

Title	Effects of fusion with an unstructured and hyper-acidic polypeptide on the nature of recombinant proteins expressed in bacteria
Author(s)	Sangawa, Takeshi
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26155
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

〔 題 名 〕

Effects of fusion with an unstructured and hyper-acidic polypeptide on the nature of recombinant proteins expressed in bacteria

(構造をとらない超酸性ポリペプチドの融合が組換え発現蛋白質の性状に与える影響)

学位申請者 寒川 剛

大腸菌組換え発現系は、その豊富な発現量、生育速度、安価な培地等、数多くの長所を持つ系であり、現在、ラボスケール、工業スケールを問わず、最も頻繁に用いられている。その反面、多くの蛋白質が不溶性発現してしまうこと、クルードな細胞破碎液から高効率かつ安価に蛋白質を精製できる方法の欠如、不溶性画分からのリフォールディングに普遍的な方法が存在せず、根気強い条件検討を必要とすること等の問題のため、大腸菌発現系を諦めざるを得ないケースも数多く存在している。

私は最初に、高効率かつ安価な精製法の確立を目指し、アミロイド前駆体蛋白質 (APP) の細胞外に存在する超酸性領域を融合タグとして用いることを考えた。FATT と名付けたこのタグは、極めて低い等電点(3.2) を持ち、融合した蛋白質の静電的性質を大きく酸性側に偏らせることができる。その結果、FATT 融合蛋白質は、安価な陰イオン交換レジンを用いて容易にワンステップ精製することができた。また、FATT は Factor Xa を用いて完全に切断可能であり、切断後のタグは再度陰イオン交換カラムにかけることで容易に取り除くことが可能であった。

さらに、極めて可溶性の高い配列から、FATT が強い可溶化能を持つことを期待し、大腸菌の組換え発現系では不溶性に発現する様々な細胞外酵素及び一本鎖抗体フラグメントに FATT を融合したところ、期待通り、試みたほぼ全ての例において著しく可溶性が亢進した。

これまでに、このような可溶化タグとしては、Glutathione-S-transferase (GST)、Maltose-binding protein (MBP)等が広く用いられてきたが、これらの蛋白質性タグの可溶性は高次構造に依存するため、変性操作を伴うリフォールディングでは用いることができなかった。一方、APP 超酸性領域は天然変性蛋白質であり、その可溶性は構造に依存しないため、変性及びそれに続くリフォールディングの間も可溶性を保持することが期待できる。私は、条件検討が極めて煩雑なりフォールディングに際し、FATT の可溶化能が有利に働くのではないかと考えた。そこで、大腸菌発現系ではミスフォールドしてしまう様々な蛋白質に FATT を融合し、これらの蛋白質のリフォールディングを試みた。その結果、いずれの蛋白質も共通した一つのプロトコールで活性のある状態に巻き戻すことができた。ゲル濾過クロマトグラフィーでの挙動から、APP 超酸性領域と同様、FATT が大きな溶液半径を持つ天然変性型のタグであることが強く示唆され、また FATT が中性付近のバッファー条件下では大きな負電荷を持つことから、このリフォールディングへの寄与は、負電荷を大きな範囲に及ぼすことによってフォールディング中間体同士の好ましくない相互作用を防いでいるためと考えられる。

このように超酸性かつ構造をとらない FATT の融合は、蛋白質の静電的性質を変えるのみならず、可溶性を著しく亢進させ、さらにその性質は変性条件及びそれに続くリフォールディング条件の中でも蛋白質の可溶性及びフォールディングに寄与するものであった。これは FATT の配列に特異的なものとは考えにくく、組換え蛋白質発現系における天然変性ポリペプチドの新たな用途を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (寒 川 剛)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	高 木 淳 一
	副 査	教 授	田 嶋 正 二
	副 査	教 授	後 藤 祐 児

論文審査の結果の要旨

対象論文 (Effects of fusion with an unstructured and hyper-acidic polypeptide on the nature of recombinant proteins expressed in bacteria) は、アミロイド前駆体蛋白質 (APP) の超酸性領域由来のポリペプチドを融合することにより、組み換え蛋白質の性状がどのように変わるのかを調べ、この融合システムが発現精製の困難な蛋白質の生産に極めて有用な技術につながる可能性について論じたものである。当該融合ドメイン (FATT タグと命名) は理論等電点 3.2 を持つことにより融合蛋白質に陰性荷電を付与し、これによって陰イオン交換樹脂による精製が可能になる。しかも、その高い可溶化能によって大腸菌内で不溶性の封入体を形成するような蛋白質においても可溶性分画への移行を促進し、さらには、正しいジスルフィド結合の形成が必須であるような細胞外蛋白質の巻き戻し (リフォールディング) の効率も高めることを示した。FATT タグ部分は特定の立体構造をとらないことが一次配列から予想されていたが、実際の分子量 (14 kDa) から想定されるより遙かに大きいストークス半径を持つことがゲル濾過クロマトグラフィーなどで明らかになり、この性質が組み換え蛋白質の凝集を防ぎ、フォールディングを促進する効果の原因であることが示唆された。以上により、構造を持たない超酸性ポリペプチドの蛋白質凝集・フォールディングなどに与える影響を明らかにするとともに、組み換え蛋白質発現において非常に有用なツールの開発に成功した。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。