



# 分子シャペロン・フォールダーゼを活用したタンパク質フォールディング制御法に関する研究

香田, 次郎

---

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2003-04-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2691

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002691>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 3 0 3 】

氏 名 ・ ( 本 籍 ) 香 田 次 郎 ( 大 分 県 )

博士の専攻分野の名称 博士 ( 工学 )

学 位 記 番 号 博ろ第259号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成15年4月25日

【 学位論文題目 】

分子シャペロン・フォルダーゼを活用したタンパク質  
フォールディング制御法に関する研究

審 査 委 員

主 査 教 授 福 田 秀 樹

教 授 大 川 秀 郎

教 授 薄 井 洋 基

助教授 近 藤 昭 彦

(氏名：香田 次郎 No. 1)

タンパク質リフォールディングプロセスにおける活性収率の改善ならびに組換えタンパク質発現時における封入体形成の抑制は組換えタンパク質の生産性向上のための重要な課題である。細胞内ではタンパク質の間違ったフォールディングや不可逆的な凝集を抑制し、正しいフォールディングを介助する分子シャペロンやタンパク質のジスルフィド結合の形成やペプチド主鎖の構造異性の変換を促進する酵素であるフォールダーゼがタンパク質のフォールディングを介助していることから、これらを活用することにより組換えタンパク質生産性が向上するものと考えられる。

本研究では、①タンパク質リフォールディングに分子シャペロンやフォールダーゼを活用することでリフォールディング効率、すなわち活性収率を向上させる *in vitro* でのフォールディング制御、②分子シャペロンおよびフォールダーゼを目的タンパク質と共発現することで封入体形成を抑制して活性タンパク質を生産させる *in vivo* でのフォールディング制御について各種分子シャペロン・フォールダーゼを用いて検討し、生体内でのタンパク質フォールディング制御法の確立を試みた。

第一章では大腸菌内でジスルフィド結合の異性化を促進する DsbC のタンパク質リフォールディングにおける機能特性およびタンパク質フォールディングに中心的な役割を果たす好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来シャペロニンとの協同効果について検討した。その結果、DsbC によるリフォールディング促進効果はその活性部位やリフォールディング緩衝液の酸化還元状態、目的タンパク質のジスルフィド結合の有無によって異なった。具体的にはジスルフィド結合が存在するタンパク質では酸化剤過剰の環境で酸化型 DsbC を添加することで高いリフォールディング促進効果が得られた。一方、ジスルフィド結合は形成しないが、数個のチオール基を有するタンパク質に対しては還元型 DsbC による高いリフォールディング促進効果が見られた。また、いずれの場合においてもシャペロニンとの共存によりリフォールディング促進効果が増大し、シャペロニンと DsbC は協同的にタンパク質リフォールディングを促進することが明らかとなった。

第二章では大腸菌内でジスルフィド結合の導入を促進する DsbA のタンパク質リフォールディングにおける機能特性および *Thermus thermophilus* 由来シャペロニンとの協同効果について検討した。DsbA はジスルフィド結合を有するタンパク質のリフォールディングを促進することができ、シャペロニンとの協同効果も見られたが、ジスルフィド結合が存在しないタンパク質にはリフォールディング促進効果はなく、シャペロニン

(氏名：香田 次郎 No. 2)

との協同効果も見られなかった。また、ジスルフィド結合が存在するタンパク質のリフォールディングにおいてシャペロニン存在下で DsbA を途中添加した場合には添加時期が早いほうがリフォールディング促進効果は高く、プラトー域に達すると DsbA を添加してもリフォールディングの促進は見られなかった。一方、DsbA 存在下でシャペロニンを途中添加した場合には添加時期に関わらずリフォールディングを促進した。以上のことからタンパク質リフォールディングを効率よく行うにはシャペロニンによる正しいフォールディングの促進に比べ、Dsb タンパク質による正しいジスルフィド結合の形成が重要であることが示唆された。

第三章ではその耐熱性からタンパク質リフォールディングプロセスだけでなく、タンパク質の安定化にも有効であると考えられるため、様々なバイオテクノロジー分野への応用が期待されている超好熱性古細菌 *Thermococcus* KS-1 株由来シャペロニンによるタンパク質リフォールディングの機能特性を検討した。*Thermococcus* KS-1 株由来シャペロニン 16-mer は  $Mg^{2+}$  非存在下ではモノマーに解離し、解離したモノマーはシャペロニン濃度、 $Mg^{2+}$ 、温度を制御することによって 16-mer へ再会合可能であった。シャペロニン 16-mer は優れた熱安定性と高温域におけるリフォールディング促進効果を示し、広い温度範囲でのタンパク質リフォールディングに有効であることが明らかとなった。一方、シャペロニンモノマーは ATP を添加することなくリフォールディングを促進したことから、タンパク質リフォールディングだけでなくタンパク質の熱安定化など様々なバイオプロセスに応用可能であることが明らかとなった。

第四章では大腸菌由来シャペロニン GroEL/ES を用いた各種固定化シャペロニンの作製、機能評価および再利用性について検討するとともに、分子シャペロンやフォールダーゼを固定化するための最適な固定化法について検討した。GroEL/ES はホルミル基を介した共有結合法によってゲル担体に固定化可能であり、タンパク質リフォールディングを促進するとともにその再利用が可能であった。また、GroEL にアフィニティタグである (His)<sub>6</sub> タグを融合させた GroEL-(His)<sub>6</sub> はアフィニティ分離によって簡便に精製でき、native な GroEL と同等のリフォールディング促進効果を示した。さらにキレート樹脂にアフィニティ固定した固定化シャペロニンによるリフォールディング促進効果および再利用性も良好であった。したがって、リフォールディング後の分離精製、シャペロニンやフォールダーゼの生産コストを考慮すると *in vitro* でのフォールディング制御

(氏名：香田 次郎 No. 3)

には固定化分子シャペロン・フォールダーゼの利用が有効であり、特に Dsb タンパク質の活性部位が共有結合法で用いる固定化試薬との反応性の高い官能基であることを考慮すると、分子シャペロンやフォールダーゼを固定化するにはタグを融合させてアフィニティ固定する手法が有効であることが示唆された。

第五章では細胞質生産型でジスルフィド結合が存在せず、発現誘導剤の添加量の最適化によって可溶性タンパク質として発現可能な大腸菌由来 glutamate racemase (GluR) を分子シャペロンやフォールダーゼとともに大腸菌内で共発現し、得られたタンパク質の活性や発現量に及ぼす影響について検討した。その結果、分子シャペロンやフォールダーゼの共発現が活性 GluR の形成を促進し、活性 GluR の総生産量は共発現した分子シャペロンやフォールダーゼに依存することが明らかとなった。GluR のように自発的にフォールディングする傾向があり、分子内にチオール基を有するがジスルフィド結合は形成しないタンパク質の過剰発現において GroEL/ES、大腸菌細胞質内でのジスルフィド結合形成を抑制するチオレドキシン、DsbA および DsbC の再活性化因子である DsbB および DsbD が正しくフォールディングした活性タンパク質の生産促進に最も効果的であった。したがって、ジスルフィド結合の存在しない同一宿主由来のタンパク質の大量生産に対して分子シャペロンおよびフォールダーゼの共発現は有効であることが明らかとなった。

第六章ではペリプラズム分泌生産型でジスルフィド結合が存在し、発現誘導剤の添加量の最適化によっても不溶性の凝集体を形成する horseradish peroxidase (HRP) を分子シャペロンやフォールダーゼとともに大腸菌内で共発現し、得られたタンパク質の活性や可溶性タンパク質としての発現量に及ぼす影響について検討した。その結果、HRP の生産において、正しいジスルフィド結合の形成を促進する Dsb タンパク質は正しくフォールディングした活性 HRP の生産性を改善した。一方、シャペロニン共発現による活性 HRP 生産量は若干増加したもののその他の分子シャペロンやチオレドキシン、合成直後のタンパク質のフォールディングを助するプロリン異性化酵素であるトリガーファクターでは共発現による活性 HRP 生産量の増加は見られなかった。ただし、第一章、第二章での結果からも明らかのように Dsb タンパク質に加えて分子シャペロンも共発現させることによって活性 HRP の生産性が更に向上すると考えられる。したがって、ジスルフィド結合を有する異種タンパク質発現系に対して分子シャペロンおよびフ

(氏名：香田 次郎 No. 4)

ォールダーゼの共発現は有効であることが示唆された。

以上のことから、*in vitro* でのフォールディング制御に関して、シャペロニンはジスルフィド結合の有無に関係なく有効であり、Dsb タンパク質はジスルフィド結合を有するタンパク質に対して有効であった。また、タンパク質リフォールディングにおいてシャペロニンと Dsb タンパク質の間には協同効果が存在し、ジスルフィド結合を有するタンパク質のリフォールディングには Dsb タンパク質による正しいジスルフィド結合形成の促進が重要であった。一方、*in vivo* でのフォールディング制御に関して、シャペロニンはジスルフィド結合が存在しないタンパク質に対して有効であり、Dsb タンパク質はジスルフィド結合を有するタンパク質に対して有効であった。以上のように分子シャペロンやフォールダーゼの有効性には *in vitro* と *in vivo* で共通する点が多く、*in vivo* での系においても分子シャペロンとフォールダーゼの双方を共発現することでタンパク質生産性の更なる向上が可能であると考えられる。したがって、分子シャペロンやフォールダーゼによるタンパク質フォールディング制御法は大腸菌系から無細胞タンパク質合成系に至るあらゆる発現系において組換えタンパク質の生産性向上に大きく貢献することが示唆された。

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                           |     |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----|---------|
| 氏名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 香 田 次 郎                                   |     |         |
| 論文<br>題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 分子シャペロン・フォルダーゼを活用したタンパク質フォールディング制御法に関する研究 |     |         |
| 審<br>査<br>委<br>員                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 区 分                                       | 職 名 | 氏 名     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 主 査                                       | 教 授 | 福 田 秀 樹 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 副 査                                       | 教 授 | 大 川 秀 郎 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 副 査                                       | 教 授 | 薄 井 洋 基 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 副 査                                       | 助教授 | 近 藤 昭 彦 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 副 査                                       |     |         |
| 要 旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                           |     |         |
| <p>タンパク質リフォールディングプロセスの効率化ならびに封入体形成の抑制は組換えタンパク質の生産性向上のための重要な課題である。細胞内ではタンパク質の間違ったフォールディングや不可逆的な凝集を抑制し、タンパク質の正しいフォールディングを介助する分子シャペロンやタンパク質のジスルフィド結合の形成やペプチド主鎖の構造異性の変換を促進する酵素であるフォルダーゼがタンパク質のフォールディングを介助している。本研究では各種微生物由来の分子シャペロンおよびフォルダーゼを用いて、生体内外でのタンパク質フォールディング制御法の検討を行った。</p> <p>第一章では、大腸菌由来 DsbC を活用した生体外タンパク質のリフォールディングについて検討した。ジスルフィド結合を持つタンパク質では酸化剤過剰の環境で酸化型 DsbC を添加することで高いリフォールディング促進効果が得られた。また、いずれの場合においてもシャペロニンとの共存によりリフォールディング促進効果が増大し、シャペロニンと DsbC は協同的にリフォールディングを促進することが明らかにした。</p> <p>第二章では、大腸菌由来 DsbA を活用した生体外タンパク質のリフォールディングについて検討した。DsbA はジスルフィド結合を持つタンパク質のリフォールディングを促進することができ、シャペロニンとの協同効果も見られたが、ジスルフィド結合を持たないタンパク質にはリフォールディング促進効果はなく、シャペロニンとの協同効果も見られなかった。一方、DsbA 存在下でシャペロニンを途中添加した場合には添加時期に関わらずリフォールディングを促進した。以上のことからリフォールディングを効率よく行うにはシャペロニンによる正しいフォールディングの促進に比べ、DsbA による正しいジスルフィド結合形成の促進が重要であることが示唆された。</p> <p>第三章では、超好熱性古細菌 <i>Thermococcus</i> KS-1 株由来のシャペロニンに関する基礎特性を検討した。<i>Thermococcus</i> KS-1 株由来シャペロニン<math>\alpha</math>、<math>\beta</math>サブユニットホモ 16 量体は熱安定性と高温域におけるリフォールディング促進効果を示し、広い温度範囲でのリフォールディングに有効であることを明らかにした。</p> <p>第四章では、シャペロニン GroEL/ES を用いた各種固定化シャペロニンの作製および機能評価、再利用性の検討を行った。シャペロニン GroEL/ES は共有結合法によってゲル担体に固定化可能であり、リフォールディングを促進するとともにその再利用性も確認した。また、シャペロニン GroEL にアフィニティタグである (His)<sub>6</sub> タグを融合させた GroEL-(His)<sub>6</sub> は native な GroEL と同等のリフォールディング促進効果を示した。</p> <p>第五章では、細胞質生産型でジスルフィド結合を持たない大腸菌由来 glutamate racemase (GluR) の分子シャペロン・フォルダーゼ共発現による活性タンパク質生産を検討した。分子シャペロンやフォルダーゼの共発現が活性 GluR の生産を促進し、その生産量は共発現した分子シャペロンやフォルダーゼに依存することを明らかにした。</p> <p>第六章では、ペリプラズム分泌生産型でジスルフィド結合を持つ horseradish peroxidase (HRP) の分子シャペロン・フォルダーゼ共発現による活性タンパク質生産を検討した。4 個のジスルフィド結合を持つ HRP の生産において、正しいジスルフィド結合の形成を促進する Dsb タンパク質は活性 HRP の生産性を改善した。第一章、第二章での検討結果からも明らかのように Dsb タンパク質に加えて分子シャペロンも共発現させることによって活性 HRP の生産性がさらに向上するものと推察した。</p> <p>本研究は、タンパク質のリフォールディングについて分子シャペロニンおよびフォルダーゼによる制御法を研究したものであり、その機能や高発現系等について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。</p> <p>よって、学位申請者香田次郎は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。</p> |                                           |     |         |