

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810066

研究課題名(和文)水和イオン液体を用いたタンパク質凝集体の再生

研究課題名(英文)Renaturation of Aggregated Proteins Treated with Hydrated Ionic Liquids

研究代表者

藤田 恭子(FUJITA, Kyoko)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90447508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：目的タンパク質を得る方法として汎用される大腸菌を宿主としたタンパク質発現において、高い割合で生じるタンパク質凝集体をターゲットとし、水和イオン液体を用いた再生の検討を行った。特性の異なる水和イオン液体を用いて凝集体の溶解性について検討を行った結果、コリニウムカチオンとリン酸二水素アニオンからなるイオンの組み合わせの水和イオン液体がタンパク質凝集体を溶解することが示された。また、1イオンペアに対して、4分子程度の水が存在するよう水和イオン液体を調整した場合に、溶解したタンパク質凝集体は天然状態と同様のフォールディング状態を形成していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have investigated simple method to realize dissolution and refolding of aggregated recombinant protein from E. coli in hydrated ionic liquids. Among the investigated ionic structures, a pair of cholinium cation and dihydrogen phosphate anion showed direct dissolution of the aggregated protein with subsequent formation to the folding state, when it was controlled the number of water molecules.

研究分野：生物電気化学、生体高分子、イオン液体

キーワード：リフォールディング イオン液体 水和

1. 研究開始当初の背景

目的タンパク質を簡便で効率良く得る方法として、大腸菌を宿主とした発現は汎用技術であるが、高い割合で凝集体を生じる。また、タンパク質は *in vitro* での安定性が低く、取り扱い過程で容易に凝集体化する。タンパク質凝集体は基礎的な研究だけでなく、製薬や医療など幅広い分野に影響を及ぼす大きな問題である。凝集体の一般的な再生は、変性剤で凝集体を可溶化後、希釈・透析により変性剤を取り除きリフォールディングを行う。必要となる操作は煩雑で長時間におよび、多量の水を要する。また、再生過程で高い割合で再凝集が生じる。再凝集を抑制するための様々な低分子が開発されているが、タンパク質によって効果は異なり、根本的な解決には至っていない。このようにタンパク質凝集体の再生は長年に及ぶ課題であり、効率的で簡便な手法の提案や開発が強く求められている。

2. 研究の目的

タンパク質の高次構造を保持したままイオン液体中への溶解を可能とすることを見出してきた「水和イオン液体」をベースにし、タンパク質凝集体の溶解からリフォールディングまで効率よく進め、再度水系に戻すことのできるプロトコルを作製することを目的とした。具体的には、イオン構造と水との親和性の相関を整理し、最適な水和イオン液体中で、1)凝集体を溶解し、2)水和状態の変化を通してタンパク質をリフォールディングする。次いで、3)リフォールディング状態を維持したまま、再度タンパク質を水溶液に移動させる方法の検討を行った。

3. 研究の方法

特性の異なるイオン液体を用いて、大腸菌を宿主として発現したタンパク質凝集体の溶解を検討した。タンパク質凝集体を特性の異なる水和イオン液体中で攪拌し、上清を CD 測定、蛍光測定を行うことで溶解性、溶解後の二次構造やフォールディング状態について解析を行った。

凝集体の溶解を示したイオン液体について、水和状態の違いによる溶解性への影響や、溶解後のタンパク質のフォールディング状態について検討を行った。

水和イオン液体中に溶解したタンパク質凝集体を、カラムを利用して水和イオン液体中から水溶液中へ移動させた。

4. 研究成果

(1)大腸菌を宿主として発現したタンパク質凝集体の溶解

大腸菌を宿主としてタンパク質凝集体を発現した大腸菌を超音波破碎し、不溶のタン

パク質凝集体サンプルを得た。このタンパク質凝集体サンプルを極性の異なる水和イオン液体中（含水率は1イオンペアに対して4分子で統一）または純水、緩衝液中で混合し、遠心後の上清について蛍光測定を行った（図1）。タンパク質のトリプトファンに基づく蛍光スペクトルを測定することで、フォールディング状態について解析した。天然状態の可溶体は図1(a)に示すように、340nm付近に蛍光ピークが観測される。これに対して、凝集体を純水、緩衝液中で攪拌を行った場合には、300nm付近に蛍光ピークが観測された（図1(d)(e)）。これは、タンパク質内のトリプトファンが天然状態に比べて極性の低い環境に存在していることを示す。つまりトリプトファンが極性の高い水に接することのないタンパク質内部に存在する強い凝集状態で存在することが示唆された。タンパク質の変性剤であるグアニジン塩酸塩（GdmHCl）中では、蛍光ピークが360nm付近まで長波長シフトしていることが明らかとなった。このスペクトルから、凝集体が可溶化し、トリプトファンが水中に露出したアンフォールディングした状態となっていることが示された。一方、コリニウムカチオン（[ch]）とリン酸二水素アニオン（[dhp]）からなる水和 [ch][dhp] 中で攪拌後の上清スペクトルは、天然可溶状態のスペクトルと同様の340nm付近に蛍光ピークが観測された。このことから水和 [ch][dhp] 中で攪拌した凝集体は天然状態と同様のフォールディング状態を形成していることが示唆された。同様の割合で水和状態を調整した水和 [C₂mim][MeHPO₄]、水和 [C₂mim]BF₄ 中では、蛍光ピークは純水、緩衝液中と同様の位置に観測されたことから、タンパク質は凝集体を形成したままであることが示唆された（図1(f)(g)）。

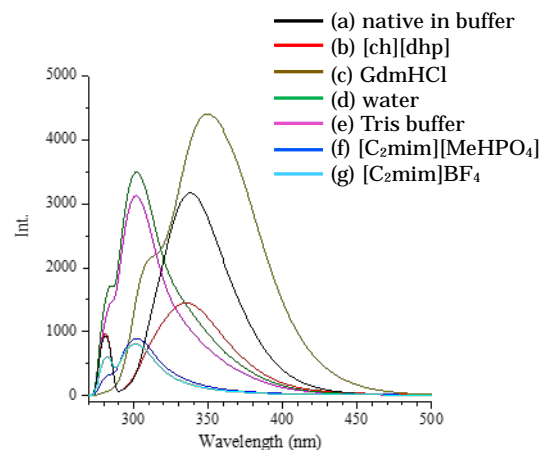


図1 大腸菌で発現したタンパク質凝集体を各種溶液中で攪拌後の上清の蛍光スペクトル

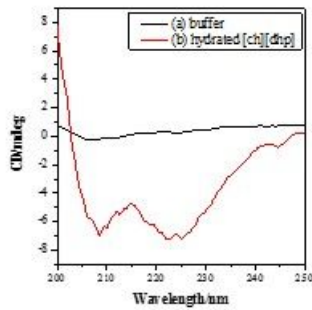


図2 タンパク質凝集体を攪拌後の上清のCDスペクトル

水和[ch][dhp]中での攪拌後の上清で、タンパク質凝集体が天然に類似したフォールディング状態を形成していることが示唆されたことから、同じ上清についてCDスペクトル解析を行った。その結果、水和[ch][dhp]中でタンパク質が、ヘリックス構造を有する状態で溶解していることを示すスペクトルが確認された(図2)。これに対して、緩衝液中ではタンパク質の二次構造を示すスペクトルは観測されず、凝集状態であり、上清にタンパク質は溶解していないことが示された。以上の結果から、大腸菌内で発現したタンパク質凝集体が水和[ch][dhp]中で攪拌することで溶解し、上清に天然状態に類似したフォールディング状態を形成していることが示された。

(2)[ch][dhp]の含水率による凝集体の溶解性及びフォールディング状態への影響

大腸菌で発現した凝集体タンパク質が水和[ch][dhp]中に溶解し、フォールディング状態を形成することが示された。このようなフォールディング形成に適した含水率について検討を行った。異なる含水率で調整した[ch][dhp]中でタンパク質凝集体を混合し、得られた上清について蛍光スペクトル測定を行った(図3)。その結果、含水率によって凝集タンパク質の溶解濃度、及びフォールディング状態が異なることが示された。

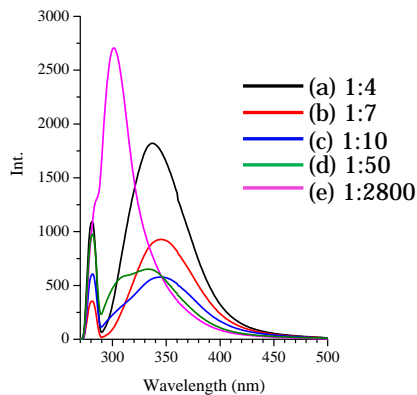


図3 凝集体タンパク質を含水率の異なる水和[ch][dhp]中で攪拌後の上清の蛍光スペクトル

[ch][dhp]が1イオンペアに対して水が4分子程度の場合、タンパク質のトリプトファンに基づく蛍光強度は最も高く、また天然と類似したフォールディング状態を形成していると考えられる蛍光ピークが340nm付近に観測された(図3(a))。これに対して、含水率が高くなるに従って蛍光強度は減衰し、さらに蛍光ピーク位置も短波長側にシフトした。この結果から、1イオンペアに対して4分子の水が存在する状況がタンパク質凝集体の溶解とフォールディング状態の形成に適していることが示された。

(3) 水和[ch][dhp]中で再生したりフォールディング状態のタンパク質の水溶液中への移動

1イオンペアに対して4分子の水が存在する水和[ch][dhp]中で攪拌することで、大腸菌中で発現した凝集体タンパク質は溶解し、そのままフォールディング状態を形成することが明らかとなった。そこで、フォールディング状態を形成したまま水溶液中に溶解させるための検討を行った。限外濾過やゲル濾過を用いた検討を行ったが、途中でタンパク質の再凝集などが観測され、フォールディング状態を保持したまま水溶液中に溶解することはできなかった。そこで、疎水性クロマトグラフィであるフェニルカラムを用いた検討を行った。水和[ch][dhp]中にタンパク質が溶解したサンプルをカラムにロードし、その後、緩衝液を通液することでタンパク質を溶出した。イオン伝導度を測定しながらイオン濃度のモニタリングを行った。イオン液体が完全に溶出した後に溶出したタンパク質を含むフラクションを回収し蛍光測定を行った結果、天然とほぼ同様の位置に蛍光ピークを有するスペクトルが観測された(図4)。しかしながら、タンパク質の回収率はかなり低かった。タンパク質濃度は低かったが活性解析を行ったところ、感度は低いものの、活性を示す結果が得られた。以上の結果から、水和[ch][dhp]中に溶解したタンパク質のフ

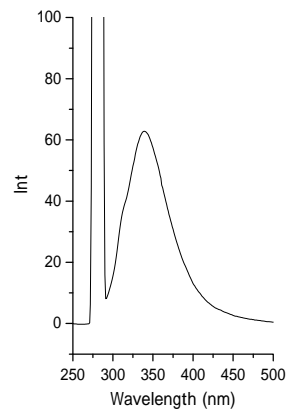


図4 フェニルカラムで溶出したタンパク質の蛍光スペクトル

オールディング状態や活性を維持したまま [ch][dhp]を取り除き、水溶液中に移動させることができることを示した。

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 5 件)

K. Fujita, J. Kuwahara, N. Nakamura, H. Ohno, Fast electron transfer reaction of azurin fixed on the modified electrode in hydrated ionic liquids, *Journal of Electrochemical Society*, 査読有, 16, G79-G81 (2016). DOI: 10.1149/2.0301607jes

K. Fujita, M. Sanada, H. Ohno, "Sugar chain-binding specificity and native folding state of lectin preserved in hydrated ionic liquids", *Chem. Commun.*, 査読有, 51, 10883-10886 (2015). DOI: 10.1039/c5cc03142g

H. Ohno, K. Fujita, Y. Kohno, "Is seven the minimum number of water molecules per ion pair for assured biological activity in ionic liquid-water mixtures?", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 査読有, 17, 14454-14460 (2015). DOI: 10.1039/c5cp00768b

D. Kobayashi, K. Fujita, N. Nakamura, H. Ohno, "A simple recovery process for biodegradable plastics accumulated in cyanobacteria treated with ionic liquids" *Appl Microbiol Biotechnol*, 査読有, 99,1647-1653, (2015). DOI:10.1007/s00253-014-6234-1

Y. Nikawa, K. Fujita, K. Noguchi, H. Ohno, "2-(Trimethylazaniumyl)ethyl hydrogen phosphate (phosphocholine) monohydrate" *Acta Cryst.*, 査読有, E70, o549 (2014). DOI:10.1107/S160053681400779X

〔学会発表〕(計 20 件)

吉岡大輔、藤田恭子、大野弘幸、水和イオン液体/可溶化剤複合系を用いたコンカナバリン A 凝集体の再生、第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 25 日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

M. Sanada, K. Fujita, H. Ohno, Preservation of Lectin in Hydrated Ionic Liquid, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 17 Dec 2015, Honolulu, USA

M. Kajiyama, K. Fujita, H. Ohno, Hydrated Ionic Liquids as Effective Solvent of Renaturation of Aggregated Recombinant Cellulase Expressed in Escherichia Coli, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 17 Dec 2015,

Honolulu, USA

M. Kajiyama, K. Fujita, H. Ohno, Renaturation of Aggregated Recombinant Cellulase Expressed in Escherichia Coli by Dissolution in Hydrated Ionic Liquids, 5th International Congress on Ionic Liquids, 17 June 2015, Jeju, Korea

M. Sanada, K. Fujita, H. Ohno, Preservation of Lectin in Hydrated Ionic Liquid, 5th International Congress on Ionic Liquids, 17 June 2015, Jeju, Korea

K. Fujita, Evaluation of Folding State of Concanavalin A Dissolved in Hydrated Ionic Liquid, 2014 Sophia Symposium on Ionic Liquids, 31 Oct 2014, 上智大学、東京都千代田区

藤田恭子、真田美希、大野弘幸、水和コリニウムリン酸二水素に溶解したコンカナバリン A のフォールディング状態の解析、第 5 回イオン液体討論会、2014 年 10 月 29 日、横浜シンポジウム、神奈川県横浜市

K. Fujita, A. Takasaki, Y. Fujita-Yamafuchi, H. Ohno, Thermal Behavior of Concanavalin A Dissolved in Hydrated Cholinium Hydrogen Phosphate, 4th Asia-Pacific Conference on Ionic Liquids and Green Process/ 6th Australian Symposium on Ionic Liquid 2014, 1 Oct 2014, Sydney, Australia

藤田恭子、大野弘幸、水和コリニウムリン酸二水素中に溶解したコンカナバリン A のフォールディング状態、第 63 回高分子討論会、2014 年 9 月 26 日、長崎大学、長崎市

他 11 件

〔図書〕(計 1 件)

K. Fujita, "Ionic liquid in bioanalysis" *Analytical Applications of Ionic Liquids*, M. Koel ed., World scientific Publishing UK Ltd. (2016) in press

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
該当なし

取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕

ホームページ等 (大野研究室 HP 内)
<http://www.tuat.ac.jp/~ohno/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 恭子 (FUJITA, Kyoko)
東京農工大学・大学院工学研究院・講師
研究者番号: 90447508