

リフォールディング中間体の凝集抑制に関する研究

山口 哲志

1. 緒言

ヒトをはじめとした各種生物のゲノム解読終了後、未知の機能を持った新規遺伝子が次々とクローニングされ、これらの新規遺伝子にコードされるタンパク質の機能解析や構造解析が進められている。このようなポストゲノムの研究においては、解析に十分な量の天然型タンパク質をいかに迅速に低コストに生産するかが重要となる。また、今後、ポストゲノムの研究成果を基にタンパク質性医薬品の開発がさらに活発になることが予想される。このような背景から、天然型の目的タンパク質を高効率に生産する技術が求められている。

近年、タンパク質の様々な発現系が新たに開発されているが、安価・簡便・迅速に増殖でき、高濃度発現が可能である大腸菌を宿主とした発現系は、現在でも最も使用頻度の高い発現系である。しかしながら、大腸菌に大量発現させたヒトや植物由来のタンパク質は、しばしば菌体内で不活性型の不溶性凝集物（封入体）になるという問題点を抱えている。そこで、封入体を解きほぐし（可溶化）、活性型の構造に巻き戻す（リフォールディング）操作が必要である。

可溶化タンパク質のリフォールディングは、大希釈や透析による可溶化剤の除去によって行うのが一般的である。しかしながら、多くのタンパク質では、リフォールディング過程において凝集性の中間体が生じ、この中間体の不可逆な再凝集反応により収率が著しく低下することが報告されている。リフォールディングの効率はタンパク質の生産性に直結し大変重要であるため、凝集性リフォールディング中間体の再凝集を抑制し天然型のタンパク質を高収率で得るために以下の研究を行った。まず、凝集性リフォールディング中間体の形成過程の追跡やその表面特性の評価を行い、次に、この凝集性中間体の再凝集を効率よく抑制しリフォールディング収率を向上させる技術についての研究を行った。

2. SPR センサーを利用した界面活性剤の吸着量測定による固相タンパク質の構造変化追跡法の開発

封入体からのリフォールディング条件を最適化するためには、溶液条件や添加剤の濃度などといった多岐に渡る条件検討を行う必要がある。そのため、種々の条件下におけるタンパク質の構造状態を、迅速に、詳細に評価する手法が求められている。しかしながら、溶液状態においてはリフォールディング中間体の凝集により、各条件下でのタンパク質の構造変化について定量的な情報を得るのは困難である。そこで、ヒドロゲル担体上にタンパク質を固定化し、その凝集を物理的に妨げた環境を用いれば、凝集性タンパク質の構造変化をより定量的に追跡評価できるのではないかと考えた。本研究では、表面プラズモン共鳴（SPR）現象を用い、ゲル担体上タンパク質への非イオン性界面活性剤の吸着量を測定し、その吸着量変化を指標に構造変化を追跡することを試みた。

モデルタンパク質として α -glucosidase (Gluc) を用い、SPR センサーのゲル担体にアミンカップリング法により固定化した。次に、非イオン性界面活性剤 Triton X-100 (TX) を溶かした緩衝液をセンサー表面に注入することにより、固定化 Gluc への吸着に由来するシグナル変化 ($\Delta S_{\text{protein}}$) を求めた。一般的な多層吸着モデルである Brunauer-Emmett-Teller (BET) モデルに従って、得られた $\Delta S_{\text{protein}}$ を解析し、タンパク質表面への第一層吸着量 (ΔS_m) を求め、得られた ΔS_m が Gluc の固定化量に比例することを確認した。

$$\Delta S_{\text{protein}} = \frac{\Delta S_m b C_{\text{TX}}}{(C_l - C_{\text{TX}})[1 + (b-1)C_{\text{TX}}/C_l]} \quad (1)$$

次に、固定化 Gluc に変性操作を施し、TX 吸着量測定法による平衡安定性の評価を試みた。変性前後での単位 Gluc 固定化量当たりのシグナル変化 $\Delta\Delta S_{10}$ を変性緩衝液中の GdnHCl 濃度に対してプロットし (図 1A)、アンフォールディング中点を算出したところ (0.45 M)、活性測定結果から得られた変性中点 (0.48 M) とほぼ同じ値となった。この結果は、不活性化を伴う固定化 Gluc の構造変化を、TX 吸着量測定法により検出できたことを示す。また、溶液中での光散乱測定結果 (図 1B) と比較したところ、TX 吸着量測定法により追跡できた構造変化は、ネイティブ状態から凝集性変性状態への構造変化であることが示唆された。

SPR センサーを用いた TX 吸着量測定法により、ゲル担体上に固定化した Gluc の構造変化が追跡可能であることを実証した。

3. SPR センサーを利用した TX 吸着量測定法による固相タンパク質の表面特性の評価

タンパク質の凝集は、局所的な疎水性表面同士の間分子間疎水性相互作用によりもたらされる。そのため、リフォールディング研究において、タンパク質の表面疎水性は凝集性リフォールディング中間体のマーカーとして重要であるとともに、凝集性を定量化するための指標の一つとなり得る。このような重要性から、本研究では、TX 吸着量測定法により固定化タンパク質の表面疎水性の定量化を試みた。

タンパク質を固定化したヒドロゲル担体は、タンパク質の表面電荷とゲル繊維との静電的な相互作用により伸縮し、SPR シグナルに影響を与えることが報告されている。そこで、まず、荷電性の低分子量化合物 (ethylene diamine, L-aspartic acid) を固定化し、TX 吸着量測定法で得られるシグナルに対して電荷が与える影響を調べた。その結果、固定化物の正電荷は TX 濃度に依存して直線的にシグナルを増加させること、負電荷は逆に減少させることが示された。そこで、この電荷の影響を補正した BET 吸着式 (2) により、データ解析を行うこととした。

$$\Delta S_X = \frac{\Delta S_m b C_{\text{TX}}}{(C_l - C_{\text{TX}})[1 + (b-1)C_{\text{TX}}/C_l]} + \Delta S_c C_{\text{TX}} \quad (2)$$

X = NH₂, (COOH)₂, or protein

5 種類のタンパク質の $\Delta S_{\text{protein}}$ を測定し、(2) 式をフィッティングさせることにより ($R^2 > 0.96$)、 ΔS_m と電荷の影響によるシグナル変化 ΔS_c とを求めた。 ΔS_m は、水性二相分

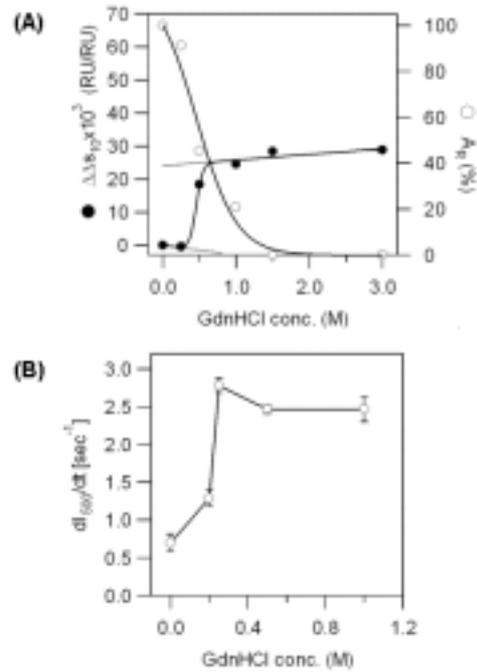


図1 (A) GdnHCl濃度と $\Delta\Delta S_{10}$ および残存活性(A_r)との関係。(B) GdnHCl濃度と光散乱強度の初期増加速度の関係。

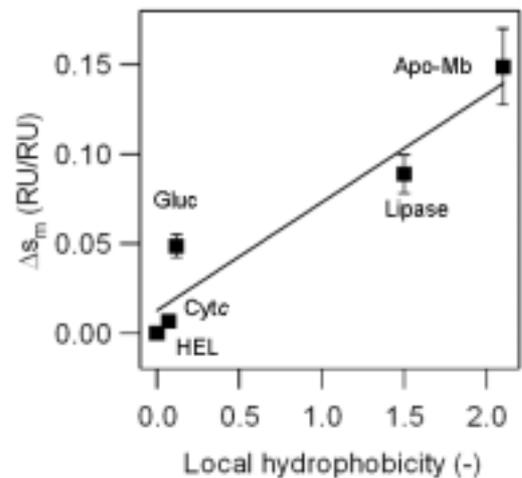


図2 ΔS_m と既報の局所的表面疎水性との関係。

配法を用いて TX の吸着量を求めた既報の結果と高い相関を示した (図 2, $R^2>0.91$). 一方, ΔS_c は, タンパク質の表面総電荷の理論値と相関があり, 電荷の影響を考慮したモデルの妥当性を示した.

TX 吸着量測定法を用いて, HEL の凝集性変性状態の表面特性についての評価を試みた. 固定化 HEL を変性還元し, その前後で TX 吸着量測定法を行った. その結果, ΔS_m の大幅な増加が見られ, 変性還元操作により表面疎水性の高い凝集性構造へ変化する過程を, TX 吸着量変化として追跡できることが確認できた.

以上の結果より, タンパク質の凝集性の指標となるタンパク質の表面疎水性を, TX 吸着量測定法を用いて定量できることが実証された.

4. シクロデキストリンヒドロゲルビーズを用いた固相人工シャペロン法の開発

リフォールディング率の向上を目的に, 再凝集抑制剤の開発が行われてきたが, ほとんどの凝集抑制剤がリフォールディング中間体と強く複合体を形成し, フォールディングも阻害するという問題を持っている. そこで, ホスト化合物の添加により複合体から凝集抑制剤を包接し, リフォールディングを開始させる人工シャペロン法 (ACA 法) について研究を行った.

工業規模への応用という観点から, 固相化ホスト化合物を用いた ACA 法の開発は以下の多くの利点をもたらす. ①界面活性剤とホスト化合物との複合体を除去するステップが省略できる. ②カラムを用いた連続系の構築を可能とする. ③単純な洗浄操作により固相化ホスト化合物の再利用が可能である. そこで, 本研究では, β -cyclodextrin (CyD) を含むヒドロゲルビーズ (CyD ビーズ) を開発し, 固相 ACA 法用のホスト担体としての利用を試みた.

2-acryloyl-*O*-CyD (Acryl-CyD) を合成し, *N,N*-methylenebisacrylamide を架橋剤として acrylamide と重合した後, 粒径 50~200 μm のビーズ状に加工した. この CyD ビーズを用いて, モデルタンパク質である hen egg lysozyme (HEL) の固相 ACA 法を行った. まず, 界面活性剤 CTAB を添加した緩衝液で変性還元 HEL 水溶液を 30 倍に希釈し, 続いて, CyD ビーズ懸濁液で 3 倍に希釈し, 数時間機械的に反転攪拌することによりリフォールディングを行った.

まず, CyD ビーズの最適化を行った. ポリマー化の際の Acryl-CyD 濃度を変えることにより, CyD 含量の異なる 7 種類の CyD ビーズを作成し, 固相 ACA 法に用いた結果, 40 mg/ml が最適であることが分かった. 次に, 架橋剤の濃度の異なる 7 種類の CyD ビーズを用いて固相 ACA 法を行ったところ, 0.5 %C 以上が最適であることが示された. さらに, CyD ビーズの %T を 5%に下げたところ, リフォールディング率が大幅に向上した. 以上の結果より, HEL の固相 ACA 法に最適な CyD ビーズの調製条件を得ることができた.

次に, CyD ビーズを用いた固相 ACA 法と CyD モノマーを用いた液相 ACA 法との比較を行った. その結果, 最適化した CyD ビーズを用いることにより液相法と同等のリフォールディング率を得られることが

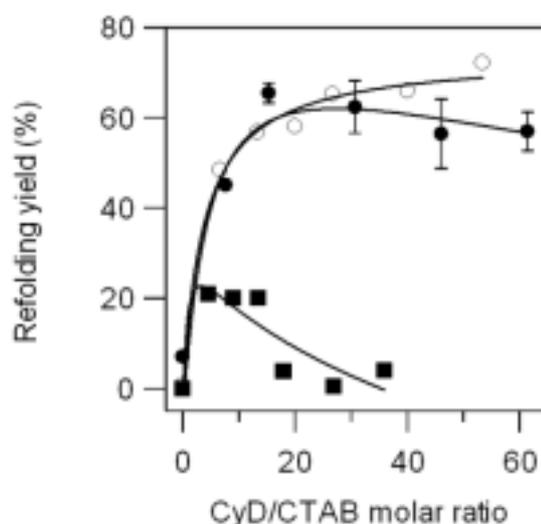


図3 リフォールディングサンプル中のCyDとCTABとのモル比とリフォールディング収率との関係. 二種類のCyDビーズ(5 %T, 2.5 %C, 60 mg/ml Acryl-CyD, ●, 12.5 %T, 0 %C, 60 mg/ml Acryl-CyD, ■)を用いた固相ACA法とCyDモノマーを用いた液相法(○)の結果.

示された (図 3). また, CyD ビーズを carbonic anhydrase B の固相 ACA 法にも応用した結果, 高いリフォールディング率が得られたことより, CyD ビーズの効果は HEL に対してのみに限られるものではない.

本研究により, 固相 ACA 法に適した CyD ヒドロゲルビーズを開発し, CyD ヒドロゲルビーズを用いた固相 ACA 法が高効率なリフォールディング技術となり得ることを実証した.

5. 結言

現在, タンパク質リフォールディングに関する技術として, リフォールディングの条件検討を迅速・簡便にする手法と, 安価・高収率でスケールアップが容易であるリフォールディング手法が求められている. 本研究では, 収率低下の原因となる凝集性リフォールディング中間体に注目し, 第二章・第三章では条件検討の迅速化に関する技術を, 第四章では高収率でスケールアップ可能なリフォールディング技術を開発することに成功した.