報 文

トレハロースによるタンパク質の酸変性及び凝集に対する回復作用

味戸 聡志¹, 平井 光博^{*1}

糖やポリオールをはじめとするオスモライト（浸透圧調節物質）により，タンパク質の変性や凝集が抑制され，酵素の失活が防がれることが古くから知られている．中でも非還元性二糖のトレハロースは，極限環境への耐性をもつ生物が生産することから優れた安定化作用をもつと考えられ，いまなお盛んに研究が行われている．今回著者らは放射光広角 X 線散乱（SR-WAXS）を用い，pH 3.5 の酸性溶媒中で凝集した牛ミオグロビンをトレハロースが解離させ，天然構造に近い構造にフォールドさせることを見いだした．凝集阻害剤として種々のオスモライトが有効であることは既知であるが，凝集体を解離させる添加剤としてよく知られるものは，変性剤や界面活性剤といった細胞毒性を示すものがほとんどである．したがって本報告は，トレハロースが人体に無害なタンパク質凝集解離剤として有望であることを示唆すると同時に，共存分子存在下のタンパク質構造解析における，広角散乱法の有用性を示すものである．

1 緒 言

オスモライトとは浸透圧ストレスを緩和するために細胞内に蓄積される低分子化合物の総称であり，糖やポリオール，アミノ酸及びその誘導体，メチルアミン類等が含まれる¹⁾．なかでも糖やポリオールは，その他の環境ストレス，例えば高温や低温への暴露に対して合成や細胞内への蓄積が行われることが知られている¹⁾．この応答は，生体高分子の安定性を高め，正常な生命活動を再開できる状態を保持することが目的と考えられている．一方，タンパク質の変性凝集や酵素の失活が抑制されることが明らかとされており，生化学における様々な研究分野や，食品科学といった産業分野でも利用されている²⁾³⁾．タンパク質の安定性を議論する上でその水和状態は重要な要素であるが，糖とポリオールはともにコスモトロープ（水構造化因子）に分類され，タンパク質の水和状態に大きく寄与することが示唆されている⁴⁾．この水和状態の変化を含めたタンパク質の表面張力及び自由エネルギーの変化が，糖やポリオールによる安定化の要因と考えられている^{5)~7)}．

糖の中でもトレハロースは特に注目され，その生体保護作用について盛んに研究されている．トレハロースはスクロースと同様に非還元性の二糖であり，化学的に安定な化合物である．さらに，クマムシやネムリユスリカが行う cryptobiosis（無代謝状態）と密接にかかわることや⁸⁾，冬眠に入る前の両生類や昆虫⁹⁾，高温へ暴露された酵母で選択的に合成されることが知られている¹⁰⁾．物性的にも特徴

があり，スクロースやマルトースと異なり分子内水素結合を形成せず¹¹⁾，固有粘度や水分子の配向性が他の糖に比べて大きいこと等が明らかとされている¹²⁾¹³⁾．これらの特性からトレハロースが高い安定化作用をもつと考えられているが，その詳細な働きや作用メカニズムはいまだ不明瞭である²⁾．

本研究では，X 線広角散乱を用いて，タンパク質の酸変性により生じた凝集体をトレハロースが解離させることを明らかとした．タンパク質単分子に対する安定化剤としては様々なオスモライトが有効であることが知られており，糖やポリオールも安定化剤に分類される¹⁴⁾．一方で，尿素やグアニジン塩酸塩をはじめとする変性剤や，一部の界面活性剤はタンパク質の可溶化剤として知られるが¹⁵⁾，いずれも細胞毒性を示す化合物であり，生体への投与やタンパク質製剤への応用は困難である．したがって著者らの研究成果は，人体に無害なタンパク質凝集体の解離剤としてのトレハロースの有用性及び実用性を示唆するものである．加えて，多様な共存分子存在下におけるタンパク質の構造解析について，X 線広角散乱法の優位性を再度明確にするものである．

2 実 験

2.1 試 料

測定試料には，牛骨格筋由来のミオグロビン（Worthington Biochemical Co.）を用いた．pH 7.0, pH 6.0, pH 5.0 に調整した 10 mmol L⁻¹ HEPES (*N*-(2-hydroxymethyl)piperazine-*N'*-(2-ethane-sulfonic acid))，25 mmol L⁻¹ NaCl 溶液と，pH 4.0, pH 3.5, pH 3.0 に調製した 20 mmol L⁻¹ sodium

* E-mail: mhirai@gunma-u.ac.jp

¹ 群馬大学大学院理工学府: 371-8510 群馬県前橋市荒牧町 4-2

Fig. 1 WAXS curves of bovine myoglobin depending on the mass concentration of trehalose at pH 7.0

The protein concentration is 10.3 mg mL⁻¹ in 10 mmol L⁻¹ HEPES and 25 mmol L⁻¹ NaCl buffer at pH 7.0 at 25 °C. The trehalose concentration was varied up to 30 % w/w.

citrate, 5 mmol L⁻¹ NaCl 溶液を緩衝液として用いた。牛ミオグロビンを各緩衝液に 80 mg mL⁻¹ で溶解させて 1 日静置したのち、0.1 μm の分子量カット遠心フィルター (Merk) を用いて既存の凝集体を 1 度取り除き、さらに 1 日静置した。作製したタンパク質溶液とトレハロース二水和物 (林原) から作成した糖原液を 1:3 の体積比で混合し、最終的にトレハロース濃度 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 % w/w のミオグロビン溶液とバックグラウンド溶媒を作製した。測定試料のミオグロビン濃度は、280 nm の吸光度測定 (UV-1800, 島津) から 9.2 ~ 10.3 mg mL⁻¹ と決定された。作製した試料溶液を室温で約 1 時間静置した後、X 線散乱測定を行った。

2・2 放射光 X 線広角散乱測定

SR-WAXS 測定には高エネルギー加速器研究機構 PF の BL-10C 及び高輝度光科学センター SPring-8 の BL-40B2 を利用した。X 線の波長はそれぞれ 1.5 Å 及び 1.0 Å、カメラ長は 30 cm 及び 60 cm とし、有効な測定範囲は $\sim 0.04 \text{ Å}^{-1} < q < \sim 1.0 \text{ Å}^{-1}$ であった。溶液試料を封入する測定セルには、光路長 1 mm のステンレス製のものを用い、X 線透過窓には 10 μm の石英薄板を用いた。試料セルの温度は 25 °C に保持し、各測定の露光時間は 60 秒とした。

2・3 データ解析及び理論散乱関数シミュレーション

溶液試料は散乱体の無配向性により等方的な散乱を与えるため、二次元検出器から得られた散乱強度を円周平均することで一次元の散乱曲線 $I(q)$ に変換する。測定範囲の $\sim 0.04 \text{ Å}^{-1} < q < \sim 1.0 \text{ Å}^{-1}$ は、実空間距離の 160 Å ~ 6.3 Å に相当する。ここで q は散乱ベクトルの大きさを表し、以

下の式で定義される。

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (1)$$

θ は散乱角、 λ は X 線の波長である。溶液散乱法では、試料の散乱から溶媒の散乱を差し引くことで溶質の散乱曲線 $I(q)$ を導く。差し引きは溶質の排除体積と透過率を考慮した一般的な方法で行った¹⁶⁾。 q の小さい領域では、 $I(q)$ は次式で近似されることが知られる。

$$I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (2)$$

したがって、 $\ln I(q)$ を q^2 に対してプロット (Guinier プロット) すると、直線勾配から回転半径 R_g が求まる。 R_g は分子の広がりを反映するパラメーターである。同時に原点散乱強度 $I(0)$ も得られ、 $I(0)$ は $N(\Delta\rho V)^2$ に比例することが知られている。 N は溶質の数濃度、 V は分子体積であり、 $\Delta\rho$ は溶質と溶媒の間の散乱密度 (電子密度) の差 (コントラストと呼ばれる) である。すなわち、コントラストの変化は $I(q)$ に寄与する。

本研究では、実験的に得られた散乱曲線と理論散乱関数の比較を行った。理論散乱関数のシミュレーションには Svergun らが開発したソフトウェアである CRY SOL を用いた¹⁷⁾。CRY SOL は高次の球面調和関数展開¹⁸⁾を用いて、タンパク質結晶構造の原子座標から溶液中での理論散乱関数を計算する。このプログラムは、第一層の水和殻 (厚さ 3 Å) を考慮することで、実測した散乱曲線をよく説明することが知られている¹⁹⁾。牛ミオグロビンの原子座標には、タンパク質結晶構造データベース (PDB) に登録されている構造 (PDB ID: 1Z2S) を用いた。CRY SOL は理論計算を行う際、水と殻の散乱密度を任意に指定することができる。したがって、タンパク質溶液に添加した共存物質の散乱密度が分かっているならば、溶媒と殻内における共存分子の濃縮や排除による散乱曲線への寄与を定性的に解析可能となる。

3 結果と考察

3・1 中性条件におけるトレハロースの効果

Fig. 1 に pH 7.0 における牛ミオグロビンの広角 X 線散乱 (WAXS) 曲線のトレハロース濃度依存性を示す。得られる散乱曲線は、トレハロースの添加によるコントラストの変化、タンパク質構造の変化、及び水と殻コントラストの変化が反映される。Fig. 2 に示す Guinier プロットを見ると、直線性が非常に良く、トレハロースの添加に伴う凝集形成や粒子間相互作用の変化は見受けられない。そのため、Fig. 1 に示した散乱曲線を結晶構造に基づく理論散乱関数

Fig. 2 Guinier plots of WAXS curves in Fig. 1

The symbols correspond to the experimental data. The solid lines represent the least-square fitting (q^2 vs. $I(q)$) using the so-called Guinier region ($q < \sim 0.07 \text{ \AA}^{-1}$).

とフィッティングすることで、タンパク質の溶液構造が結晶構造からどの程度ずれているか評価することができる。

Fig. 3 に CRYSOLE を用いてフィットした理論散乱関数と実験データを示す。挿入図には結晶構造からのずれを表す χ^2 値を示す。フィッティングは $0.041 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ の範囲で行った。Fig. 3 を見ると、トレハロース濃度 10 % w/w 以下では χ^2 値が大きく、ミオグロビンの溶液構造が結晶構造からずれた若干緩んだ構造をとることを示唆する。15 % w/w 以降は χ^2 値が大きく減少し、特に 25 % w/w 以降は溶液構造が結晶構造と極めてよく一致した。本結果は、トレハロースが緩んだタンパク質構造をコンパクションし、結晶構造へ近づけたことを示唆している。

オスモライトによるタンパク質の安定作用は、タンパク質の表面張力及び自由エネルギーの変化に起因すると考えられている^{5)~7)}。特に、タンパク質の水和構造の変化は、その安定性に大きく寄与すると予測される。すでに密度測定等により、糖やポリオールがタンパク質表面から排除され、選択的水和 (preferential hydration) を促進することが示唆されている²⁰⁾。溶液散乱ではタンパク質の溶媒和殻を含めた構造が観測される。したがって糖分子の選択的排除が生じた場合、糖を含むバルク溶媒の散乱密度の平均散乱密度と、溶媒和殻、タンパク質自身の平均散乱密度の差の変化が散乱へ寄与する。この寄与を見積もるため、CRYSOLE を用いて三つの溶媒和 (水和) モデルに基づく理論散乱関数を計算し、実験データとの比較を行った。計算にはタンパク質と溶媒の X 線散乱密度が必要となる。牛ミオグロビンの結晶構造から得られる散乱密度は 11.96 cm^{-2} であった。溶媒の散乱密度は、トレハロース溶液の密度測定からトレハロース分子の排除体積を求めた結果、下記の式で与えられることがわかった。

Fig. 3 Theoretical scattering curve fitting the experimental WAXS curves in Fig. 1 using the CRYSOLE program

The solid lines and the marks correspond to the optimized theoretical curves and the experimental data, respectively. The inset shows the χ^2 values of the fitting.

$$\rho_{\text{solv}} / \text{cm}^{-2} = 9.3651 + 0.0361c \quad (3)$$

c はトレハロースの重量% 濃度であり、散乱密度と濃度が比例関係にあることを表す。溶媒和殻の散乱密度はモデルによって計算方法が異なり、トレハロースの濃縮が生じるとする優先的溶媒和 (preferential solvation) モデルは次式で表す。

$$\rho_{\text{shell}} = \rho_{\text{solv}} \alpha \quad (4)$$

α は溶媒和殻散乱密度の倍率であり、 $\alpha > 1$ とすることでトレハロースの溶媒和殻における濃縮を表す。溶媒和殻のトレハロース濃度が溶媒と同等となる、若しくは一定の割合でトレハロース分子が排除される場合の非選択的溶媒和 (neutral solvation) モデルは、次式で表される。

$$\rho_{\text{shell}} = \rho_{\text{solv}} \beta + \rho_{\text{water}} (1 - \beta) \quad (5)$$

ρ_{water} は純水から成る水和殻の散乱密度であり、一般にタンパク質の水和殻の散乱密度はバルク水に比べて 1.1 倍程度となることが先行研究で明らかとされている¹⁹⁾。 β は水和殻における水と糖の交換比率であり、 $\beta = 1$ であれば水和殻の散乱密度がバルク溶媒 (水と糖の混合溶媒) と等しく

Fig. 4 Simulated WAXS curves depending on the average scattering density of the solvent

The variable range of the solvent average scattering density corresponds to the trehalose concentration from 0 % w/w to 30 % w/w. The simulation using the CRY SOL program was done based on three different models. Figs. (A), (B), and (C) depict the preferential solvation model ($\alpha = 1.1$), the neutral solvation model ($\beta = 0.5$), and the preferential exclusion model, respectively.

なり, $0 < \beta < 1$ であれば β の割合でトレハロース溶媒が水和殻へ浸透することを表す. $\beta = 0$ は, トレハロース分子がタンパク質水和殻から完全に排除される, すなわち選択的排除 (preferential exclusion) モデルに対応する.

Fig. 4 に, 上記の三つのモデルに基づく理論散乱関数を示す. (A) は $\alpha = 1.1$ の選択的溶媒和モデル, (B) は $\beta = 0.5$ の非選択的溶媒和モデル, (C) は $\beta = 0$ の選択的排除モデルに基づいたものである. 図を見ると, モデルの差異による理論散乱関数への寄与は $q < \sim 0.4 \text{ \AA}^{-1}$ の領域で顕著に現れることが分かる. 特に, 高濃度のトレハロース溶液で現れる $q = \sim 0.23 \text{ \AA}^{-1}$ の落ち込みは, 選択的排除モデルでは顕著であるが, 選択的溶媒和モデルでは目立たない. また, $q < \sim 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ の小角領域を見ると, 選択的排除モデルでは溶媒の散乱密度の増加に伴う散乱強度の減少が顕著で, 曲線が緩やかなものに变化している. 曲線の形状と散乱強度の変化は, それぞれ回転半径 (R_g) 及び原点散乱強度 ($I(0)$) に大きく影響する. この寄与を見積もるため, $\sim 0.041 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.07 \text{ \AA}^{-1}$ の Guinier プロットから R_g と

Fig. 5 Comparison of experimental and theoretical values of radius of gyration, R_g

The symbols correspond to the experimental R_g values. The dash, solid, and bold lines correspond to the preferential solvation model, the neutral solvation model, and the preferential exclusion model, respectively. The theoretical values were normalized.

$(I(0))^{1/2}$ の実験値を計算し, 理論値と比較した.

Fig. 5 に R_g のトレハロース濃度依存性を示す. 理論値は純水中の $\beta = 0$ の値で規格化しており, 相対的な変化を表す. トレハロース非存在下では実験値が理論値から大きく乖離しており, Fig. 2 と同様に牛ミオグロビンの溶液構造が結晶構造に比べて広がった構造をとることを示唆する. χ^2 値が大きい 0 ~ 10 % w/w については, 溶液構造が結晶構造と異なっていると考えられるため, 理論値との比較は不適当である. 15 % w/w より高濃度の実験値は, 25 % w/w を除いて $\beta = \sim 0.7$ の非選択的溶媒和モデルに従った. すなわち, タンパク質表面におけるトレハロースの濃縮は生じず, トレハロース分子の 3 割程度が溶媒和殻から排除されたことを示す. Fig. 6 には $(I(0))^{1/2}$ のトレハロース濃度依存性を示す. 実験から得られる散乱強度は相対値であるので, 実験値と理論値を規格化したものを比較する. 15 % w/w 以降の実験値は $\sim 0.2 < \beta < \sim 0.4$ の非選択的溶媒和モデルに従い, トレハロース分子が 6 ~ 8 割程度排除されたことを示唆する. この R_g 及び $I(0)$ の解析により, トレハロースは牛ミオグロビンの溶媒和殻から排除される傾向をもつことが示された.

以上の中性条件 (pH 7.0) における牛ミオグロビン WAXS 測定結果の解析から, トレハロースのもつタンパク質表面からの排除傾向により, 牛ミオグロビンの弛緩した溶液構造が結晶構造に近づくことが示唆された. 本結果は, トレハロースによるタンパク質安定化作用を検討した先行研究と符合するものである²²⁾.

Fig. 6 Comparison of experimental and theoretical values of square-root of zero-angle scattering intensity, $I(0)^{1/2}$

The symbols correspond to the experimental $I(0)^{1/2}$ values. The dash, solid, and bold lines are as in Fig. 5. Both experimental and theoretical values were normalized.

3.2 タンパク質の酸変性とトレハロースの効果

前節では pH 7.0 とタンパク質が安定な溶媒条件でのトレハロースの効果について検討したが、本節では酸性溶媒中でタンパク質を不安定化した条件におけるトレハロースの効果を検討する。まず、Fig. 7 に牛ミオグロビン WAXS 曲線の pH 依存性を示す。pH が低くなるのに従い、 $q < \sim 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ の小角領域が持ち上がり曲線が直線化した。これはタンパク質の酸変性に伴う凝集体形成に由来するもので、pH 3.5 及び 3.0 では特に明確である。pH 4.0 でも若干の変化が見られたが、これは部分的な構造変化に伴う多量体形成によるものと考えられる。 $\sim 0.2 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.25 \text{ \AA}^{-1}$ のタンパク質内部構造を反映する高角領域を見ると、pH 3.5 及び 3.0 ではタンパク質の天然状態の内部構造を反映する散乱曲線の変動が消失しており、単分子レベルでの変性を示している。以上の結果より、牛ミオグロビンは pH 4.0 以下で変性し、pH 3.5 及び 3.0 では明確な凝集体を生じることが明らかとなった。

次に、それぞれのミオグロビン溶媒にトレハロースを添加した WAXS 曲線を Fig. 8 に示す。pH 4.0 (Fig. 8D) を見ると、トレハロース濃度に依存して小角領域の曲線が丸くなり、高角領域の変動が回復してくることが分かる。これは、トレハロースの添加によって多量体が解離し、単量体もコンパクトな天然構造へとフォールドしたことを示唆する。pH 3.5 (Fig. 8E) ではより明白な散乱曲線の変化が見られ、トレハロース濃度に依存して、天然構造由来の小角領域の曲線が復元された。トレハロース 30 % w/w では、トレハロース非存在下では完全に消失していた高角領域の変動が回復され、天然構造に類似したミオグロビン単量体が復元されたことを示す。一方で pH 3.0 (Fig. 8F) を見る

Fig. 7 Variation of WAXS curves of bovine myoglobin depending on pH from 7.0 to 3.0 in the solvents without trehalose

Fig. 8 Restorative effect of trehalose on myoglobin aggregation observed by WAXS

(A), pH 7.0; (B), pH 6.0; (C), pH 5.0; (D), pH 4.0; (E), pH 3.5; (F), pH 3.0.

と、トレハロースを添加しても小角領域の曲線は復元されず、凝集体の解離は観察されない。

Fig. 9 には各 pH における R_g のトレハロース濃度依存性を示す。pH 4.0 及び 3.5 では糖濃度に依存した R_g の減少

Fig. 9 Change in the radius of gyration R_g of myoglobin depending on trehalose concentration (% w/w)

Circle, pH 3.0; square, pH 3.5; diamond, pH 4.0; triangle, pH 5.0; triangle-down, pH 6.0; cross, pH 7.0. The R_g values were restored by the addition of trehalose at pH 3.5 and 4.0.

が見られ、特に pH 3.5 では大幅に減少した。一方で、pH 3.0 では R_g の減少が見られず、散乱曲線で観測されたものと同様に凝集の解離が生じていないことを示す。pH 5.0 及び 6.0 ではわずかな変化が見られるが、これは前節で議論した溶媒和殻の変化を反映したものと考えられる。以上の WAXS 曲線と R_g の解析結果から、トレハロースによる凝集解離作用は比較的弱い分子間相互作用による凝集体のみで発揮されることが考えられる。

4 結 言

本報告では、トレハロースによる牛ミオグロビンの水和（溶媒和）に対する効果及び酸変性により生じた凝集体の解離作用について議論した。中性溶媒中で得られた散乱データの解析により、トレハロースの添加によってミオグロビンの溶液構造が結晶構造に近づくことが明らかとなり、この現象がタンパク質の選択的水和（タンパク質表面からのトレハロースの選択的排除）に起因することが示唆された。本結果は、すでに著者らが報告した馬ミオグロビンに対するグリセロール及びトレハロースの効果と符合するものであった²¹⁾²²⁾。また、酸変性条件の解析により、pH 3.5 及び pH 4.0 で生じた凝集体がトレハロースの濃度に依存して解離し、ミオグロビンの天然構造が回復することが見いだされた。pH 3.0 では同様の効果は見られず、比較的温和な変性条件で回復作用が生じることが示唆された。

本研究で観察されたトレハロースによる凝集体の解離作用は、特に注目すべき点である。糖やポリオールによって凝集体形成が抑制されることは明らかとなっているが²³⁾、一度生成した凝集体を解離させたとの報告は著者らが調べ

た限りない。また、可溶化剤が凝集体形成を阻害することも知られているが²⁴⁾、この作用は可溶化剤とタンパク質との選択的相互作用によって説明されており、高濃度ではタンパク質のアンフォールドを引き起こす。したがって、今回見られたトレハロースによる解離作用と可溶化剤による作用は全く異なる機構によるものと考えられ、今後さらなる検討が必要である。

タンパク質凝集体の解離や凝集阻害といった作用は、凝集体に関する疾病の予防や治療という観点からも研究されており、本研究で用いたミオグロビンは、変性条件下でアミロイド凝集を形成することが知られている²⁵⁾。アミロイド線維凝集が原因と考えられている疾病として、アルツハイマー病やプリオン病が知られており、アミロイド疾患と呼ばれている。高濃度の dimethyl sulfoxide (DMSO) がインスリン原線維を分解することが明らかとされたが²⁶⁾、DMSO は細胞毒性をもつため、人体への投与は重篤な副作用を引き起こす可能性が高い。先に述べた変性剤や界面活性剤も細胞毒性をもつため、医薬品への応用は困難であると考えられる。その一方で、トレハロースは毒性の報告もなく、非還元糖であるため還元糖と異なりタンパク質への糖化反応を起こさない。本結果は、タンパク質凝集体の解離に対してトレハロースが有効であることを示唆するが、生体内のトレハロース濃度を実験と同様の高濃度に維持することは非現実的である。また、この凝集体解離作用がトレハロースに固有なものなのか、ほかの糖にも見られる普遍的な現象なのか定かではなく、凝集体の性質や溶媒条件にどの程度依存するかも明らかではない。いずれにしても、多くの検討が必要であらう。

最後に、本研究で行ったタンパク質溶媒和の解析について方法論的観点から述べる。著者らは溶液散乱法を用い、糖やグリセロール、合成高分子によるタンパク質溶媒和殻への作用を検討してきた²¹⁾²²⁾²⁷⁾。この手法は、共存分子とタンパク質との間の水和を介した相互作用を明らかとする上で有意な情報を与える。これらの研究が進展することで、細胞内におけるタンパク質と共存分子との複雑な相互作用 (crowding effect) の解明の一助になると考えられる。

謝 辞

本研究における X 線散乱測定は、PF 共同利用実験課題 (No. 2017G698) 及び SPring-8 共同利用実験課題 (No. 2017A1435) にて行われました。PF での測定には高エネルギー加速器研究機構の清水伸隆先生及び五十嵐教之先生にご指導を頂きました。SPring-8 での測定では高輝度光科学センターの太田昇先生にご指導を頂きました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) P. H. Yancey : *J. Exp. Biol.*, **208**, 2819 (2005).
- 2) N. K. Jain, I. Roy : *Protein Sci.*, **18**, 24 (2009).
- 3) S. Ohtake, Y. J. Wang : *J. Pharm. Sci.*, **100**, 2020 (2011).
- 4) R. S. Kane, P. Deschatelets, G. M. Whitesides : *Langmuir*, **19**, 2388 (2003).
- 5) K. Gekko, S. Timasheff : *Biochemistry*, **20**, 4667 (1981).
- 6) T. Arakawa, S. Timasheff : *Biochemistry*, **21**, 6545 (1982).
- 7) J. Rosgen, B. M. Pettitt, D. W. Bolen : *Protein Sci.*, **16**, 733 (2007).
- 8) J. S. Clegg : *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, **128**, 613 (2001).
- 9) M. S. Clark, M. R. Worland : *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, **178**, 917 (2008).
- 10) M. A. Singer, S. Lindquist : *Trends Biotechnol.*, **16**, 460 (1998).
- 11) M. Kacurakova, M. Mathlouthi : *Carbohydr. Res.*, **284**, 145 (1996).
- 12) M. Sola-Penna, J. R. Meyer-Fernandes : *Arch. Biochem. Biophys.*, **360**, 10 (1998).
- 13) K. Shiraga, A. Adachi, M. Nakamura, T. Tajima, K. Ajito, Y. Ogawa : *J. Chem. Phys.*, **146**, 105102 (2017).
- 14) Z. Ignatova, L. M. Gierasch : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 13357 (2006).
- 15) H. Hamada, T. Arakawa, K. Shiraki : *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **10**, 400 (2009).
- 16) M. Hirai, H. Iwase, T. Hayakawa, K. Miura, K. Inoue : *J. Synchrot. Radiat.*, **9**, 202 (2002).
- 17) D. Svergun, C. Barberato, M. H. J. Koch : *J. Appl. Crystallogr.*, **28**, 768 (1995).
- 18) H. B. Stuhmann : *Acta Cryst. A*, **26**, 297 (1970).
- 19) D. I. Svergun, S. Richard, M. H. J. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, G. Zaccai : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 2267 (1998).
- 20) 月向邦彦 : 蛋白質・核酸・酵素 (*Protein, nucleic acid and enzyme*), **30**, 1115 (1985).
- 21) M. Hirai, S. Ajito, M. Sugiyama, H. Iwase, S. Takata, N. Shimizu, N. Igarashi, A. Martel, L. Porcar : *Biophys. J.*, **115**, 313 (2018).
- 22) S. Ajito, M. Hirai, H. Iwase, N. Shimizu, N. Igarashi, N. Ohta : *Physica B*, **2018**, doi.org/10.1016/j.physb.2018.03.040.
- 23) M. Abe, Y. Abe, T. Ohkuri, T. Mishima, A. Monji, S. Kanba, T. Ueda : *Protein Sci.*, **22**, 467 (2013).
- 24) G. Orsini, M. E. Goldberg : *J. Biol. Chem.*, **253**, 3453 (1978).
- 25) M. Fändrich, M. A. Fletcher, C. M. Doson : *Nature*, **410**, 165 (2001).
- 26) G. Zhang, V. Babenko, W. Dzwolak, T. A. Keiderling : *Biochemistry*, **54**, 7193 (2015).
- 27) M. Hirai, S. Ajito, M. Sugiyama, H. Iwase, S. Takata, N. Shimizu, N. Igarashi, A. Martel, L. Porcar : *Physica B*, **2018**, doi.org/10.1016/j.physb.2018.02.020.

Recovery Effects of Trehalose on Acid Denaturation/ Aggregation of Proteins

Satoshi AJITO¹ and Mitsuhiro HIRAI^{*1}

^{*} E-mail : mhirai@gunma-u.ac.jp

¹ Graduate School of Science and Technology, Gunma University, 4-2, Aramaki, Maebashi-shi, Gunma 371-8510

(Received July 31, 2018; Accepted August 29, 2018)

Osmolytes, including sugars and polyols, are well known to suppress denaturation and aggregation of proteins and prevent deactivation of enzymes. Trehalose, a nonreducing disaccharide, is thought to have an excellent stabilizing action. Trehalose is produced by organisms with tolerance to extreme environments. By using synchrotron radiation X-ray wide-angle scattering (WAXS), we have found that trehalose dissociates aggregates of bovine myoglobin denatured by acidic solvents, and then folds it into a native structure. Denaturants and surfactants have been used as additives that dissociate aggregates; however, most of them are cytotoxic. Therefore, this report would suggest that trehalose is a promising candidate as a protein aggregation dissociator that is harmless to the human body. In addition, this study shows the usefulness of the wide-angle scattering method for protein structure analysis in the presence of co-solute.

Keywords: protein; refolding; denaturation; trehalose; X-ray scattering.