総説

タンパク質の解離・会合を圧力で制御する

鎌足雄司 岐阜大学人獣感染防御研究センター／理化学研究所タンパク質構造・機能研究グループ/同 城生体金属科学研究室

Aggregation of proteins is a serious problem, affecting both human health and industrial production of proteins. We have recently succeeded in showing that association and dissociation of amyloid protofibrils can be controlled reversibly with pressure and the protofibril formation is a slow process toward thermodynamic equilibrium. Extensive studies have recently been carried out also by other workers on dissociation of oligomer/aggregate of proteins using high pressure. This article reviews the current progress of such studies including dissociation of amyloid fibrils and refolding from inclusion bodies. These studies show that pressure is one of the useful tools for controlling protein dissociation and association reaction.

high pressure / protein aggregation / amyloid / NMR

1. はじめに

タンパク質は本質的に動的な側面をもつ。タンパク質には、熱力学的に最安定（静的）な天然状態だけではなく、準安定状態を含めたさまざまな非天然状態が存在し、平衡状態で共存している。それら非天然状態の存在や状態間の揺らぎは、タンパク質の機能発現、安定性、凝集、寿命などにおいて重要な役割を果たしている。これまでわれわれは高圧と NMR を用い、タンパク質の動的な側面に焦点を当てた研究を展開してきた¹⁾⁻⁶⁾。

タンパク質の動的な側面の 1 つとして、凝集やアミロイド形成があげられる。この凝集・アミロイド形成は、タンパク質フォールディングと同様に、普遍的な現象であることがわかってきた⁷⁾。また、凝集・アミロイド形成の問題は、プリオン病やアルツハイマー病をはじめとする“コンフォメーション病”と深くかかわっており、医学的見地からも重要である。

圧力は“体積”を変える。ここで“体積”とは、タンパク質そのものの体積だけではなくその影響下にある水和相も含めた実質的な体積をさしている。正確には、タンパク質のモル当たり換算したとき、部分モル体積とよばれる量である。加圧により体積の小さい状態が安定化される。どれだけ体積が変わりうるかは、分子内部の原子のパッキングと分子表面の水和に

より決まる⁸⁾。タンパク質の圧力応答は、Fig. 1 に示すように、大まかにいって 3 つの様式に分けられる。

Fig. 1a は、同一状態内での体積の減少を示している。タンパク質内部の原子は有機分子の結晶並みに密にパッキングしている。しかし、その充填密度は場所によりかなりのばらつきがあり、充填密度の低い部分には隙間（キャビティ）が存在する。これらの隙間がタンパク質分子内の原子の揺らぎの場となる。式 (1) に示すように、圧力による体積変化 (ΔV) は、等温圧縮率 (β) に依存し、圧縮率は体積の揺らぎ $\langle(\delta V)^2\rangle$ と直接関係づけられる。つまり、圧力を使って体積の揺らぎを調べるわけである。

$$\Delta V = -\beta V(P - P_0) \\ \langle(\delta V)^2\rangle = \beta V k T \quad (1)$$

ここで V はタンパク質の部分モル体積、 P は圧力、 k はボルツマン定数である。われわれは高圧 NMR 法を用い、タンパク質内部の体積の揺らぎを原子レベルで可視化することに初めて成功した。これにより、水素結合の短縮、結合角の変化、三次構造の変化、芳香環の回転運動の抑制、キャビティおよびキャビティ内に埋もれた水和水周辺の圧縮などを明らかにしてきた¹⁾⁻⁶⁾。

さらに高圧側では、Fig. 1b に示すように、より体積の小さい状態への構造転移が起こることにより系の

Controlling Protein Dissociation and Association Reactions Using High Pressure

Center for Emerging Infectious Diseases, Gifu University, Protein Research Group and Biometal Science Laboratory, RIKEN

Yuji O. KAMATARI

Fig. 1

Schematic representation showing how proteins in solution can attain lower effective volume.

体積は減少する。たとえば、天然構造が壊れてキャビティが消失することによりタンパク質の体積は減少する。また、特に疎水性残基や電荷をもつ残基の水和は体積の減少に寄与する^{8),9)}。つまり、これまでタンパク質内部に埋もれていた側鎖が外部に露出し、水和量が増加することによっても、タンパク質の体積は減少する。等温での構造転移の自由エネルギー ΔG は

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta V_0(P - P_0) - \frac{\Delta \kappa}{2}(P - P_0)^2 \quad (2)$$

で表される。 ΔG_0 は標準状態での自由エネルギー差、 ΔV_0 は標準状態での体積差、 $\Delta \kappa$ は等温での圧縮率の差である。これまでに高圧 NMR 法により多くのタンパク質で、常圧下では大きな天然状態のポピュレーションにより隠され観測できなかった準安定構造や中間状態が安定化され観測されることが示されてきた¹⁾⁻⁶⁾。

また、Fig. 1c は、解離・会合平衡の圧力応答を模式化したものである。解離に伴い、会合面におけるキャビティの減少により体積が減少する。また、会合面が溶媒に露出し水和量が増加することによっても、タンパク質の体積は減少する。この場合、解離の自由エネルギー差 (ΔG) は、単量体 n 個が協同的に会合して n 量体を形成する反応が可逆的に起こると仮定すると、

$$\Delta G = -RT(\ln(n) + n \ln[M] - \ln(C_t - [M])) \quad (3)$$

で表すことができる。ここで $[M]$ および C_t はそれぞれ単量体のモル濃度およびすべてを単量体に換算した場合の全タンパク質のモル濃度を表している。この式

は、 n が大きくなると自由エネルギー差は大きくなる、つまり、多量体の会合数が多いほど圧力に対して感受性が高いことを示している。この Fig. 1c では解離・会合に伴う構造変化はないと仮定したが、解離に伴いもとの構造も失われるような場合には、Fig. 1b と Fig. 1c の 2 つの反応をあわせた体積変化が期待できる。

このように、圧力をコントロールすることにより解離・会合を制御できる可能性がある。本総説では、最近の研究例をあげながら、圧力による解離・会合の制御の可能性について探っていきたい。

2. 天然構造会合体の圧力解離

天然構造の会合体に圧力をかけると会合体は解離する。古くは、F アクチンの圧力解離の例がある¹⁰⁾。その他にも天然構造オリゴマータンパク質の圧力による解離には多くの例があるが、最近の例では Niraula らのトランスサイレチン (TTR) の 4 量体の圧力解離のデータがある¹¹⁾。TTR の V30M 変異体は家族性アミロイドポリニューロパシーを引き起こす変異の 1 つである。このタンパク質の野生型と V30M 変異体には、結晶構造上大きな違いは見られない。彼らは高圧 NMR を利用して、野生型と変異型の両方について、解離の自由エネルギー ΔG° を初めて見積もることに成功した。そして、その差 $\Delta \Delta G^\circ$ が -18 kcal/mol であることから、モノマー濃度に換算すると変異体の方が 1000 倍くらい解離しやすいことを明らかにした。アミロイド形成の前駆体となりうるモノマーの出現確率が上がることが、この変異体のアミロイド形成能に効いていると考えることができる。

3. アミロイド・アミロイドプロトフィブリルの圧力解離

アミロイドやアミロイドプロトフィブリルはよく知られた規則構造をとっており、アモルファスな凝集体とは区別して議論されることが多い。アミロイド・アミロイドプロトフィブリルも圧力により解離できることが最近いくつか報告されている¹²⁾⁻¹⁶⁾。

たとえば、Niraula らは、S-S 結合を除いた変異体 OSS リゾチームを用いて、アミロイドの前駆体である可溶性の会合体（後にアミロイドプロトフィブリルと判明）の圧力解離を報告している¹²⁾。OSS リゾチームは生理条件下で特定の三次構造をもたず、数日の単位で会合体を形成する。アミロイドプロトフィブリルの分子量は NMR で観測するには大きすぎるため NMR

Fig. 2

$^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC spectra of uniformly ^{15}N -labeled OSS lysozyme at various pressures. Reprint from Ref. 12. Copyright 2004 National Academy of Sciences, U.S.A.

シグナルは広幅化し観測することはできない。しかし、この会合体に圧力をかけると、会合体は解離し単量体の NMR スペクトルが出現する (Fig. 2)。このとき (3) 式を仮定すると、解離の自由エネルギー差は -23.3 kJ/mol 、体積変化は -52.7 ml/mol と求められた。

また、われわれは高圧ジャンプ NMR 法を用いて、S-S 結合を除いた OSS リゾチームのアミロイドプロトフィブリルの高圧下での解離および常圧下での会合過程を、直接観測することに成功した¹³⁾。アミロイドプロトフィブリルに対して 200 MPa の圧力をかけると、プロトフィブリルは徐々に解離し、モノマー状態の濃度が増え、NMR のシグナル強度が徐々に増加していく (Fig. 3a, 3b)。さらに、圧力を常圧にもどすと再びゆっくりした凝集を観測できる。この解離・会合反応は完全に可逆で、圧力をコントロールすることにより何度でも繰り返すことができる (Fig. 3c)。つまりこれらのデータは、アミロイドプロトフィブリルの形成が、部分モル体積の増加を伴う熱力学的平衡へ向かうゆっくりとした過程であることを示している。

われわれ以外にもいくつかのグループがアミロイドまたはアミロイドプロトフィブリルの圧力実験を行っている。Foguel らは α シヌクレインと TTR のアミロイド線維の圧力解離を行い、アミロイド線維にも多くのキャビティが存在し圧力に感受性があることを示した¹⁴⁾。また、Dirix らは TTR105-115 というペプチドを用い、このペプチドは、アミロイド形成の初期段階では圧力解離は可能だが、成熟したアミロイドでは 1.3 GPa まで加圧しても解離しないことを報告した¹⁵⁾。また、Chatani らは、 $\beta 2$ ミクログロブリンの場合も成熟したアミロイド線維は 400 MPa までの加圧では解離しないが、ある程度変性剤を加えると圧力解離が可能となることを示した¹⁶⁾。また、彼女らのデータは、成熟したアミロイド線維にもかなりのキャビティが存在し、これが高圧下ではさらに密にパッキングした新たなアミロイド構造に転移する (Fig. 1b のように) ことを示しており非常に興味深い。

上記の例のように、通常の高圧実験で利用可能な数千気圧から数万気圧の圧力範囲内で、アミロイド線維は解離する場合もそうでない場合もある。これは、個々のアミロイドの構造 (構造の違いに起因する圧力安定性) や線維の長さなどいろいろなことに起因していると思われる。たとえば、われわれは圧力ジャンプ実験により、凝集が進んだプロトフィブリルの解離にはより多くの時間がかかることを示した¹³⁾。そして、基本的にはアミロイド末端から解離・会合が起こり、線維の成長に伴いフィブリル同士の重合が起こり、末端の数が減るという単純なモデルでこの実験データが説明できることを示した。また、Meersman らは線維の成熟に伴いアミロイド線維自身がより安定なものに変化することも線維の圧力感受性にかかわっていることを指摘している¹⁷⁾。

4. 圧力処理による感染型プリオンの感染性の減少

感染型プリオンの構造についてはまだ多くの議論が残っている。Govaerts らは β ヘリックス構造をもつ 3 量体のモデル構造を発表している¹⁸⁾。また Silveira らは最大の感染能をもつのは 14-28 量体であることを報告している¹⁹⁾。現時点では、感染型プリオンが他のタンパク質のアミロイドと同じような構造をもっているかどうか議論の余地は大きい。感染型プリオンが非天然構造の会合体であることは間違いないと思われる。実際に、感染型プリオンの圧力処理 (1.2 GPa, 135°C, 3-10 min) により LD_{50} (化学物質の毒性の指標であり、投与した動物の半数が死亡する投与量) は

Fig. 3

Real-time ¹H NMR observation of the dissociation of protofibrils of the OSS lysozyme on pressure-jump from 3 to 200 MPa at 25°C. (a) ¹H NMR spectra of the OSS lysozyme at different time intervals after the jump. (b) Plot of the methyl signal intensity at ~0.9 ppm in (a) against time after the jump. (c) Schematic representation of the pressure dissociation of the protofibrils. Reprint from Ref. 13 with permission from Elsevier.

10^3 から 10^6 へ増加する。つまり、感染性は大きく減少するという報告がある²⁰⁾。同様の報告は、1.0 GPa, 60°C, 2 h という条件²¹⁾ や 0.8 GPa, 60°C, 60 min という条件²²⁾ の圧力処理でも報告されているが、いずれも感染能は減少するが完全に取り除くことには成功しておらず、圧力感受性の高い感染型プリオンと圧力感受性の低い感染型プリオンの2種類の構造の存在が示唆されている²²⁾。

5. 封入体や非アミロイド性の凝集体の圧力解離とタンパク質リフォールディングへの応用

タンパク質そのものの研究や医薬品としての利用のため、組み換えタンパク質を大量に発現することの需要はこれまで以上に高まっている。このとき、外来性タンパク質を微生物内で大量発現する際にしばしば見られる不溶性の封入体（インクルージョンボディ）は大きな問題となっている。たとえば、多種類のタンパク質の発現を大腸菌で試みた場合、その10%弱が不溶性画分として発現したというデータがある。そのために、これらの封入体や非アミロイド性の凝集を効率的に巻き戻し、目的のタンパク質の天然構造を再生するための研究が多くなされている²³⁾⁻²⁸⁾。これは、一般的には、封入体を強い変性剤で変性・可溶化させ、その後、変性剤を除き天然構造への巻き戻しを行うという手順で行われる。

封入体の構造に関してはまだ多くの議論が残っているが、少なくとも非天然構造の会合体を作っているこ

とは確かである²³⁾。タンパク質の種類や溶媒条件にもよるが、天然構造は通常100 MPa程度でも安定であるのに対して、会合体の解離反応は100 MPa以下でも起こりうる（たとえばFig. 2の例のように）。実際に、この封入体や非アミロイド性の凝集の巻き戻しに圧力を使った例がいくつか報告されている^{26), 27)}。圧力制御は系に余分な化学物質を添加しないので、変性剤での変性などに比べてその後の扱いが格段に簡便になる。非アミロイド性の凝集を圧力により解離し天然状態に巻き戻すという例は、ローダマーゼ、ヒト成長ホルモン、リゾチームなどで報告されている。また、封入体でも、βラクタマーゼやテールスパイクプロテインなどいくつかのタンパク質で報告されている。巻き戻りの収率は、常圧では巻き戻りの際のタンパク濃度に大きく依存するが、高圧下ではタンパク濃度依存性が小さく、特に、高濃度での巻き戻りについては高圧下の方が収率はよい²⁸⁾という報告は注目に値する。最近、BaroFold社はPreEMTTMテクノロジーという名称で、圧力を使って封入体や凝集体の試料をリフォールディングするサービスや装置の提供をはじめた。

6. 圧力凝集

これまで議論してきたように、加圧は解離・会合の平衡を解離の方向へ動かす。しかし、本来タンパク質は凝集する傾向をもっており、加圧下では凝集する性質は小さくなるものの、まだ凝集性をもつ場合も多く

存在する。特に、非天然状態は疎水性側鎖を露出した構造をもつため凝集の傾向が強い。これに対して、天然状態は特定の立体構造を保持しているため、凝集反応は進みにくい。このため、加圧により、天然状態が不安定化し、非天然状態の出現確率が増加するため、凝集が進行する場合もある^{29), 30)}。また、食品の分野では、この“加圧によるタンパク質の圧力変性と変性により生じた分子間相互作用に起因するゲル形成性”が利用され、食品加工が行われている場合がある。ちなみに、こうして作られた食品は、加熱による加工品と比べ、生の食材の香り、色、風味などが保たれた高品質なものになるらしい。

7. 今後の展望

タンパク質の解離・会合の平衡は、加圧により解離の方向へ移動する。しかし、現実の系では個々の状態の安定性や圧縮率、状態間の転移速度など複数の要素が複雑に絡み合っている。つまり、現段階ではやってみないとわからないというところが多い。しかしながら、圧力で解離・会合を制御するという試みは、(1)天然状態の会合体だけでなくアミロイドを含めた凝集体の解離・会合の機構を明らかにするため、(2)凝集体から天然構造へのより効率的で簡便な巻き戻しを実現するため、(3)凝集を抑えて天然状態または中間状態の構造研究を可能にする条件を実現するために、今後の展開が大いに期待される。

謝 辞

ここに紹介した結果の多くは近畿大学・赤坂一之教授、理化学研究所・横山茂之教授、神戸大学・橘秀樹助教授らとの共同研究である。また、原稿に目を通して貴重なコメントを頂いた赤坂一之教授、大西哲博士、松本友治博士、中村寛則博士、山口圭一博士、李華博士に感謝する。

文 献

- 1) 赤坂一之 (2001) 生物物理 **42**, 206-211.
- 2) 赤坂一之, 李 華 (2001) 蛋白質 核酸 酵素 **46**, 208-219.
- 3) Akasaka, K. and Yamada, H. (2001) *Methods Enzymol.* **338**, 134-158.
- 4) Kamatari, Y. O., Kitahara, R., Yamada, H., Yokoyama, S. and Akasaka, K. (2004) *Methods* **34**, 133-143.
- 5) Li, H. and Akasaka, K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* **1764**, 331-345.
- 6) Akasaka, K. (2006) *Chem. Rev.* **106**, 1814-1835.
- 7) Dobson, C. M. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 3-16.
- 8) 月向邦彦 (1996) 蛋白質 核酸 酵素 **41**, 2025-2036.
- 9) Silva, J. L. and Weber, G. (1993) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 89-113.
- 10) Ikkai, T. and Ooi, T. (1966) *Biochemistry* **5**, 1551-1560.
- 11) Niraula, T. N., Haraoka, K., Ando, Y., Li, H., Yamada, H. and Akasaka, K. (2002) *J. Mol. Biol.* **320**, 333-342.
- 12) Niraula, T. N., Konno, T., Li, H., Yamada, H., Akasaka, K. and Tachibana, H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4089-4093.
- 13) Kamatari, Y. O., Yokoyama, S., Tachibana, H. and Akasaka, K. (2005) *J. Mol. Biol.* **349**, 916-921.
- 14) Foguel, D., Suarez, M. C., Ferrao-Gonzales, A. D., Porto, T. C., Palmieri, L., Einsiedler, C. M., Andrade, L. R., Lashuel, H. A., Lansbury, P. T., Kelly, J. W. and Silva, J. L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9831-9836.
- 15) Dirix, C., Meersman, F., MacPhee, C. E., Dobson, C. M. and Heremans, K. (2005) *J. Mol. Biol.* **347**, 903-909.
- 16) Chatani, E., Kato, M., Kawai, T., Naiki, H. and Goto, Y. (2005) *J. Mol. Biol.* **352**, 941-951.
- 17) Meersman, F. and Dobson, C. M. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* **1764**, 452-460.
- 18) Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. and Cohen, F. E. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8342-8347.
- 19) Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F. and Caughey, B. (2005) *Nature* **437**, 257-261.
- 20) Brown, P., Meyer, R., Cardone, F. and Pocchiari, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6093-6097.
- 21) Garcia, A. E., Heindl, P., Voigt, H., Buttner, M., Wienhold, D., Butz, P., Starke, J., Tauscher, B. and Pfaff, E. (2004) *J. Gen. Virol.* **85**, 261-264.
- 22) Garcia, A. E., Heindl, P., Voigt, H., Buttner, M., Butz, P., Tauber, N., Tauscher, B. and Pfaff, E. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 9842-9847.
- 23) 津本浩平, 三沢 悟, 熊谷 泉 (2001) 蛋白質 核酸 酵素 **46**, 1238-1246.
- 24) 荒川 力, 勝山 巖, 熊谷 泉, 津本浩平 (2003) 蛋白質 核酸 酵素 **48**, 2310-2317.
- 25) 白木賢太郎 (2004) 生物物理 **44**, 87-90.
- 26) Randolph, T. W., Seefeldt, M. and Carpenter, J. F. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1595**, 224-234.
- 27) Foguel, D. and Silva, J. L. (2004) *Biochemistry* **43**, 11361-11370.
- 28) St. John, R. J., Carpenter, J. F. and Randolph, T. W. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13029-13033.
- 29) Ferrao-Gonzales, A. D., Souto, S. O., Silva, J. L. and Foguel, D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6445-6450.
- 30) De Felice, F. G., Vieira, M. N., Meirelles, M. N., Morozova-Roche, L. A., Dobson, C. M. and Ferreira, S. T. (2004) *FASEB J.* **18**, 1099-1101.

鎌足雄司

鎌足雄司 (かまたり ゆうじ)

岐阜大学人獣感染防御研究センター助手

1996年神戸大学自然科学研究科物質科学専攻博士課程後期終了, 学術振興会特別研究員, オックスフォード大学博士研究員, HFSP 研究員, 理研研究所基礎科学特別研究員, 理化学研究所研究員を経て 05 年より現職

研究内容: タンパク質の構造および揺らぎの研究とそれを応用した創薬

連絡先: 〒501-1194 岐阜市柳戸 1-1

E-mail: kamatari@gifu-u.ac.jp

研究室 URL: www.gifu-u.ac.jp/~ceid/