

# 高分子電解質で制御するタンパク質の物性と機能

栗之丸隆章

濃厚なタンパク質溶液である細胞内には、タンパク質分子と相互作用する高分子化合物が溢れている。本稿では、細胞模倣研究として合成高分子電解質に着目し、これがタンパク質の構造や機能に与える影響について探求し、明らかにしてきた成果を報告する。高分子電解質が非共有結合によってタンパク質に結合するだけで、物性や活性が大きく変化する。ここで得られた成果は、生命現象の理解の助けや新しいテクノロジーの基礎を生み出す可能性を秘めている。

## 序 言

細胞内は大小さまざまな生体分子が高濃度に含まれており、非常に混み合っている<sup>1)</sup>。細胞内でのタンパク質の振る舞いを知るためには、希薄なタンパク質溶液を扱う従来の実験系から一歩踏み出す必要がある。一般的に、細胞内の混み合い(クラウディング)を反映させたタンパク質研究は、“タンパク質と相互作用しない”不活性な高分子化合物(クラウダー)を利用した模範的な実験が多い。タンパク質溶液にクラウダーを高濃度で加えることで排除体積効果などが生まれ、タンパク質のフォールディング速度や会合速度に影響を与える<sup>2)</sup>。希薄溶液では機能構造をもたない特殊なタンパク質でも、クラウディング環境では機能構造を形成するという興味深い報告もある<sup>3)</sup>。中には五次構造というまったく新しい概念を提唱する研究者もいる<sup>4)</sup>。このように、タンパク質を取り巻く環境を細胞内に近づけることで、これまで予想できなかった新しい現象を発掘できる。

しかし、不活性な高分子化合物をクラウダーとして用いる実験だけでは不十分である。なぜなら、実際の細胞にはDNAやRNAなどの“タンパク質と相互作用する”荷電性の生体高分子が必ず存在するからである。このような生体高分子は高分子電解質と総称されるが、タンパク質は反対の電荷をもつ高分子電解質と静電的に相互作用して複合体を形成する(図1A)。タンパク質と高分子電解質の複合体(protein-polyelectrolyte complex: PPC)は生体内でも重要な役割を果たしている。たとえば、ヒストンと呼ばれるタンパク質はDNAと複合体(ヌクレオソーム)を形成し、DNAを物理的に保護する。もちろん、DNAよりも構造が単純な合成高分子電解質もタンパク質とPPCを形成することができるので<sup>5)</sup>、PPCの研究は細胞模倣研究の一種として一役買うことができる。我々は、さまざまなタンパク質と高分子電解質を使

用してPPCを作り、タンパク質の物性や機能への影響を評価してきた。その結果、タンパク質の安定性や凝集性、活性のいずれもが、高分子との非共有結合による相互作用によって変化することがわかった。本稿では、そのような研究から得られた興味深い現象について紹介したい。

## PPCの可溶性・不溶性・塩溶解性

筆者は、PPCを大まかに可溶性と不溶性に分類している(図1)。可溶性のPPCは数十から数百nmのサイズで、通常肉眼で見えることはできない。一方、不溶性のPPCは数百nmから数 $\mu\text{m}$ 程度のサイズをもち、肉眼で観察することもできる。PPCの可溶性と不溶性は温度やpH、分子量、イオン強度、混合比などのさまざまなパラメータによって決まる。経験的には、少量の高分子電解質を加えた時は不溶性のPPCを形成し、過剰に加えると可溶性のPPCを形成することが多い<sup>6)</sup>。このような挙動を示す原因は、おそらく可溶性のPPCは一つの高分子電解質に数個のタンパク質が吸着した状態で、不溶性のPPCはそれらが架橋した状態であるためであろう。すなわち、不溶性のPPCは複数のタンパク質が高密度に寄り集まった状態ととらえることができる。

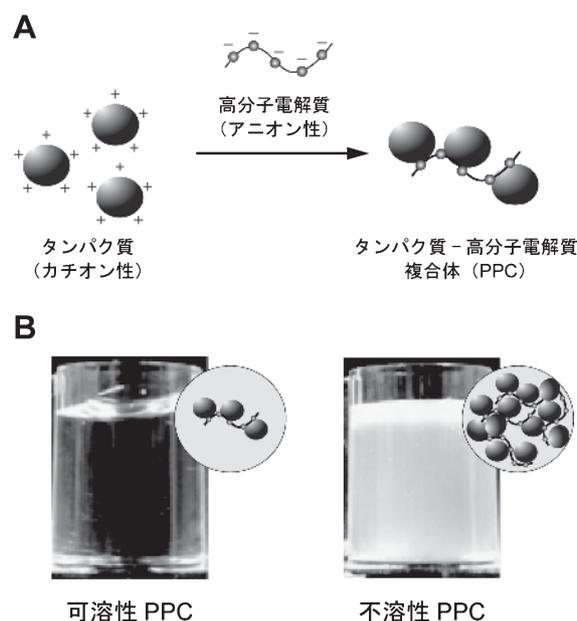


図1. (A) タンパク質-高分子電解質複合体(PPC)のモデル図。アニオン性的高分子電解質がカチオン性のタンパク質に静電的に結合し、PPCを形成する。(B) 可溶性PPCと不溶性PPC。

不溶性のPPC溶液の見た目は白濁している場合が多く、凝集したタンパク質溶液とよく似ている。遠心分離などの機械的な操作で簡単に沈殿するという点も共通している。しかし、両者の沈殿物は“溶解性”という点で大きく異なる。一般的なタンパク質凝集体はグアニジンや尿素などの強力な変性剤を高濃度で用いなければ溶かすことができない。仮に溶かせたとしても、再び元の立体構造に戻せる保証はない。一方、不溶性PPCの沈殿物はNaClを加えれば簡単に溶解し、元の構造や機能を持ったタンパク質が再び生じる<sup>6)</sup>。タンパク質と高分子電解質間の静電的引力がNa<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>によって遮蔽されるため、このような溶解が生じると考えている。溶解に必要なNaCl濃度はタンパク質や高分子電解質の種類によって異なるため、厳密には定まっていないが、血清の塩濃度である150 mMで溶解することが多い。興味深いことに、不溶性PPC沈殿は物理的耐性も強く、振とうストレスからタンパク質を保護することができた(投稿中)。このようなPPCの塩濃度依存的な会合-脱離反応や物理的安定性は、生体内のタンパク質の振る舞いに重要な意味を持っているのかもしれない。

### 酵素活性ON-OFF制御

不溶性PPCでは興味深い現象が見られたが、可溶性PPCでは見られないのだろうか？ 試みにカチオン性のリボヌクレアーゼA (RNaseA) にアニオン性のポリアクリル酸 (PAAc) を混ぜて酵素活性を測ったところ、酵素活性が減少することがわかった<sup>7)</sup>。RNaseAとPAAcは正と負の電荷の組合せが成り立っているが、混合溶液が透明なままであったことから、可溶性のPPCを形成していることが示唆された。さらに、PAAcによって不活性化したRNaseにカチオン性高分子電解質であるポリアリルアミン (PAA) を加えると、酵素活性が元通りに回復した。おそらく、PAAcがRNase Aから離れ、より電荷密度の高いPAAと複合体を形成した結果、RNase Aがフリーになったためであろう。同様の現象はカチオン性のリゾチームやトリプシンでも確認できた<sup>7,8)</sup>。以上より、酵素は可溶性PPCを形成すると不活性化し、別の電荷を持つ高分子電解質で可溶性PPCを解離させると再活性化することが示された。言い換えると、電荷の異なる高分子電解質を交互に加えると、酵素活性を可逆的にON-OFF制御できることがわかった(図2A)。

この高分子電解質による酵素活性制御は、実は不溶性PPCでは実現できないことも分かっている<sup>7,9)</sup>。実際に、アニオン性の $\alpha$ -アミラーゼや $\beta$ -ガラクトシダーゼにカチオン性のPAAを加えると、不溶性のPPCを形成して酵素活性が不活性化されたが、ここにアニオン性のPAAcを加えても再活性化しなかった。この場合、不活性化する高分子電解質に少し細工を加えると良い。すな

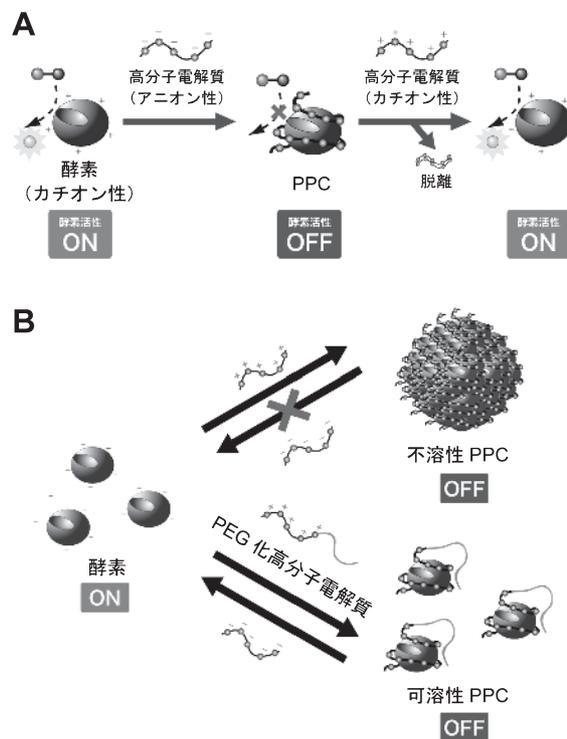


図2. (A) 高分子電解質を用いた酵素活性ON-OFF制御のモデル図. PPCを形成すると酵素活性がONからOFFになる(不活性化). PPCに反対の電荷を持つ高分子電解質を加えると交換反応が生じ、酵素活性がOFFからONに戻る(再活性化). (B) 不溶性のPPCを形成すると活性制御に失敗する. PEG化高分子電解質を利用して可溶性の複合体を形成させると、酵素活性制御が可能になる。

わち、凝集抑制効果を持つポリエチレングリコール (PEG) と高分子電解質の共重合体 (PEG化高分子電解質) を用いれば、上述のアニオン性酵素と可溶性のPPCを形成し、酵素活性も問題なく制御できた(図2B)<sup>9)</sup>。最近では、PEG化高分子電解質からなる可溶性PPCはプロテアーゼや振とうストレスからタンパク質を保護することも明らかにした<sup>10)</sup>。

### 酵素超活性化現象

高分子電解質による酵素活性制御は可溶性のPPCで生じやすいことを示したが、さらに研究を進めていくと、予想外の結果が得られた。すなわち、カチオン性の $\alpha$ -キモトリプシン (ChT) にアニオン性のPAAcを加えると、酵素活性が下がるどころかむしろ著しく増加したのである。その増加率がフリーの酵素の5倍以上であったことから、この現象を“酵素超活性化現象”と名づけた。この現象の鍵は基質にあると仮定し、電荷の異なる3種類の基質を用意して調べた。その結果、カチオン性の基質では酵素超活性化現象が見られたが、中性やアニオン性の基質では逆に不活性化した(図3A)<sup>11)</sup>。以上より、酵素超活性化現象には、(i) PPCの形成と(ii) 基質の

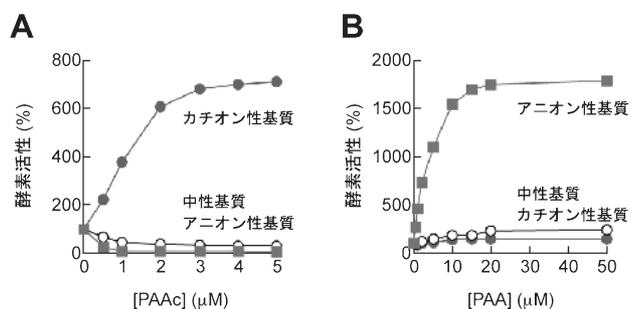


図3. 高分子電解質存在下におけるChTの酵素活性. (●) カチオン性基質, (○) 中性基質, (■) アニオン性基質, (A) PAAc, (B) PAA (文献11を参考に作成)

電荷が重要な役割を果たしていることが示唆された。

興味深いことに、酵素と同じ電荷を持つ高分子電解質でも超活性化現象は生じる。たとえば、カチオン性のPAAを加えると、アニオン性基質に対する酵素活性が最大18倍に増加した(図3B)<sup>11)</sup>。動的光散乱測定や円偏光二色性スペクトルなどの測定からは、これらがPPCを形成しているかどうかははっきりしなかった。これらの高分子電解質やポリアミンがChT周りで反応場を形成し、基質の局所濃度が増加した結果、酵素活性が著しく増加したと推測しているが、詳細な機構を解明することは今後の課題となる。

高分子電解質と同様に、界面活性剤ミセルや機能性金ナノ粒子のようなカチオン性化合物であれば、アニオン基質に対するChTの酵素活性が増加するという傾向が分かっている。この単純な法則の一般性を確認すべく、図4Aのようなアミン化合物を12種類用いて系統的に調べた。予想通り、いずれのアミン化合物を用いてもChTの酵素活性は増加したが、活性化の度合いはアミノ基の個数やアルキル鎖長に依存していた(図4B)<sup>12)</sup>。すなわち、アミン化合物の多点性をもつほど、また疎水的であるほど、ChTは活性化したのである。これらのアミン化合物の中には生物の代謝産物であるポリアミン(プトレシン, スペルミジン, スペルミン)も含まれていることから、生体内でこのような活性化現象が生じることが示唆された。

おわりに

本稿では、高分子電解質を添加することで、タンパク質の性質を変化できる事例を紹介してきた。タンパク質と高分子電解質との非共有結合的相互作用と連動し、酵素活性がOFFになったり、逆に一桁以上も活性が増加したり、または物理ストレスに対する耐性の改善や、凝集しやすくなるなどの物性の変化があらわれる。このような結果を見てみると、多様な分子で混み合った細胞内では、いったいどのようなことがおきているのだろうか。生物物理学や酵素学での研究、つまり、精製した純粋な

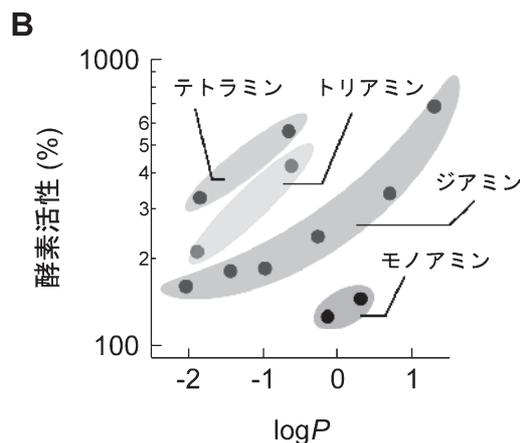
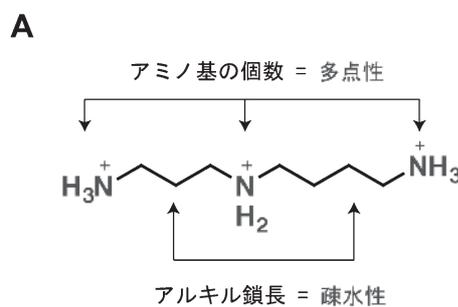


図4. (A) アミン化合物の化学構造. アミノ基の個数やアルキル鎖長の異なる12種類のアミン化合物を使用した. (B) 50 mMアミン化合物存在下におけるChTの酵素活性.

タンパク質を緩衝液に溶かした試験管内での実験を外挿するだけで、はたして細胞内でのタンパク質の挙動が明らかになるのだろうかと思うことが多い。

今回紹介した研究成果は、タンパク質のハンドリング法としての魅力も兼ね備えている。すなわち、PPCを利用したタンパク質の濃縮や安定化、ON-OFFスイッチング、活性化などの基盤技術を確認することもできる。将来、これらの技術がタンパク質の応用を進展させることを期待している。

文 献

- 1) Zimmerman, S. B. et al.: *J. Mol. Biol.*, **222**, 599 (1991).
- 2) Ellis, R. J.: *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 597 (2001).
- 3) Homouz, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11754 (2008).
- 4) Wirth, A. J. and Gruebele, M.: *Bioessays*, **35**, 984 (2013).
- 5) Kayitmazer, A. B. et al.: *Soft Matter*, **9**, 2553 (2013).
- 6) Kurinamaru, T. et al.: *J. Pharm. Sci.*, **103**, 2248 (2014).
- 7) Tomita, S. et al.: *Soft Matter*, **6**, 5320 (2010).
- 8) Tomita, S. and Shiraki, K.: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **49**, 3835 (2011).
- 9) Kurinamaru, T. et al.: *Langmuir*, **28**, 4334 (2012).
- 10) Kurinamaru, T. and Shiraki, K.: *J. Pharm. Sci.*, **104**, 587 (2015).
- 11) Kurinamaru, T. et al.: *Langmuir*, **30**, 3826 (2014).
- 12) Kurinamaru, T. et al.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **115**, 135 (2015).