

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14695

研究課題名(和文)耐熱性リフォールディング触媒の開発と抗体産生への応用

研究課題名(英文)Development of Thermal Refolding and application for antibody production

研究代表者

田村 隆 (Takashi, Tamura)

岡山大学・環境生命科学研究科・教授

研究者番号：40253009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンパク質をゆでながら巻き戻す高温リフォールディング技術の開発に取り組んだ。正しい立体構造の回復に依存して緑色蛍光を発するsfGFP-2SSを作成した。これを還元的に変性させた後、酸化剤により誤った架橋を形成させると蛍光は失われた。これを基質として高温条件での巻き戻しを実現するために耐熱性PDIにより、高温リフォールディング技術PTR法を確立した。PTRとは、高温と低温の温度サイクルにより変性タンパク質を正しい構造へと導くタンパク質のPCRである。病因分子を認識する抗体が医薬品として利用されており、複数のジスルフィド架橋を正しく導入する方法として展開が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：In this research, a novel technique was developed which enabled the refolding of proteins at high temperatures with catalysis by thermostable protein disulfide isomerase. For this purpose a novel reporter protein sfGFP-2SS was invented, which emits green fluorescence depending on restoration of correct S-S bonds to be introduced. The fluorescence can be once vanished by erroneous S-S crosslink upon oxidation under denaturation, but green fluorescence was restored by disulfide isomerase from *Thermus thermophilus* HB8 in the programmed thermal cycling with redox buffer GSH/GSSG. The invention of Protein Thermal Refolding technique, termed as PTR, was established as a protein version of PCR, leading denatured proteins with aberrant disulfide bonds to the correct structure with high expectation for recombinant antibody production.

研究分野：応用微生物学

キーワード：disulfide oxidoreductase *Thermus thermophilus* redox tuning GFP antibody redox motif

## 1. 研究開始当初の背景

創薬のターゲットとなる特定の病因分子を特異的に認識する抗体が医薬品として利用されている。抗体は、手術後の病理診断だけでなく、抗体分子を製剤化して患者に投与する用途にも使われる。転移性乳がんに対するハーセプチン、難治性コラーゲン病に対する抗インターロイキン6抗体など、国内外の企業が激しい開発競争に参入しており、バイオ医薬品の急成長市場を開拓しつつある。しかし、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞は生産能を安定に保持できないことも多く、抗体医薬品は非常に高価である。微生物を宿主とする組換えタンパク質として抗体産生が可能になれば、安定供給と価格破壊への大きな展望が開けることは間違いない。しかし微生物を用いて抗体産生するには複数のジスルフィド架橋を正しく形成する課題を解決しなければならない。

伊豆温泉から単離されたサーマス菌(高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8)はそのペリプラズム空間に耐熱性ジスルフィド異性化酵素 TthA0610(32 kDa)と TthA1422(12 kDa)を発現する。本研究者は大腸菌のシグナル配列を利用して、サーマス菌のジスルフィド架橋異性化酵素を大腸菌で発現する方法を確立している。このサーマス菌のジスルフィド架橋異性化酵素を利用すれば抗体タンパク質を効率的に生産できる可能性がある。サーマス菌は、生育温度 55~85 のグラム陰性真正細菌である。一方、抗体はその分子内に 10 本以上のジスルフィド架橋を持ち、融点 70 程度の高い耐熱性を持つタンパク質でもあるので、正しいジスルフィド架橋を導入できれば、サーマス菌のタンパク質と同様に高い耐熱性を持つと期待できる。

ジスルフィド架橋形成の *in vitro*での評価法として、変性RNaseを基質として、これを再生させることによって回復するRNA分解活性を測定する方法が一般的に用いられている。しかし、これは間接的な評価法であるために定量的かつ微量に測定するのが難しい。さらにRNaseが耐熱性酵素ではないので評価可能な温度上限が低いという制限もある。本研究が目指している高温リフォールディングを実現するために新たな蛋白質基質および活性評価法の開発が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、高温でのタンパク質リフォールディング技術の開発に取り組む。耐熱性および高い自己フォールディング能を持つ sfGFP (super folder GFP)を基質として、これに複数のジスルフィド架橋を導入した新規なジスルフィド異性化酵素活性の基質の開発に取り組む。高温条件下で正しいジスルフィド

架橋形成を可能にする基質を開発して、高温条件下でタンパク質のリフォールディングを効率的に進める方法の開発につなげたい。耐熱性のジスルフィド架橋形成酵素はすでにサーマス菌がペリプラズム空間に発現するジスルフィド異性化酵素 TthA0610, TthA1422 を同定しているため、本研究で新たに作製する sfGFP-1SS, -2SS の評価に活用する。

## 3. 研究の方法

正しい立体構造の回復に依存して緑色蛍光を発する sfGFP を作成するために、分子内に一本のジスルフィド架橋(P56C-L141C)を持つ sfGFP-1SS, さらに 2 本のジスルフィド架橋(P56C-L141C, S202C-T225C)を持つ sfGFP-2SS を設計して作成する。これらを酸化的条件下で変性状態に導く条件(還元条件, 変性条件, 酸化条件)を検討して基質となり得る変性 sfGFP-2SS を調製する。これを用いて高温条件下でのタンパク質のリフォールディング反応をリアルタイムに測定できる新たなリフォールディング技術を開発する。

## 4. 研究成果

(1) sf-GFP-1SS および-2SS の開発  
耐熱性および高い自己リフォールディング能を持つとされる superfolder GFP(sfGFP)に複数のジスルフィド架橋を導入して新規な PDI 測定用基質の開発を検討した。正しい S-S 架橋形成に依存して緑色蛍光を発する sfGFP 変異タンパク質を 2 種類、作成した。sfGFP-1SS は分子内に一本のジスルフィド架橋(P56C-L141C)を持ち、sfGFP-2SS は(P56C-L141C, S202C-T225C)の 2 本のジスルフィド架橋を持つ。5 mM DTT 存在下 8M 塩酸グアニジンによって sfGFP-1SS または sfGFP-2SS を還元的に変性させた後、酸化剤(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を加えて誤った架橋形成を行わせて蛍光発光能を完全に失った sfGFP-1SS と sfGFP-2SS をそれぞれ調製した。これらは透析によって還元剤と変性剤を除去しても蛍光の自己回復が進行しない安定な変性タンパク質として回収できた。

(2) サーマス菌ジスルフィド異性化酵素による巻き戻し反応の検討

この基質の酸化条件を確立するために銅イオンによる酸化、過酸化水素による酸化を行い、PDI や TthA0610 を触媒とするジスルフィド異性化反応による蛍光回復を検討した。サーマス菌の TthA0610, TthA1422 のジスルフィド異性化作用により正しく自己フォールディングさせる反応の条件最適化に取り組んだ。牛肝臓由来 PDI(市販)によるリフォールディングをポジティブコントロールとして比較しながら TthA0610 による巻き戻し作用を検討した。反応系の酸化還元電位を調節するレドックス緩衝材として GSH/GSSG のグルタチオン系を用いて、温度条件や反応時

間を検討した結果、PDI 触媒と GSH 緩衝剤に依存して再現性よく蛍光が回復したので簡便・高感度に PDI 機能を評価できた。なお TthA0610 は高度好熱菌由来であったが *E. coli* で組換えタンパク質として発現した TthA0610 は *in vitro* アッセイ系では 40 が最適温度であり、長時間のインキュベーションでは高い熱安定性は認められなかった。

### (3) *Thermus thermophilus* HB8 を宿主とする GFP-2SS の発現系構築

sfGFP-2SS をサーマス菌で発現させるために遺伝子挿入ベクターを構築した。遺伝子のノックインは相同組換えによって導入するので、sfGFP-2SS の前後を標的サイトの相同配列断片で挟んで、サーマス菌の細胞では自己複製しないプラスミドにクローニングして形質転換によって取り込ませた。ベクター上のカナマイシン耐性遺伝子による選抜を経て、蛍光を発するサーマス菌として候補株をスクリーニングした。sfGFP-2SS を挿入するサイトとしてカロテノイド生合成遺伝子クラスターを選択した。サーマス菌はカロテノイドを産生するので培地の色が黄色から橙色を呈する。遺伝子破壊に成功すれば色素生産能が失われるので組換え株が判別して緑色蛍光をより鋭敏に検出・定量出来ると期待された。sfGFP-2SS 遺伝子の挿入には成功したが、緑色蛍光タンパク質の発現は認められなかった。これは細胞外への輸送系が機能していなかったためと考えられるので Sec 系または Tat 系のシグナル配列を付加することを、再度の研究では詳細に検討したい。

### (4) 高温条件下でのタンパク質リフォールディング技術 (PTR) の開発

高温条件下のタンパク質リフォールディングを実現するためにサーマルサイクラーを用いて条件検討を行った。高温、低温のサイクルプログラムや時間、サイクル数など蛍光収率でモニターしながら条件検討を行った。酸化還元電位の緩衝剤として添加するグルタチオンの酸化還元比 (GSH/GSSG) など重要な検討した。この結果、sfGFP-2SS を蛍光プローブ基質として用いて、サーマルサイクラーを用いた高温リフォールディング技術 PTR (Protein Thermal Refolding) 法を開発した。PTR とは、高温と低温の温度サイクルにより変性タンパク質を正しい構造へと導くことを意図しており、経時的にリフォールディング過程を測定できる変性 sfGFP-2SS を基質にすることで立体構造の再生過程を追跡しながら温度プログラムの最適化を行った。ニッケル担体カラムで精製した sfGFP-2SS をグアニジン塩酸塩と DTT 存在下で還元的に変性させた後、過酸化水素を用いて戻った SS 架橋を導入して蛍光を消失させた。この酸化処理により sfGFP-2SS は自己リ

フォールディング能を消失してリフォールディング酵素への高い依存度を示した。恒温槽を用いた一定温度下での反応では、TthA0610 によるリフォールディング反応は 50 まで有効で、変性 sfGFP-2SS の蛍光回復が僅かにしか促進されなかった。つぎにサーマルサイクラーを用いて PTR の温度条件を検討した。高温側の温度を 70 からスタートさせ、徐々に高温側の温度を下げてサイクルを繰り返すことで、45 サイクルで顕著な蛍光回復が観測された。酵素量、グルタチオン比を最適化することでさらにリフォールディング効率を改善した。SS 架橋の架け替えによるリフォールディングはタンパク質の立体構造成形に重要であり、本発明により sfGFP 以外のタンパク質の高温リフォールディングへの応用も期待できる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Sato, D., Shiba, T., Mizuno, S., Kawamura, A., Hanada, S., Yamada, T., Shinozaki, M., Yanagitani, M., Tamura, T., Inagaki, K., and Harada, S. The hyperthermophilic cystathionine  $\gamma$ -synthase from the aerobic crenarchaeon *Sulfolobus tokodaii*: expression, purification, crystallization and structural insights. *Acta Crystallographica Section F*, 73, 152-158 (2017) 査読有
2. Sato, D., Shiba, T., Yunoto, S., Furutani, K., Fukumoto, M., Kudou, D., Tamura, T., Inagaki, K., Harada, S. Structural and mechanistic insights into homocysteine degradation by a mutant of methionine  $\gamma$ -lyase based on substrate-assisted catalysis. *Protein Sci.* 26, 1124-1130 (2017) 査読有
3. Fukuhara, T., Kobayashi, K., Kanayama, Y., Enomoto, S., Kondo, T., Tsunekawa, N., Nemoto, M., Ogasawara, N., Inagaki, K., and Tamura, T. Identification and characterization of the *zosA* gene involved in copper uptake in *Bacillus subtilis* 168. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 600-609 (2016) 査読有
4. Tamura, T., Tsunekawa, N., Nemoto, M., Inagaki, K., Hirano, T., and Sato, F. Molecular evolution of gas cavity in [NiFeSe]hydrogenase resurrected *in silico* *Sci Rep* 6, 1130-1132 (2016) 査読有
5. Kamada, S., Okugochi, T., Asano, K., Tobe, R., Mihara, H., Nemoto, M., Inagaki, K., and Tamura, T. A non-radioactive assay for selenophosphate synthetase activity using recombinant pyruvate pyrophosphate dikinase from *Thermus thermophilus* HB8. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1970-1972 (2016) 査読有
6. Fukuda, Y., Abe, A., Tamura, T., Kishimoto, T., Sogabe, A., Akanuma, S., Yamagishi,

A., Imada, K., and Inagaki, K. Epistasis effects of multiple ancestral-consensus amino acid substitutions on the thermal stability of glycerol kinase from *Cellulomonas* sp. NT3060. *J. Biosci. Bioeng.* 121, 497-502 (2016) 査読有

7. Araki, T., Nakatsuka, T., Kobayashi, F., Watanabe-Ishimaru, E., Sanada, H., Tamura, T., and Inagaki, K. Reactivity of sorbose dehydrogenase from *Sinorhizobium* sp. 97507 for 1,5-anhydro-D-glucitol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1130-1132 (2015) 査読有

8. Amano, M., Mizuguchi, H., Sano, T., Kondo, H., Shinyashiki, K., Inagaki, J., Tamura, T., Kawaguchi, T., Kusakabe, H., Imada, K., and Inagaki, K. Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine  $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* 157, 549-559 (2015) 査読有

9. Oshima, K., Hattori, M., Shimizu, H., Fukuda, K., Nemoto, M., Inagaki, K., and Tamura, T. Draft genome sequence of *Streptomyces incarnatus* NRRL8089, which produces the nucleoside antibiotic sinefungin. *Genome Announcements* 3, e715 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. 平島史崇, 倉光成紀, 根本理子, 稲垣賢二, 田村 隆. 高度好熱菌由来 PDI のタンパク質の高温リフォールディング活性. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日(木)(神戸)
2. 平島史崇, 福山慎也, 根本理子, 稲垣賢二, 田村 隆, ジスルフィド架橋導入 sfGFP を用いた蛍光回復過程の経時変化. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 2 日(横浜)
3. 福山慎也, 森野智美, 根本理子, 稲垣賢二, 田村 隆. ジスルフィド架橋導入 sfGFP を用いた高温リフォールディング評価法 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日(神戸)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: タンパク質を高温で巻き戻す方法  
発明者: 田村 隆  
権利者: 国立大学法人岡山大学  
種類: 特許  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.agr.okayama-u.ac.jp/AppIEnz/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
田村 隆 (TAMURA, Takashi )  
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授  
研究者番号: 40253009

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
( )