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（イミダゾリウム塩、ピリジニウム塩、ピロリジニウム塩）の構造、対アニオン（Cl⁻、Br⁻、I⁻）の種類をコンビナトリアルに変化させたイオン液体のライブラリーを作製し、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、凝集抑制、リフォールディング収率の観点から調べている。その結果、イオン液体の炭素鎖部分は凝集性の高いリフォールディング中間体の疎水性表面と結合しマスクすることにより、リフォールディング中間体分子間の凝集を抑制するが、同時にリフォールディング中間体分子内の疎水性相互作用によるリフォールディングも抑制するため、リフォールディング収率の向上には、凝集抑制効果が高く、かつリフォールディング抑制効果が低い炭素鎖部位を有するイオン液体が有効であると結論づけている。また、凝集過程、リフォールディング過程の速度論的解析により、炭素数が2から4のアルキル鎖が高塩基性タンパク質リフォールディング中間体の凝集抑制とリフォールディング収率の向上に有効であることを示している。さらに、添加剤濃度 1M の条件で、これまで広く用いられてきた L-アルギニン塩酸塩を用いた場合の 46% を大

大きく上回る 80% 程度のリフォールディング収率が得られることを見出している。一方、カチオン部位の構造、アニオンイオンの種類の違いは、炭素鎖部位と比較して影響はそれほど大きくはないものの、カチオン部位は疎水性が低いものほど、対アニオンはコスモトロピック性が高いものほどリフォールディング収率の向上に有効であることを見出している。さらに、このようなイオン液体は高塩基性タンパク質には有効であるが、 α -グルコシダーゼのような高酸性タンパク質の場合には、イオン液体のカチオン部位とリフォールディング中間体との静電的な相互作用によって凝集が促進されるため、リフォールディング用添加剤として用いることはできないと結論づけている。

第 3 章では、様々な等電点、サブユニット構造からなるタンパク質のリフォールディングに利用可能な、より汎用性の高いリフォールディング用添加剤の開発を行っている。すなわち、高塩基性タンパク質リゾチーム、高酸性タンパク質 α -グルコシダーゼ、低塩基性ホモ 4 量体タンパク質乳酸脱水素酵素をモデルタンパク質として選び、非イオン性界面活性剤の疎水性部位の炭素鎖部位の構造、PEG 鎖長をコンビナトリアルに変化させた非イオン性界面活性剤ライブラリーを作製し、そのリフォールディング用添加剤としての効果を検討している。その結果、炭素数 11 から 17 のアルキル鎖長、20 モル重合以上の PEG 鎖長を持つ非イオン性界面活性剤は、いずれのタンパク質のリフォールディングにも有効であり、炭素鎖部分とリフォールディング中間体の疎水性表面との相互作用、PEG 鎖の立体障害により凝集抑制効果が得られると述べている。また、炭素鎖長、PEG 鎖長が長いほど低濃度で凝集体形成を阻害するが、同時にリフォールディングも抑制するため、リフォールディング収率の向上には炭素数 15 ~17 の炭素鎖部分、PEG 鎖長が 20~90 モル重合の親水性部位を有する界面活性剤を 1mM 程度添加することが有効であると結論づけている。

第 4 章では、この非イオン性界面活性剤と水溶性有機溶媒の同時添加効果をコンビナトリアルアプローチにより評価し、DMSO、DMF などの比較的 logP 値が小さい水溶性有機溶媒を 10% 程度添加すると、無添加の場合と比較してリフォールディング収率が数倍向上することを見出している。速度論的解析の結果、水溶性有機溶媒の添加によって非イオン性界面活性剤の炭素鎖部分とリフォールディング中間体の疎水性相互作用が若干弱まり凝集速度定数が増加するものの、それ以上にリフォールディング速度定数が増加するため、リフォールディング収率が向上したと結論づけている。

第 5 章では、本研究の結論と展望について述べている。

以上、本研究はコンビナトリアルアプローチにより、タンパク質のリフォールディングに汎用的に利用できるリフォールディング用添加剤を開発するとともに、速度論的解析結果に基づいて添加剤の構造とリフォールディング効果の関係を帰納的に明らかにすることにより、リフォールディング用添加剤の合理的な設計指針を示したものであり、タンパク質工学、工業的タンパク質生産技術の発展に対する寄与は大である。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。