人工シャペロンをめざした機能性マイクロスフェアの開発 —界面でのペプチド鎖の秩序化—

藤本啓二・清水秀信

慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻生命理工学専修 ☎223-8522 横浜市港北区日吉3-14-1

1. はじめに

現在、遺伝子工学的手法によって望み通りのアミノ酸配列を作り出すことが可能となり、発現させたタンパク質を薬などに利用する試みが盛んに行われている。しかし、こうして得られたタンパク質の鎖は期待される機能を示さないことが多い。これは、タンパク質の鎖が機能を発現するにおいて、天然の立体構造に正しく折れ畳まれてアミノ酸残基が特定の空間配置をとることが必要であることに起因する¹⁾。細胞内において作られたタンパク質は間違った、あるいは不十分な折り畳み状態となり、不溶性の塊（インクルージョン・ボディ）を形成してしまうことが多い。そのため、変性剤や界面活性剤を用いて、タンパク質の凝集塊を解きほぐしてから透析することによって再生されている²⁾。一方、生体システムに目を向けたとき、分子シャペロンというものによってタンパク質は機能発現可能な立体構造へと巻き戻ることが明らかとなっている³⁾。天然の立体構造と若干構造の崩れた中間状態との変換は可逆的であり、熱などの影響により後者の確率が増加しても、元に巻き戻す（リフォールディング）ことは可能である。しかし、中間状態のタンパク質が凝集する過程は不可逆で、そこに落ち込むと再生不能になってしまう。分子シャペロンはこの中間状態と結合して凝集へと向かう過程を阻害し、かつ天然の立体構造状態へ戻すという働きを示す。われわれは、この分子シャペロンのようにタンパク質の立体構造形成を触媒する材料の開発を行った⁴⁾。

Fig. 1 Design of a device for protein refolding

2. 粒子表・のデザイン

Fig. 1にこのシステムの概念図を示す。これは、変性タンパク質のみを選択的に粒子に吸着させて、粒子表面上で巻き戻り反応を進行させて、活性を取り戻したタンパク質を溶液中に蓄積させようというものである。まず、凝集状態あるいは変性状態にあるタンパク質を解きほぐし、一分子の状態で分散して吸着させる。そのためには材料側が広い表面積を有する必要がある。粒子のサイズを小さくしていくと、少量で広大な表面積を提供することができるようになる。しかし、この表面がタンパク質との間で強い相互作用を起こってしまうと、不可逆的な吸着を引き起してしまう。そこでタンパク質の非特異的吸着性の極めて低いことがわかっている、コアシェル粒子を担体粒子として選んだ⁵⁾。これは、ポリスチレンのコアとエ

Fig. 2 Adsorption of scrambled RNase A on microspheres as a function of time.

▲, SG; ○, DTT02; □, DTT05; ●, DTT10; ■, DTT20.

Modified microspheres were referred to as DTTX, where X represents the mole ratio of charged DTT to epoxy groups of SG microspheres.

ポキシ基に富むシェル層をもつ直径約 250 nm の粒子である。次に、この粒子が変性タンパク質のみを選択的に認識するように改質することが必要となる。S-S 結合を持つタンパク質は変性に伴って表面に S-S 結合を露出されることが多い。この場合、粒子表面に SH 部位を導入することにより変性タンパク質を吸着させることができる。また、還元タンパク質では S-S 部は開裂されて SH になっている。従って、粒子に S-S 結合を導入することにより完全還元タンパク質を吸着させることができる。これらのことから、粒子のエポキシ基にジチオトレイトール (DTT) を反応させることにより、粒子表面への SH 部位および S-S 結合部位の導入を行った。

3. ミスフォールディングしたタンパク質の選択的吸着と再生

まず、変性面 (S-S 結合部) を露出したタンパク質のモデルとして、S-S 結合の掛け違いをランダムに起こさせた RibonucleaseA (Scrambled RNaseA) を選び、改質粒子を用いて天然構造へと変換させることを試みた⁶⁾。タンパク質と改質

粒子を混合して所定時間反応させた後、遠心分離により上清のタンパク質溶液を回収し、その濃度を定量することにより粒子への吸着量を算出した。Fig. 2 に示すように Scrambled RNaseA では吸着が認められるのに対し、Native RNaseA では非常に微量となった。前者の吸着は高イオン強度の溶液で洗浄しても溶離してこないほど強固なものであり、タンパク質と表面との間で S-S 結合を介して化学吸着している可能性が高い。つまり、粒子は変性タンパク質を選択的に化学吸着させたことになる。次に、Scrambled RNaseA 溶液に粒子を添加して 30 °C で所定時間反応させた後、上清中に再生された Native RNaseA の酵素活性を測定してリフォールディング活性を評価した。チオール基を導入した粒子は明らかにリフォールディング反応を促進していることがわかった。一方、系中に何も加えない場合は全くリフォールディングが起らなかった。また、チオール基を導入していない粒子でもほとんどリフォールディングは起らなかった。また、この粒子は繰り返し使用することが可能であった。粒子の改質の際に、仕込み DTT 量を増やしていくとチオール導入量は一度増加した後に減少し、再び増加した。また、元素分析の結果からは硫黄は単調に導入されていることがわかった。従って、仕込み DTT 量が多くなると S-S 結合が形成されてくるようになると思われる。リフォールディング活性が最大となるのは DTT を 10 等量加えた辺りであった。タンパク質の S-S 結合形成反応は巻き戻り反応液中の酸化還元状態によって規定されることが知られている。つまり、粒子表面の環境をそれぞれの巻き戻り反応に適合した酸化還元状態にすることが重要であると思われる。この系では、最初に粒子表面の SH 基が変性タンパク質の露出している S-S 結合を攻撃することにより、粒子上においてチオールとジスルフィドとの交換反応が生起されることが考えられる。それから立体構造の崩れたタンパク質分子中の SH 基と S-S 結合との間でも交換反応が起こるようになるのだろう。これらの結果として、あたかも天然状態を探し続けるようにフォールディングが進行

Fig. 4 Explanation of the microsphere-assisted protein renaturation.

Fig. 3 Time course of active RNase A formation when fully reduced RNase A was incubated with (○) DTT10 (1 h), (●) DTT10 (3 h), (△) DTT10 (10 h), (▲) DTT10 (24 h), (■) DTT30 (24 h), (▽) unmodified (SG) microspheres, and (□) no microspheres. Microsphere concentration was 20 mg/mL.

していくのではないかと考えている。さらにこの系では、一度再生されたタンパク質は粒子と相互作用しないため、系外に排出される。そして常に変性タンパク質が粒子と相互作用するようになる。おそらく、変性タンパク質の吸着と巻き戻ったタンパク質の系外への脱着が不可逆であることが、リフォールディングのサイクルを動かしていると考えられる。

4. 完全還元タンパク質の選択的吸着と再生

次に、完全還元タンパク質のモデルとしてS-S結合を開裂させてランダムコイル様の1本鎖としたRibonucleaseA (Reduced RNaseA) を作製し、改質粒子を用いてそれぞれ活性を有する秩序構造へと変換させることを試みた⁷⁾。作製したいずれの粒子においても、Native RNaseA に比べてReduced RNaseA の吸着は高いものとなった。Fig. 3に活性回復率の時間変化を示した。縦軸の再生率は、未変性のRNaseAの酵素活性を100%としたときのそれぞれの相対活性を表している。DTT30 (24hr) と表した粒子を添加した系においてのみ、粒子を加えない系に比べて巻き戻りが抑制されるという結果が得られた。この粒子は、他の4つの粒子に比べてチオール基量およびDTT導入量が極端に多い。従って、過剰なチオール基の存在がタンパク質のS-S結合形成反応(酸化反応)を阻害してしまうためにこのような結果になったと推測できる。一方、それ以外の4つの粒子は、粒子非存在下の自発的酸化の系に比べて明らかに巻き戻り反応を促進している。さらに、これら4つの粒子間の比較を行うと、最終的な収率はいずれの粒子においても75%程度とほぼ同じ値を示したが、初期の巻き戻り反応速度には違いが認められた。反応速度はチオール基導入量の少ないものほど、また吸着量が多いものほど速いという傾向であった。完全還元RNaseAの

残存SH基量の時間変化を測定したところ、巻き戻り反応を促進させる粒子はいずれも、粒子非存在下の自発的酸化の系に比べてSH基の減少が速やかに起こった。このことは、粒子の存在が完全還元RNaseAのS-S結合形成反応を速めていることを意味している。以上のことからこの系では次のようなことが起こっていると考えている (Fig. 4)。まず、完全還元RNaseAのSH基と粒子表面のS-S結合が反応して混合ジスルフィドが形成される。粒子とS-Sを介して結合したタンパク質は、分子内の遊離のチオール基との間でS-S結合を形成する。その後、混合ジスルフィドの形成および切断という過程が繰り返され、S-S結合形成反応が段階的に進行する。このとき、たとえ間違ったS-S結合が形成されても、粒子表面のチオール基がそれを還元するので、結果としてタンパク質はアミノ酸配列により決まる熱力学的に安定な状態 (天然状態) に向かうことになる。立体構造を回復したタンパク質のSH基やS-S結合は内部に埋没することが多い。従って、その場合には粒子との相互作用は極めて弱いものとなる。結果として溶液中に活性型の天然タンパク質が蓄積してくることになる。本システムでは、巻き戻り反応は主に粒子表面で誘起される。そのため、環境を決定する粒子表面の状態が重要

となる。現在、より効率的で広範におよぶ巻き戻り反応を生起させるために、粒子表面のミクロな環境の精細な制御を試みている。特に凝集しやすいタンパク質への応用に向けての検討を行っている⁸⁾。

謝辞

本研究の一部は武田科学振興財団の助成を受けて行われた。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) C.B.Anfinsen and E.Haber, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1353 (1961).
- 2) M-J.Gething and J.Sambrook, *Nature*, **355**, 33 (1992).
- 3) G.Zardeneta and P.M.Horowitz, *Anal. Biochem.*, **223**, 1 (1994).
- 4) 清水秀信ら, 第45回高分子学会年次大会要旨集, p.547 (1996).
- 5) Y.Inomata, et al., *Anal. Biochem.* **206**, 109 (1992).
- 6) Shimizu,H., Fujimoto,K., and Kawaguchi,H., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **153**, 421-427 (1999).
- 7) Shimizu,H., Fujimoto,K., Kawaguchi,H., *Biotechnology Progress*, **16**, 248-253 (2000).
- 8) Shimizu,H., Fujimoto,K., Kawaguchi,H., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **18**, 137-144 (2000)