



Title	Studies on Functions of Heat Shock Proteins and Extractive Protein Refolding Processes Using Aqueous Two-Phase Systems
Author(s)	矢野, 浩二
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39805
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	矢野浩二
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 12540 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科化学系専攻
学位論文名	Studies on Functions of Heat Shock Proteins and Extractive Protein Refolding Processes Using Aqueous Two-Phase Systems 水性二相抽出によるヒートショックタンパク質の機能およびタンパク質の構造形成プロセスに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 駒沢 勲 (副査) 教授 東稔 節治 教授 畑田 耕一 教授 葛西 道生 教授 菅 健一 助教授 久保井亮一

論文内容の要旨

微生物の遺伝子レベルでの修飾に基づいて新規なペプチド・タンパク質を創製する際、各種のストレスによるタンパク質の変性や、インクルージョンボディと呼ばれる不活性な凝集体の形成によって、目的のタンパク質生産が阻害される場合が多々ある。本研究は、水性二相分配系とヒートショックタンパク質(HSP)の機能を複合した高効率的なタンパク質のRefoldingプロセスの設計・開発を目的し、以下の4章より構成される。第1章では、まず幾つかのタンパク質を対象として、各種のストレス(熱、化学物質等)負荷条件でのタンパク質の変性過程、および各タンパク質間の相互作用において重要な支配因子の一つとなるタンパク質の構造変化に伴う表面特性(特に疎水性)変化について、水性二相分配法を用いて定量した。さらに、構造変化の制御を利用した新規なタンパク質の分離生産プロセスとして機能性食品タンパク質(α -LA, β -LG)を回収するプロセスを合成した。第2章では、構造形成反応が比較的遅い基質タンパク質として、炭酸脱水酵素を用いた自発的なRefolding反応について検討した。タンパク質のRefoldingを、(i)タンパク質の分子内相互作用による構造形成反応と(ii)分子間相互作用による凝集反応に分離して、各反応を支配する因子およびその制御法について検討した。第3章では、各種のストレス負荷条件におけるタンパク質の変性抑制やタンパク質の構造形成の促進に関与することが知られているHSP(GroEL, GroES)を対象として、表面特性・特異的相互作用および機能について明らかにした。また、これらの知見に基づいて、水性二相抽出とPEG沈澱法の複合によるHSPの高効率の分離生産プロセスを設計・開発した。最後に第4章では、以上の知見を総合して、水性二相分配系とHSPの機能を利用したタンパク質のRefoldingプロセスの検討を行った。本プロセスでは、変性タンパク質は水性二相系の上相でGroELと結合して(ii)の分子間凝集が抑制され、迅速に巻き戻り活性化されるとともに下相に濃縮・回収された。

論文審査の結果の要旨

微生物の遺伝子レベルでの修飾に基づいて新規なペプチド・タンパク質を創製する際、各種のストレスによるタンパク質の変性や、インクルージョンボディと呼ばれる不活性な凝集体の形成によって、目的のタンパク質生産が阻害される場合が多々ある。細胞内でタンパク質の構造形成・変性過程を制御していると推測される一連のストレスタン

パク質群, 中でもヒートショックタンパク質 (HSP) が注目されているが, その機能・特性は未だ十分に理解されていない。したがって, これらヒートショックタンパク質の機能・特性の解明と合理的な分離生産法の確立や, 細胞内における変性・インクルージョンボディの形成過程の制御, あるいはインクルージョンボディから活性を持った目的タンパク質を回収する効率的なプロセス, すなわちタンパク質の可溶化と構造形成 (折り畳み, Refolding) を行うプロセスの確立が大きな課題となっている。

一方, 水性二相分配系は, 水-水系の相分離により細胞内環境に近い穏和な二相を形成するために, 酵素・タンパク質および微生物に優しい環境を持ち, これらと二相系自身の相互作用を最小限に抑制できる。したがって, タンパク質の構造変化・界面活性剤などの第三成分との相互作用の分析場, あるいは培養・酵素反応およびタンパク質の構造形成 (Refolding) を進行させる生物反応場として利用することが可能である。水性二相分配系とヒートショックタンパク質の機能を複合することにより, 高効率なタンパク質の Refolding プロセスを開発できると期待される。

本論文では, (1)各種のストレス (熱, 化学物質等) 負荷条件でのタンパク質の変性過程, およびタンパク質の構造変化に伴う表面特性 (特に疎水性) 変化を, 水性二相分配法を用いて定量すること, (2)タンパク質の自発的な Refolding 反応を(i)タンパク質の分子内相互作用による構造形成反応と(ii)分子間相互作用による凝集に分離して評価すること, (3)各種のストレス負荷条件におけるタンパク質の変性抑制やタンパク質の構造形成の促進に関与することが知られているヒートショックタンパク質 (HSP ; GroEL, GroES) の表面特性, 特異的相互作用および機能を定量的に評価すること, (4)以上の知見を総合して, 水性二相分配系における各反応成分, 生成物および HSP の二相間の分配特性と HSP の機能を利用したタンパク質の Refolding プロセスの組み立て, を行った。

以上のように, 本論文は水性二相分配系とヒートショックタンパク質の機能の複合により, Refolding と生成物の分離・回収を同時に行える高効率なタンパク質の Refolding プロセスを構築したものである。よって博士論文に値するものと判定する。