

水和イオン液体を場とした リコンビナントタンパク質凝集体の再生

Renaturation Process of Aggregated Recombinant Proteins Through the Design of Hydrated Ionic Liquids

代表研究者 東京薬科大学 藤田 恭子 University of Pharmacy and Life Sciences Kyoko FUJITA

Escherichia coli is the most commonly used host for recombinant protein expression. However, since inactive aggregation is obtained at a high rate and the renaturation process is troublesome, the improvement of the treatment of aggregated recombinant proteins is a critical issue. This study aimed to evaluate the use of hydrated ionic liquids (ILs) to directly dissolve aggregated recombinant proteins and induce refolding. Selection of component ions and suitable water content resulted in a considerable improvement in the dissolution of the aggregated protein, followed by refolding behaviour. Ammonium or phosphonium cations with butyl groups coupled with dihydrogen phosphate anions were identified as appropriate ion pairs, showing high solubility and contributing to refolding. The column method showed great potential in the transition of dissolved and refolded proteins in hydrated ILs into the buffer solution, achieving both IL removal and protein purification. The successfully recovered activity levels of aggregated proteins indicate that this method is a promising approach for the development of novel treatments for aggregated recombinant proteins.

研究目的

細胞内はタンパク質や種々の高分子が高濃度溶解している分子クラウディング環境であるとの考え方が広く認識されている。また近年、細胞内相分離現象をはじめ、細胞内における生体分子、その他の高分子による時空間的なドラスティックな変化が多彩な機能発現や反応の進行に大きく関与していることが多数報告されている。このような細胞内の機能発現や諸反応のいずれにも深く関与している水分子は、通常の試験管内で用いる希薄溶液(自由水)ではなく細胞内の混み合いにより周囲から様々な影響を受けた束縛水として存在すると考えられる。試験管内実験においても細胞内環境を再現するような水分子を含む場の制御が望まれるが、その方法は未だ確立されていない。細胞内のドラスティックな変化や反応を支える水分子の性質や数、溶媒物性を制御できれば、細胞内で進む反応の理解や、再現、さらに細胞内や希薄溶液環境では考えられない反応の実現も期

待できる。本研究では、水和イオン液体を用いて難溶性のタンパク質の溶解とリフォールディングについて検討を行った。

大腸菌を宿主としたタンパク質発現は汎用される手法であるが、高い割合で目的タンパク質は不活性な凝集体を形成してしまう。一般的に形成した凝集タンパク質の再生には水溶液中で大量の変性剤を用いて可溶化した後、透析や脱塩によって変性剤を取り除きながらリフォールディングを行う。しかし再生効率は低く、簡便かつ効率的な再生法が望まれてきた。一方、細胞内ではシャペロンとよばれるタンパク質がリフォールディングに関与しており、疎水性領域からなる内部に折りたたみが必要なタンパク質を入れて、正しく折りたたむことが知られている。水和イオン液体中には自由水は存在せず、疎水的なシャペロン様の場を形成できるため、凝集タンパク質の溶解やリフォールディングに有効であると期待し検討を行ってきた。先行研究として、イオン構造

と含水率を調節した水和イオン液体を場とすることで熱凝集タンパク質が溶解し、高い活性を再生することを報告している¹。また、市販の凍結乾燥タンパク質についても、水和イオン液体に溶解後に緩衝液に移すと、直接、緩衝液に溶解した場合に比べて高い活性を観測している²。本研究では、大腸菌を宿主とする発現で凝集体を形成する *Coprinopsis cinerea* 由来セルラーゼ 6A (CcCel6A) を用いて凝集体の溶解、リフォールディング状況、さらに水溶液中での活性について検討を行った。

研究経過

(1) 凝集体を溶解する水和イオン液体の探索

アルキル鎖長の異なるホスホニウムカチオン、アンモニウムカチオンにリン酸二水素アニオン ([dhp])、臭素イオン([Br])を組み合わせたイオン液体を用い、水の添加量を制御した水和イオン液体を調整した。培養した大腸菌を破碎して回収した凝集 CcCel6A の沈殿を各種水和イオン液体に混合して攪拌後、遠心分離を行い、上清のみ分取した。上清の蛍光スペクトル測定を行うことで溶解性について検討した。

凝集体の溶解はカチオンのアルキル鎖の総炭素数によって大きく異なった。総炭素数が 16~24 程度のカチオンを構成イオンとした場合に、凝集体は良好に溶解した。アニオンは[Br]に比べて[dhp]が有効であった。

(2) 溶解後のフォールディング状態の解析

各種水和イオン液体中で凝集 CcCel6A を攪拌後、遠心分離をした上清について蛍光スペクトル測定を行った。蛍光スペクトルの最大吸収波長からフォールディング状態について検討を行った。カチオンが [Br]からなる水和 IL に溶解した CcCel6A の蛍光スペクトルは、疎水性のトリプトファン環境が凝集体と類似であることを示唆した。一方、アニオンが [dhp]からなる水和 IL に溶解した場合、スペクトルからトリプトファン環境は可溶体 (native) と類似であり、凝集体から溶解後にフォールディングが誘起されていることが示唆された。Fig.1 に tetrabutylammonium ([N4444]) カチオンと異なるアニオンからなる水和イオン液体中に凝集体を溶解後の蛍光スペクトル結果を示す。同様の傾向はカチオンのアルキル鎖長に関わらず確認された。

(3) 水和イオン液体に溶解後の活性再生

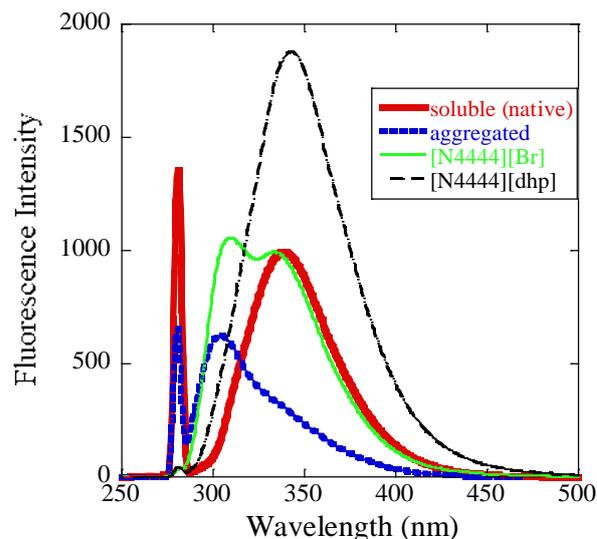


Fig.1 Fluorescence spectra of aggregated cellulase mixed in buffer (bold dot), [N4444][Br] (solid), [N4444][dhp] (dash) and native cellulase (bold solid).

凝集 CcCel6A を各種水和 IL に溶解後、上清をアイソエタノール沈殿法、カラムクロマトグラフィーにより水溶液中に溶解した。水溶液中に溶解した CcCel6A の活性について、レゾルフィンセロビオシドと反応させた。得られた蛍光強度をタンパク質濃度で補正することで活性値を算出して比較した。

アイソエタノール沈殿法を用いて水和 IL に溶解した CcCel6A を回収後、水溶液中に溶解させて活性測定を行った。いくつかの水和 IL で活性の再生が確認されたが、native に比べるとその活性は低かった。一方、アイソエタノール沈殿法で比較的良好な活性回復が確認された [N4444][dhp] を用いて、カラムクロマトグラフィー処理を行った。処理後に水溶液中に溶出した CcCel6A は native と同等の高い活性が観測された。

考察

大腸菌を宿主とした発現で形成した封入体の溶解と再生について検討を行った。凝集体の溶解にはカチオンの影響が大きく、カチオンの総アルキル鎖数によって溶解性が異なった。総アルキル鎖数が 16~24 となる場合に高い溶解度が確認され、それより短い場合や長い場合は溶解度が低下したことから、カチオンの新疎水性の状況やイオン密度が凝集体の溶解性への因子になっていると示唆された。総アルキル鎖長による溶解性の傾向は先行研究の熱変性凝集体の溶解と同様であった。

溶解後の構造形成については、アニオンの影響が大きいことが蛍光スペクトル結果から示唆された。臭素などのカオトロピックなイオンからなる水和イオン液体中では溶解後にリフォールディング誘起を示すスペクトルは観測されなかったのに対して、水素結合形成能の高いコスモトロピックなアニオンを構成イオンとする水和イオン液体中では、native と類似状況へのリフォールディング誘起が観測された。凝集状態から溶解した後、場の水素結合ネットワークの形成状況が CcCel6A のリフォールディング誘起に影響することが示唆された。

凝集 CcCel6A を水和イオン液体中で溶解後、水溶液中に移行して活性測定を行った結果、移行方法によって再生率は大きく異なった。カラムクロマトグラフィーを用いて、リフォールディング分画を分取することで高い活性を持つ再生 CcCel6A を回収できた。大腸菌を用いた異種発現系において形成する封入体の再生は幅広い分野に関わる課題である。本研究を発端とした発展を進め、簡便で有効な再生システムの提案に挑戦したい。

参考文献

1. K. Fujita, R. Fujii, K. Ichida, *Appl. Sci.*, 11, 57, 2021.
2. K. Fujita, R. Nakano, R. Nakaba, N. Nakamura Hiroyuki Ohno, *Chem. Commun.* 55 3563, 2019.

研究の発表

口頭発表

1. 藤田 恭子、誉田 拓也、塚越 かおり、大野 弘幸、池袋 一典 “水和イオン液体中の水和状態による核酸アプタマーの四重鎖構造と相互作用変化”、第 12 回イオン液体討論会、東京、2022 年 11 月
2. Navin Rajapriya Inbaraj, Subin Song, Ryongsok Chang, Kyoko Fujita, Tomohiro Hayashi “Hydration state of protein-stabilizing ionic liquids probed by

ATR-IR and NMR spectroscopy”, 第 12 回イオン液体討論会、東京、2022 年 11 月

3. 石井 佳穂、武部 豊、小林 和音、市田 公美、溝端 栄一、藤田 恭子 “水和イオン液体中における膜タンパク質の構造と熱安定性”、日本化学会第 103 春季年会、千葉、2023 年 3 月
4. 佐々木 大吾、小林 和音、木本 祐一朗、市田 公美、藤田 恭子 “アンモニウム系イオン液体/緩衝液の二相系におけるタンパク質の分配解析”、日本化学会第 103 春季年会、千葉、2023 年 3 月
5. Kyoko Fujita, Kazune Kobayashi, Anna Ito, Shun Yanagisawa, Kimiyoshi Ichida, Kouta Takeda, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, Improved renaturation process of aggregated recombinant proteins through the design of hydrated ionic liquids, 9th Congress on Ionic Liquids, Lyon, France, 2023 年 4 月
6. 藤田 恭子 “バイオサイエンス分野における水和イオン液体の可能性”、日本薬剤学会第 38 年会、名古屋市、愛知、2023 年 5 月
7. 藤田 恭子、小林 和音、伊藤 杏奈、柳澤 峻、市田 公美、武田 康太、中村 暢文、大野 弘幸 “水和イオン液体を場としたリコンビナントタンパク質凝集体の再生”、第 13 回イオン液体討論会、朱鷺メッセ、新潟、2023 年 11 月

誌上発表

1. Kyoko Fujita, Hiroyuki Ohno, Hydrated Ionic Liquids: Perspective for Bioscience, *Chem. Rec.*, 23, e202200282, 2023
2. Kyoko Fujita, Kazune Kobayashi, Anna Ito, Shun Yanagisawa, Kimiyoshi Ichida, Kouta Takeda, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, Improved renaturation process of aggregated recombinant proteins through the design of hydrated ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids*, 377, 121440, 2023