

タンパク質凝集抑制剤の構造

白木賢太郎*・平野 篤・浜田 寛之

タンパク質の熱による凝集と、それを抑制する小分子の特徴について紹介する。タンパク質の凝集は、変性タンパク質の溶解性の低下が主な要因となって起こる。つまり、変性タンパク質の溶解性を上げる小分子を共存させると凝集を防ぐことができる。しかし、アンモニウム塩は、塩溶・塩析といった指標だけでは説明できないほど凝集を高度に抑制する。アルギニンなどのタンパク質凝集抑制はアミノ基を持つものが多いように思えるが、それと関係があるのだろうか。

タンパク質の熱凝集

タンパク質溶液を加熱すると白濁する。これが簡単に再現できるタンパク質凝集である。タンパク質凝集体は、凝集前駆体が形成されたあと、それらが会合して生じる(Lumry-Eyringモデル)。



ここでUは可溶性タンパク質、Aは凝集前駆体となる可溶性タンパク質、 A_m は不溶性のタンパク質凝集体である。このモデルによると、凝集は一分子内で生じる構造変化と、続いて生じる多分子間の会合が関与する反応である。つまりタンパク質凝集は、高次の反応速度式に従うように思えるが、実際には一次の速度式に従うように見える場合が多い。ニワトリ由来リゾチームやウシ由来カタラーゼ、ウシ由来クエン酸合成酵素などの熱凝集は、測定開始直後のタイムラグのあと、一次の速度式に従って進む。熱による凝集に限らず、リフォールディング過程や酸性溶媒による凝集も、一次の速度式に従うように観察されるものが多い¹⁻³⁾。凝集過程が一次の速度式に従うように観察されるということは、凝集前駆体Aへの構造変化(1)が律速になっており、続いて生じる凝集体の形成(2)は速やかに進むと考えると矛盾しない。

熱による凝集形成の典型的な例を図1Aに示す。リゾチームを98°Cに加熱しておく、タイムラグのあと一次の速度式に従う過程で凝集が形成される。タイムラグは、溶液温度が一定になる時間のズレや、検出できない凝集形成といったアーティファクトだとする考え方と、凝集核の形成が必須だとする考え方があるが、いずれにせよ

凝集が一次の速度式に従うように見えることは興味深い。加熱して形成させたタンパク質凝集体でさえ、疎水性領域がランダムに会合してできた構造なのではなく、特異的な構造変化を伴って形成されることを示唆する。

塩の効果

まず塩を考えよう。塩は、高分子の溶質を塩析させる傾向が強いものから塩溶させる傾向が強いものまでさまざまな特徴を持つ。沈殿誘起能力のイオン順列は、Hofmeister系列と呼ばれる。たとえば典型的な塩析効果をもつ硫酸イオンは、塩化物イオンに比べて高分子を溶かしにくい特徴を持つ。このような溶解性は、タンパク質凝集への影響を調べる指標になるのだろうか。

図1Aは塩溶液中でのリゾチームの熱凝集を調べたものだが、共存させる塩によって凝集速度が異なる。リゾチームは、硫酸ナトリウム溶液では、同じ濃度の塩化ナトリウム溶液よりもわずかだが速く凝集が進む。つまり、硫酸ナトリウムの方が塩化ナトリウムに比べてタンパク質を塩析させやすいという平衡論的な指標によって、速度論的な実験結果をある程度説明することを示唆する。

ここで、陽イオンをナトリウムイオンからアンモニウムイオンに変えると、凝集がかなり抑制されることがわかる(図1A)。アンモニウムイオンはナトリウムイオンと比べて、リゾチームの凝集速度を速度定数で5倍ほど遅くする。つまり、凝集のしやすさは、タンパク質の塩

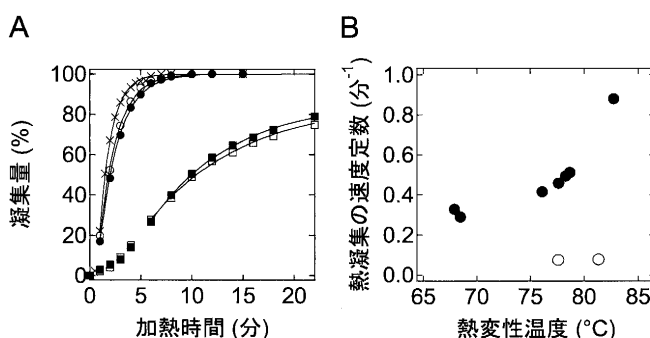


図1. (A) リゾチームの凝集過程。98°Cに保つとリゾチームは凝集する(×)が、0.4 Mの塩を添加しておく、凝集速度が異なる。●, 塩化ナトリウム; ○, 硫酸ナトリウム; ■, 塩化アンモニウム; □, 硫酸アンモニウム。(B) 塩溶媒中でのリゾチームの熱凝集速度と熱変性温度。白丸はアンモニウム塩、黒丸はそれ以外の塩。

特 集

溶・塩析といった溶解性だけでは説明できないことを示唆する。タンパク質と塩との何らかの特異的な相互作用まで考える必要があるのだろう。

さらに考察を深めるために、さまざまな種類の塩溶液中でのリゾチームの熱凝集速度と熱変性温度の関係を図示した(図1B)。アンモニウム塩以外の塩(図1B黒丸)にまず注目すると、変性温度を高める塩ほど、凝集速度が増加する関係にあった。言葉を変えると、タンパク質を凝集させやすい塩は、直感から外れるが、タンパク質を安定化させることを意味する。古くから知られている考え方によると、塩がタンパク質に結合しにくい特徴を持つ場合、タンパク質は選択的水和が誘起されて安定化し、同時に溶解性が低下して塩析するが⁴⁾、このような平衡論的解釈で、速度論的現象である凝集形成を考察できるのかもしれない。しかし興味深い点は、アンモニウム塩(図1B白丸)は、この関係図から外れて、高度に凝集を抑制することである。

まとめると次のようになる。タンパク質を塩溶させやすいイオンは、タンパク質凝集を抑制する。典型的には、ホフマイスター系列の塩溶させやすい性質のイオン、たとえばチオシアン酸イオンや塩素酸イオンは、タンパク質凝集の抑制が期待できる。興味深いのは、アンモニウムイオンが、それ以外のイオンが従うように見える塩溶・塩析の規則から外れて、凝集を高度に抑制することである。

凝集抑制剤の構造

アンモニウムイオンは、塩溶・塩析だけでは説明できないほどタンパク質凝集を抑制することが分かった。ところで、タンパク質を変性させない新しいタイプの凝集抑制剤は、どれもアミノ基を持っている。これと関係するのだろうか。

タンパク質凝集の抑制には、古くから界面活性剤や、高濃度(数M)の尿素やグアニジンが使われてきた。これらの水溶液はペプチド結合や疎水性側鎖を溶かす特徴を持つので、タンパク質凝集を確かに抑制する。しかし変性作用を併せ持つので、本来のタンパク質の働きがなくなってしまうという重大な欠点があった。そこでタンパク質を変性させずに凝集を抑制できる添加剤の開発が期待されてきた。

アミノ酸の一種であるアルギニンは、タンパク質を変性させずに凝集を抑制するだけでなく、比較的安価で安全という強みを持った添加剤で、応用の可能性が広く探られてきた。リフォールディング時にアルギニンを共存させておくと収率が上がる⁵⁾ほか、凝集を抑制すること

が知られている^{6,7)}。本特集でも津本らが紹介しており、アルギニンを利用したクロマトグラフィも開発されてきている^{8,9)}。アルギニンとペプチドの相互作用と凝集抑制の分子機構は、現在でも興味深い論点になっているが、①タンパク質を変性させる作用が少なく^{6,10,11)}、②塩濃度の高い条件では凝集抑制の効果がなくなり¹²⁾、③トリプトファンに結合しやすい¹³⁾などがわかりつつある。ただし、アルギニンを添加剤として使用する場合には、0.2 Mから1 M程度もの高濃度が必要になる。

そこで数十 mM でも効果がある新しい凝集抑制剤が、リゾチームの加熱凝集をモデルに開発されてきた。アミノ酸の主鎖カルボキシル基をエステル化したアルギニンエチルエステル¹²⁾やアミノ酸アルキルエステル¹⁴⁾、リフォールディングに効果があるアミド¹⁵⁾をカルボキシル基と置換したアルギニンアミド¹⁶⁾は、いずれもリゾチームの加熱凝集をよく抑制する。ほかに、典型的なポリアミンであるスペルミジンやスペルミン³⁾も、リゾチームの加熱凝集という指標ではアルギニンやグアニジンよりも効果が高い。これらはLumry-Eyringモデルの(2)の凝集過程を高度に抑制する^{3,12)}。なおリゾチームの熱凝集の抑制という指標では、モノアミンやジオールには効果がなく、ジアミンだけが効果があるというクリアな結果も得られている¹⁷⁾。

リフォールディングへの利用

熱による凝集抑制剤を、還元変性させた状態からのリフォールディング液に共存させると、収率が増加するのではないか。このような単純な発想のもと、リゾチームをモデルに系統的に調べてきた。その結果、熱凝集を抑制する小分子と、リフォールディング収率を増加させる小分子は、特徴が違うらしいことが分かってきた(図2)。

現在分かってきた情報を整理すると次のようになる。熱凝集を抑制する小分子は、上述のとおり、アミノ基を持つ必要がある。しかも複数のアミノ基(プラスグアニジウム基でも構わない)が必要である^{3,17)}。しかしリフォールディング収率を増加させる小分子は、グアニジウム基が必要である。

たとえばポリアミンの一種であるスペルミジンは、グアニジウム基を持たないのでリフォールディングには効果がないが、複数のアミノ基を持つので熱凝集の抑制には効果がある。グアニジノプロピオン酸は、グアニジウム基を持っているのでリフォールディングには効果があるが、グアニジウム基をひとつしか持たないので熱凝集の抑制には効果がない。アルギニンエチルエステルは、アミノ基とグアニジウム基の両方を持つので、いずれに

も高い効果がみられる。リゾチームをモデルに数十種類を調べた限り、いまのところこの規則に従うようだ。

なお、分類した中にも効果の大小はもちろんある。アルギニンと比べるとアルギニンエチルエステルやアルギニンアミドは、熱凝集の抑制やリフォールディングへの効果のいずれもが高い。グアニジンも、数Mもの高濃度を用いるとタンパク質凝集を抑制するが、それは100 mM程度で効果があるかを比較検討しているこの相関図とは、また別の問題の裡にある。

もっとシンプルな規則が見つかるのか、リゾチーム以外のタンパク質にも適応できる規則なのかを調べることで、今後の課題として残されている。

リフォールディング凝集抑制	
	効果あり 効果なし
加熱凝集抑制	効果あり
	効果なし
効果あり	I 群
	III 群
効果なし	II 群
	IV 群

図2. 熱による凝集抑制効果と、リフォールディングに伴う凝集抑制効果の比較。

おわりに

タンパク質はもともと凝集しやすいものである。新規な酵素をクローニングしたのは良いが、精製が難しかったり保存できなかったりと、凝集抑制が鍵になることが多い。タンパク質精製の失敗に関する経緯が詳細に記された修士論文は、今でも世にあふれている。

タンパク質の限らない可能性と、私たちの研究対象としての期待とはうらはらに、タンパク質溶液をデザインしようといった試みは不思議と少ない気がする。Tris 緩衝液は遠紫外 CD にノイズを出すのでリン酸緩衝液にしておこうなどと、深く考えずに溶液成分を決めることが多いが、それで良いのだろうか。

最後に一言。タンパク質溶液にいつもの習慣として塩化ナトリウムを0.1 Mほど添加することはナンセンスである。凝集を抑制するという視点では、塩化アンモニウムか硫酸アンモニウムをオススメする。

文 献

- 1) Kurganov, B. I.: *Biochemistry (Mosc.)*, **67**, 409 (2002).
- 2) Wang, K. and Kurganov, B. I.: *Biophys. Chem.*, **106**, 97 (2003).
- 3) Kudou, M. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4547 (2003).
- 4) 荒川 力, 喜多淑子: 生物物理, **45**, 4 (2005).
- 5) 荒川 力ら: 蛋白質核酸酵素, **48**, 2310 (2003).
- 6) Shiraki, K. *et al.*: *J. Biochem.*, **132**, 591 (2002).
- 7) Tsumoto, K. *et al.*: *Protein and Peptide Lett.*, **12**, 613 (2005).
- 8) Tsumoto, K. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **28**, 1 (2003).
- 9) Tsumoto, K. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1301 (2004).
- 10) Arakawa, T. and Tsumoto, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 148 (2003).
- 11) Ishibashi, M. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **42**, 1 (2005).
- 12) Shiraki, K. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3242 (2004).
- 13) Tsumoto, K. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1301 (2004).
- 14) Shiraki, K. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **21**, 640 (2005).
- 15) Yasuda, M. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **14**, 601 (1998).
- 16) 特願2006-167386
- 17) Okanojo, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 556 (2005).