

タンパク質の失活や凝集を抑制する小分子添加剤

白木賢太郎

1. はじめに

タンパク質は熱に弱く、常温で保存するとしばしば失活し凝集する。また、封入体からタンパク質をリフォールディングさせると凝集を生じ易く、活性のあるタンパク質を得るのが難しい。つまり、取り扱いが難しいというだけで研究を始めることができないタンパク質も多いのが現状である。しかし、タンパク質溶液に一滴垂らすだけで、常温でも保存でき、濃縮や透析をしても凝集の心配がなく、リフォールディングに伴う凝集も抑制できる夢のような試薬があれば、タンパク質研究の可能性も広がる。

本記事では、タンパク質凝集を抑制する小分子添加剤をいくつか紹介する。これらの小分子をタンパク質溶液に少量加えておくと、失活や凝集の抑制に効果が見られる例もあるので、読者のタンパク質研究の参考になれば幸いである。

2. 小分子の添加によるタンパク質の熱失活や凝集の抑制

古くから用いられている小分子添加剤は、タンパク質を変性させる尿素や塩酸グアニジン、界面活性剤である¹⁾。タンパク質を変性させない濃度（例えば 1 M 程度）の変性剤を添加すると凝集が抑制できる場合がある。

最近ではアルギニンを用いた論文をよく見かける。封入体からタンパク質をリフォールディングさせると非常に凝集しやすいが、そこに 0.5-1.0 M 程度のアルギニンを添加しておくと凝集を抑制して収率が増加する^{2),3)}。変性剤とは異なり、アルギニンはタンパク質を不安定化させずにリフォールディング収率だけを上げる優れた添加剤である³⁾⁻⁵⁾。その他、本稿で紹介する小分子添加剤の一部を **Fig.1** に示す。

2.1 アルギニンの凝集抑制効果

凝集抑制剤としてL-アルギニン (**Fig.1a**) だけが用いられているが (凝集抑制剤としての最先の論文と特許出願も L-アルギニンだけであった^{1), 6)}, D-アルギニンには効果が無いのか? アルギニンはアミノ酸の中で最良なのか? この疑問に答えるため, リゾチームの加熱凝集を指標にしてアミノ酸の効果を網羅的に調べた報告がある⁷⁾. 0.2 mg/ml リゾチームに 0.2 M のアミノ酸を添加して pH 6.5 で 30 分間加熱した後, 上清に残ったタンパク質の量を比較したところ, アミノ酸の中で最も効果が高いのはやはりアルギニンであった. 興味深いことに, 疎水性側鎖を持つアミノ酸よりむしろ, 極性側鎖を持つアミノ酸の方が凝集抑制に効果がみられた. また D-アルギニンも L-アルギニンと同様に凝集を抑制した⁷⁾.

アルギニンは凝集抑制に効果的であるが, 高濃度 (0.5-1.0 M) を必要とするので工業的なスケールアップには向かないのが欠点である.

2.2 新しい添加剤: ポリアミン

ポリアミンと総称されるプトレッシン (**Fig.1f**) とスペルミジン (**Fig.1g**), スペルミン (**Fig.1h**) は, 全ての生物が細胞内に持つ小分子で, 細胞分化や増殖の因子にもなる重要な物質である. ポリアミンはアルギニンよりも凝集抑制能が高いことが報告されている^{8), 9)}. 1.0 mg/ml リゾチームを 98°C で加熱した時の失活の経時変化を **Fig.2** に示す. 添加剤無しでは約 20 分で残存活性が 1% にまで低下した. アルギニンを 100mM 添加すると失活の抑制効果が少し見られる程度だが, スペルミジンを同濃度添加すると 30 分の加熱でも 50% も活性が残った. 失活速度で比較するとアルギニン添加時より一桁以上も遅い. 98°C で 30 分間加熱すると, アルギニンを添加したサンプルには白濁凝集が見られたが, ポリアミンを添加したサンプルには見られなかった.

ポリアミンは, 熱変性したリゾチームの凝集を完全に抑制し, しかも熱による不可逆な変性もかなり抑制する⁹⁾. 一方アルギニンは, 100 mM 程度添加しても, 失活にも凝集にもあまり効果がない. つまりポリアミンは, 50-100 mM といった低濃度で高い凝集抑制の効果が見られるので, カラムクロマトグラフィや分光学的な測定に供することも可能である. アルギニンと比べて一桁低い濃度でも効果があることは, 現実的な面で大きな利点になる.

また, 好熱菌は特殊な長鎖ポリアミンを菌体内に蓄積していることにも触れておきたい¹⁰⁾. ポリアミンの役割はまだ明らかにされていないが, 高温環境に適応する戦略として, 菌体内にポリアミンを蓄積して, 熱によるタンパク質

凝集を抑制しているのかもしれない。

2.3 新しい添加剤：アミノ酸アルキルエステル

アミノ酸アルキルエステルも、アルギニンと比べて低濃度で効果が高い凝集抑制剤である。アミノ酸アルキルエステルはカルボキシル末端がメチル化やエチル化されたもので、アミノ基の pK_a はアミノ酸よりも 2pH 単位、酸性にシフトしている。側鎖にもよるが、pH 7.5 以下ではアミノ末端が正電荷を帯び、アミノ酸よりは分子内極性が高い。

アルギニン (**Fig.1a**) を添加した場合と、同濃度のアルギニンエチルエステル (**Fig.1b**) を添加した場合の加熱失活の曲線を求めた (**Fig.3A**)。98°C で 1.0 mg/ml リゾチームを加熱すると、100 mM アルギニンを添加しても 20 分ではほぼ完全に失活したが、同濃度のアルギニンエチルエステルを添加しておくとも 20 分後でも 80% の活性が保たれた^{8),11)}。この失活速度は加水分解などの化学修飾に伴う失活の速度に等しいほどに極めて遅い。しかも 100 mM 程度の低濃度でも、失活や凝集を高度に抑制する。98°C で 40 分間加熱すると、100 mM アルギニンを添加していても 40% は凝集するが、同濃度のアルギニンエチルエステルを添加しておくとも全く凝集しなかった (**Fig.3B**)。

3. 小分子添加剤による凝集抑制の機構

ここで、添加剤による凝集抑制の原理についても簡単に紹介したいのだが、応用面だけが先行しており、分子機構モデルはまだ解説できる状態ではない。2003 年になって、アルギニンはタンパク質の安定性やフォールディングには影響を与えないことが報告されたに留まっている¹²⁾。アルギニンの持つグアニジウム基の存在がタンパク質の溶解度を上げるといった予想できるが、リゾチームの加熱凝集への抑制効果はアルギニンエチルエステルとニトロアルギニンエチルエステルとを比べても同じなので、アルギニンの持つグアニジウム基に特別の効果があるとは考えにくい⁸⁾。

ポリアミンの場合、タンパク質表面に結合して見かけのネットチャージをプラスに増加させ、タンパク質間の衝突を抑制するのかもしれない⁹⁾。タンパク質工学的な研究によると、タンパク質のネットチャージと凝集速度は関係がみられるので¹³⁾、小分子がタンパク質表面に結合してタンパク質間の静電的反発を生じさせて分子間衝突を抑制するといった説明には納得がいく。アミノ酸ア

ルキルエステルの作用機構はまだ分かっていないが、修飾された非極性カルボニル末端がうまくタンパク質と疎水性相互作用し、アミド末端の静電的反発をタンパク質表面に生じさせて分子間会合を抑制するのかもしれない。

4. さまざまな小分子添加剤

その他の添加剤を簡単に紹介する。小分子添加剤は、機能によって次の4つに分類できる。

- (1) 酸化還元を触媒する小分子
- (2) タンパク質の溶解度を上げる小分子
- (3) フォールディング速度を上げる小分子
- (4) タンパク質を隔離し衝突の頻度を下げる小分子

4.1 酸化還元を触媒する小分子

生体内では Dsb タンパク質などが酸化還元を触媒してタンパク質フォールディングを助ける。このタイプに分類できる小分子は、封入体からのリフォールディングの際に添加して用いられる。酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンを混合したものを用いるより、さらに高性能な小分子も開発されている。(i) pK_a が中性付近のチオール基を持ち、(ii) 溶解度が高く、(iii) 安定な小分子がデザインされている。ジスルフィド交換を触媒するのはプロトンが解離したチオレートアニオンなので、低濃度で交換効率を増加させるためにはより低い pK_a を持つ化合物が好ましい。チオールを芳香環に共役させた化合物 (**Fig.1d**)¹⁴⁾ や、シクロヘキサンにチオールを結合させた化合物 (**Fig.1e**)¹⁵⁾ は、確かに還元変性させたモデルタンパク質のリフォールディング収率を高める。上記の化合物は、水への溶解度を上げるためにアミンやカルボン酸などの荷電基を導入しているのも特徴である。キットとして市販されているものには TAPS-sulfonate¹⁶⁾がある。また、ラテックスにチオール基を導入したユニークな高分子も報告されている¹⁷⁾。チオール基は含まないが、同様の機構を持つと考えられるエチルアンモニウムニトレイトも、リゾチームの還元変性構造からのリフォールディングに効果が高い¹⁸⁾。

4.2 タンパク質の溶解度を上げる小分子

タンパク質の溶解度を上げる小分子には、グアニジン (**Fig.1i**) や尿素 (**Fig.1j**) などのカオトロピック剤がある。しかし 1M~数 M の高濃度が必要であり、しかもタンパク質を変性させるという側面もあるので取り扱いが単純ではない。SDS や CHAPS などの界面活性剤もここに加えられる。洗練された方法としては、界面活性剤を用いた人工シャペロンがある¹⁹⁾。界面活性剤によって凝集しやすい変性構造の溶解度を上げ、凝集の主な原因になるタンパク質間の疎水性相互作用をまず完全に抑制した状態にする。次に、タンパク質と強固に吸着した界面活性剤を、シクロデキストリンなどで徐々に吸い取り、ゆっくりとリフォールディングさせる。シクロアミロースを用いたキットが宝酒造から市販されている²⁰⁾。しかし界面活性剤や変性剤をオリゴマータンパク質に用いると、モノマーに解離して疎水面が露出してしまい、失活や凝集を促進することも多いので注意が必要である。

4.3 フォールディング速度を上げる小分子

プロリン異性化酵素は生体内にあるフォールディングエンハンサーである。プロリンの異性化を早めてミスフォールディングを抑制し、フォールディングを促進する。同じタイプの小分子には、近距離間相互作用を強めることでフォールディングを促進するハロゲン系有機溶媒²¹⁾や、タンパク質を安定化するトリメチルアミン N-オキシド (**Fig.1c**)²²⁾が知られているが、筆者らが予備的に調べた限りでは凝集抑制剤としての効果は低かった。凝集しやすい中間体の溶解度を上げることが鍵になるので、ネイティブ構造の安定化やフォールディングの促進は、失活や凝集の抑制にはあまり影響を与えないのかもしれない。

4.4 タンパク質を隔離し衝突の頻度を下げる小分子

分子シャペロンは生体内にある代表的なミスフォールド抑制タンパク質である。分子シャペロンは、タンパク質をかごの中に封じ込めることで分子間衝突の機会を無くして凝集を完全に抑制し、タンパク質が自発的にリフォールディングするのを助ける。化学反応も触媒せずフォールディングへの干渉もしない。このタイプに分類できる小分子化合物は、タンパク質の構造に副作用も与えないので理想的である。

アルギニンは、酸化還元力も無く、タンパク質を変性させず、リフォールディング速度にも影響を与えないが、失活や凝集を効果的に防ぐ。理想的な小分子シャペロンのプロトタイプである。ポリアミンやアミノ酸アルキルエステ

ルもおそらく同じタイプに分類できるが、より低濃度でも機能する高性能タイプである。

5. おわりに

本稿では、タンパク質の凝集や失活を抑制する小分子を紹介した。小分子添加剤は、リフォールディング剤への応用²³⁾や、凝集しやすいタンパク質の安定化⁸⁾だけに留まらず、例えば、タンパク質を使った診断薬の常温安定化や、プロテインチップの再利用性の向上、冷却システムを省略した酵素利用ロボットの開発など、さまざまな可能性を秘める。しかし本当に面白いと筆者が思うのは、「なぜアルギニンがタンパク質凝集を抑制するのか」という基礎的な論点である。応用面が先行しているミスフォールディング制御の研究は、実は、フォールディング論にアプローチする面白い視点になりうると期待している。

文献

- 1) Rudolph, R. and Lilie, H. (1996) *FASEB J.* **10**, 49–56.
- 2) Tsumoto, K., Shinoki, K., Kondo, H., Uchikawa, M., Juji, T. and Kumagai, I. (1998) *J Immunol Methods* **219**, 119–129.
- 3) 津本浩平, 三沢悟, 熊谷泉 (2001) 蛋白質核酸酵素 **46**, 1238–1246.
- 4) Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. and Arakawa, T. (2003) *Protein Expr. Purif.* **28**, 1–8.
- 5) 荒木力, 勝山巖, 熊谷泉, 津本浩平 (2003) 蛋白質核酸酵素 **48**, 2310–2317.
- 6) Buchner, J. and Rudolph, R. (1991) *Biotechnology* **9**, 157–162.
- 7) Shiraki, K., Kudou, M., Fujiwara, S., Imanaka, T. and Takagi, M. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)* **132**, 591–595.
- 8) 白木賢太郎, 高木昌宏, 柴田典緒, 黒住忠夫 (2002) 特願 2002–269425.
- 9) Kudou, M., Shiraki, K., Fujiwara, S., Imanaka, T. and Takagi, M. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 4547–4554.
- 10) Oshima, T., Hamasaki, N., Senshu, M., Kakinuma, K. and Kuwajima, I. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11979–11981.
- 11) Shiraki, K., Kudou, M., Sakamoto, R., Yanagihara, I., Imanaka, T. and Takagi, M. submitted.
- 12) Arakawa, T. and Tsumoto K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 148–152.
- 13) Maeda, Y., Ueda, T., Yamada, H. and Imoto, T. (1994) *Protein Eng.* **7**, 1249–1254.
- 14) Gough, J. D., Williams, R. H. Jr., Donofrio, A. E. and Lees, W. J. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3885–3892.
- 15) Woycechowsky, K. J., Wittrup, K. D. and Raines, R.T. (1999) *Chem. Biol.* **6**, 871–879.
- 16) Inoue, M., Akimaru, J., Nishikawa, T., Seki, N. and Yamada, H. (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**, 207–213.
- 17) Shimizu, H., Fujimoto, K. and Kawaguchi, H. (2000) *Biotechnol. Prog.* **16**, 248–253.
- 18) Summers, C. A. and Flowers, R. A. (2000) *Protein Sci.* **9**, 2001–2008.

- 19) Rozema, D. and Gellman, S.H. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2373–2374.
- 20) Machida, S., Ogawa, S., Xiaohua, S., Takaha, T., Fujii, K. and Hayashi, K. (2000) *FEBS Lett.* **486**, 131–135.
- 21) Hamada, D., Chiti, F., Guijarro, J. I., Kataoka, M., Taddei, N. and Dobson, C. M. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 58–61.
- 22) Baskakov, I. V., Kumar, R., Srinivasan, G., Ji, Y. S., Bolen, D. W. and Thompson, E. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10693–10696.
- 23) 坂本龍祐, 白木賢太郎, 高木昌宏 (2003) 特願 2003-370290.

Figure legend

Fig. 1 Chemical structure of additives.

Fig. 2. Preventive effect of additives on the time course of heat inactivation of lysozyme. Samples containing 1 mg/ml lysozyme, 50 mM Na-phosphate (pH 6.5), and additives were heated at 98 °C. Open circles, 100 mM Arg; open squares, 100 mM spermidine; closed circles, no additives. The continuous curves show least-square fitting of the respective data with single-exponential equation.

Fig. 3. Heat-induced inactivation (A) and aggregation (B) of lysozyme depended on the incubation time. Samples containing 1 mg/ml lysozyme, 50 mM Na-phosphate (pH 6.5), and additives were heated at 98 °C. Open circles, 100 mM Arg; open squares, 100 mM arginine ethylester; closed circles, no additives.

Fig. 1, Shiraki

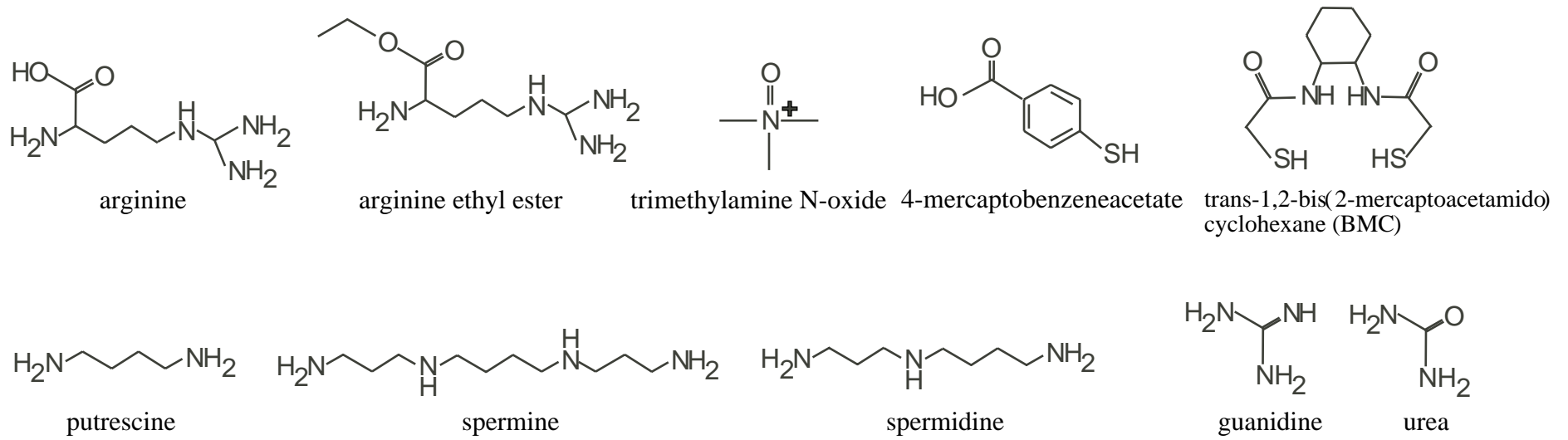


Fig. 2, Shiraki

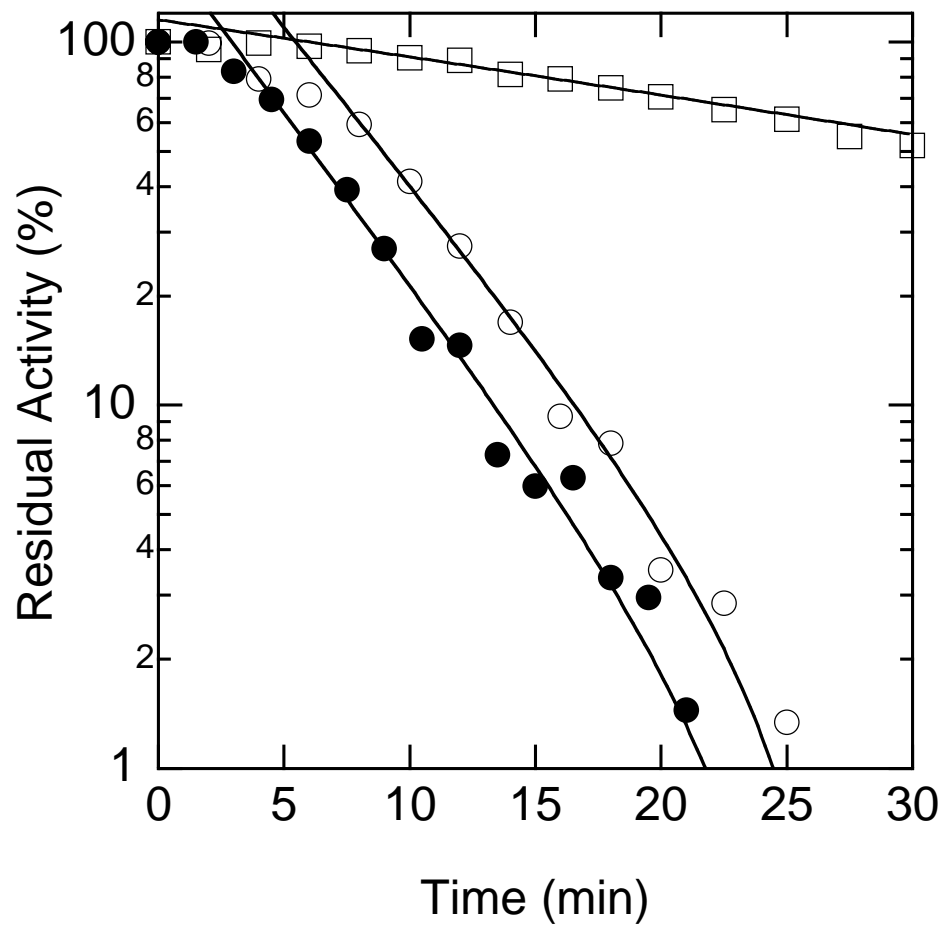


Fig. 3, Shiraki

