

水和イオン液体を用いたセルラーゼ凝集体の溶解と再構成

(東薬大薬) ○伊藤杏奈・柳澤峻・市田公美・藤田恭子

Dissolution and refolding of aggregated recombinant cellulase in hydrated ionic liquids

(The University of Pharmacy and Life Sciences) ○Anna Ito, Shun Yanagisawa, Kimiyoshi Ichida, Kyoko Fujita

Protein expression using *E. coli* as a host is a general method, however, sometimes, it forms an inactive aggregated protein. In this study, hydrated ionic liquids (HyILs) was used as a treatment solvent to dissolve aggregated protein and induce refolding behavior. Firstly, the solubility of aggregated recombinant cellulase in HyILs was investigated. ILs consisting of phosphonium or ammonium cations with different alkyl chain lengths were paired with dihydrogen phosphate anions or bromine ions (Fig.1). HyILs were prepared by addition of small amount of water to the synthesized ILs. The water content was unified to be 3 water molecules per ion pair. Aggregated cellulase was added and stirred in the HyILs, then the solubility was evaluated by fluorescence spectrum of the supernatant obtained after centrifugation. Fluorescence intensity was different with alkyl chain length of HyILs. Aggregated cellulase dissolved well in [P₄₄₄₄][dhp] and [P₄₄₄₈][dhp]. When it was analyzed the folding state of aggregated cellulase after dissolution in HyILs, the reconstruction of folding state was suggested. Especially, the refolding states of aggregated cellulase after dissolution in [N₈₈₈₈][dhp] and [ch][dhp] indicated similar manner with native cellulase.

Keywords : Hydrated ionic liquids; Refolding; Aggregated cellulose; Recombinant protein

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、不活性の凝集タンパク質を形成してしまうことがある。凝集タンパク質を効率的に再生する方法として水和イオン液体 (HyILs) を場とした検討を行った。モデルタンパク質として大腸菌の培養条件によって可溶体と凝集体の発現を制御できるセルラーゼを用いた。HyILs 中への凝集セルラーゼの溶解とその後のフォールディング状態と活性について解析した。凝集セルラーゼを高濃度に溶解する HyILs を探索するため、ホスホニウムおよびアンモニウムカチオンを基本構造としてアルキル鎖長の異なるカチオンとリン酸二水素アニオンあるいは臭素イオンからなるイオン液体を合成した (Fig.1)。HyILs の含水率は先行研究の結果¹を踏まえ、合成した ILs の 1 イオンペアに対して 3 分子の水が存在するよう調整した。HyILs 中に凝集セルラーゼを混合・攪拌し、遠心分離後の上清を蛍光スペクトル測定し溶解性を評価した。カチオンのアルキル鎖長により溶解度は異なり、[P₄₄₄₄][dhp]や [P₄₄₄₈][dhp]は凝集セルラーゼを高濃度に溶解した。HyILs に溶解後の凝集セルラーゼのフォールディング状態を解析した結果、[N₈₈₈₈][dhp]や [ch][dhp]中に溶解した凝集セルラーゼは native セルラーゼとほぼ同様に再構成していることが示唆された。

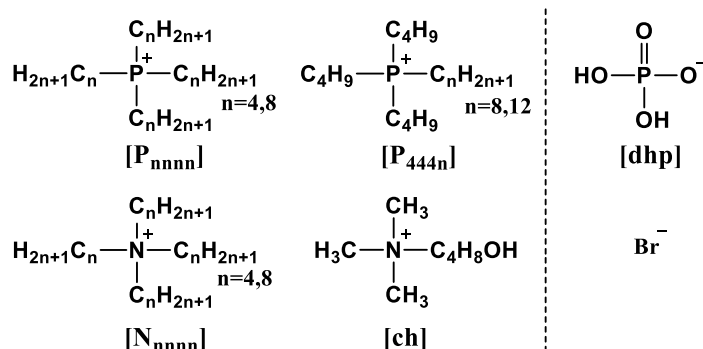


Fig.1 合成したイオン液体の構造

[1] K. Fujita, R. Nakano, R. Nakaba, N. Nakamura H. Ohno, *Chem. Commun.*, 55, 3563 (2019)