

タンパク質を巻き戻すコツと原理

二見淳一郎

組換えタンパク質の生産において、愛しの発現タンパク質が不溶性のインクルージョンボディとして沈殿してしまい、暗澹たる気持ちになった人は多いであろう。なぜ私のタンパク質は沈殿してしまったのだろうか？と実験ノートを見返して可溶化してくれそうな条件検討を練り直したとしても、その努力が報われないことも多い。そんな時はインクルージョンボディから試験管内で活性構造に巻き戻すこと（リフォールディング）も一つの手段であることを思い出してほしい。この方法で比較的高効率に巻き戻せるタンパク質がある一方で、残念ながらどう頑張ってもリフォールディングできないタンパク質もあるのが現実ではある。ここではまずタンパク質の凝集機構を整理し、変性状態のタンパク質から活性構造を形成する原理を科学的な視点で理解を進め、リフォールディングが神頼みではなく、タンパク質分子の物理化学的な性質に依存していることを実感してほしい。

水の世界に馴染むために

ヒト成人の体重の約6割は水分である。つまり水溶性の球状タンパク質の周辺は水だらけだ。タンパク質が水に溶けているという状態は、液体の水分子同士で形成される水素結合ネットワークへの仲間入りが許された状態と言えよう。物質が水に馴染むためには界面の性質が重要である。

X線結晶構造解析で立体構造が判明している水溶性タンパク質における各アミノ酸の露出度と各アミノ酸の疎水性度をプロットすると、親水性のアミノ酸側鎖が分子表面に露出し、疎水性アミノ酸側鎖が分子内部に隠れている傾向が明確にわかる(図1)。このような水溶性タンパク質が不溶化する二つの典型例を整理してみよう(図2)。

(a) **変性による不溶化** タンパク質が正しい立体構造を形成できていない変性状態では分子内部に隠しておくべき疎水基が露出してしまうため、主に疎水性の分子間相互作用が強まり大きな凝集塊が形成されてしまう。多くのインクルージョンボディに含まれるタンパク質は変性状態で凝集しており、宿主細胞内で正しくフォールディングできなかったことが主因である(図2

左)。ちなみに変性状態でありながら高い水溶性を示すタンパク質の代表的なものがゼラチンであり、そのアミノ酸組成は疎水性アミノ酸がほとんど含まれていない特徴がある。

(b) **塩析による不溶化** 塩化ナトリウムが水に溶ける際には陽イオンと陰イオンになり水に溶けるが、イオンの周りには複数の水分子が強く水和している。この理由は Na^+ と Cl^- がペア(塩)を形成するよりも、水和している方が安定だからである。水溶性のタンパク質の周りにも水溶性を保つために必須の多数の水和水が存在

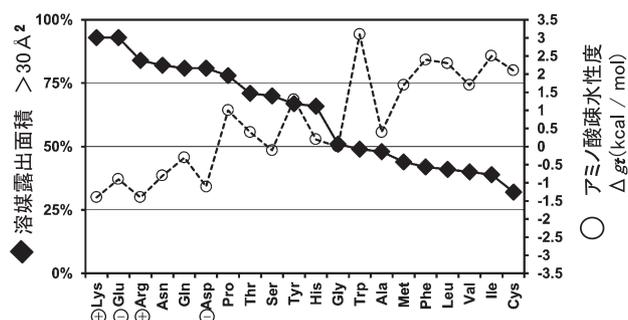


図1. 水溶性タンパク質分子表面へのアミノ酸側鎖の露出度と疎水性度の関係¹⁾

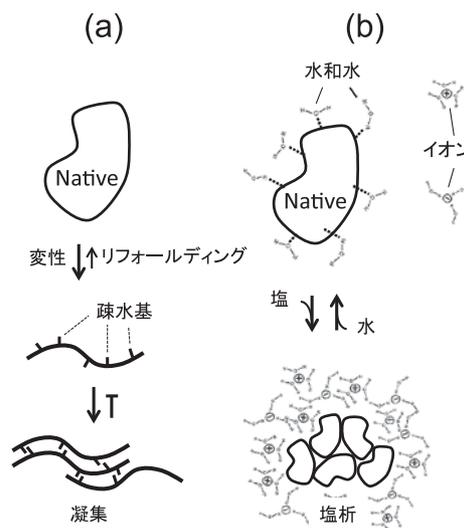


図2. タンパク質の変性による不可逆的な凝集 (a) と塩析による可逆的な凝集 (b)

する。タンパク質の水溶液に過剰量の塩を添加していくと、水和力の強いイオンに水分子がどんどん奪われ、次第にタンパク質分子表面の水和水も奪われていく。水和水を奪われたタンパク質どうしが凝集した状態を塩析と呼ぶ。比較的安定性の高い血清中のタンパク質などは立体構造を維持したまま塩析するため、沈殿物に水を加えると再び溶解する(図2右)。

宿主細胞の環境はフォールディングに適していたか？

生命活動を担う万能素材であるタンパク質は、各仕事場で最高の機能発現ができるように適応進化してきた産物であり、組換えタンパク質が生産される環境が適切でないこともある。細胞外に分泌されるタンパク質には高い安定性が求められ、分子内の複数のジスルフィド(SS)結合が熱力学的な安定化に大きく寄与している。還元的な環境である大腸菌の細胞質内でこれらのタンパク質を合成しても、適切なSS結合が形成されず、大半が不溶性のインクルージョンボディとなる。一方で、真核生物の細胞質内のタンパク質を、原核生物の細胞質内で発現させる場合には、SS結合の形成が不要なので比較的うまく行きそうなものであるが、実際はインクルージョンボディを形成してしまう例が多いことが知られている。自発的なフォールディングが困難なタンパク質の可溶化はシャペロンの介在で説明される場合もあるが、それ以外に次の二つの本質的な理由が考えられる。

(a) 翻訳速度とフォールディングの関係²⁾ 原核生物のリボソームの翻訳速度は速く(～15 a.a./sec)、ポリ

ペプチド鎖の合成後に構造を形成する‘post-translational folding’でタンパク質が合成される。一方で、真核生物のリボソームの翻訳速度は遅く(～3 a.a./sec)、ポリペプチド鎖の合成とともにモジュール単位で構造を形成しながら活性構造となる‘co-translational folding’で合成されている(図3左)。タンパク質は各細胞内で正しくフォールディングできるように適応しているため、この両者の違いが、異種宿主内ではタンパク質のフォールディングがうまく進まない原因の一つとして推定されている。大腸菌の低温培養で真核生物由来の組換えタンパク質の可溶化率が改善する成功例も知られており、翻訳速度とフォールディングの関係がより好ましい条件に近づいたことが一因と考察される。翻訳速度にはコドン使用頻度やmRNAの2次構造といった因子も関わるため、人工合成遺伝子で最適化することで可溶化率が向上することもある。

(b) 複合体形成とフォールディングの関係 真核生物の細胞内タンパク質はきわめて濃厚な環境下で相互作用パートナーと出会い、複合体を形成している。近年、これらの相互作用は両者が出会う前には不規則な構造であり、両者が出会ってから構造を形成する例がきわめて多いことが判明している(図3右)。したがって、相互作用パートナーと出会えない状態で強制発現された組換えタンパク質は、いつまでも安定な複合体の活性構造を形成することができない。この不規則領域は疎水性アミノ酸が少ない特徴があり、ただちに凝集する引き金とはなりにくいですが、不規則領域が多いタンパク質(天然変性タン

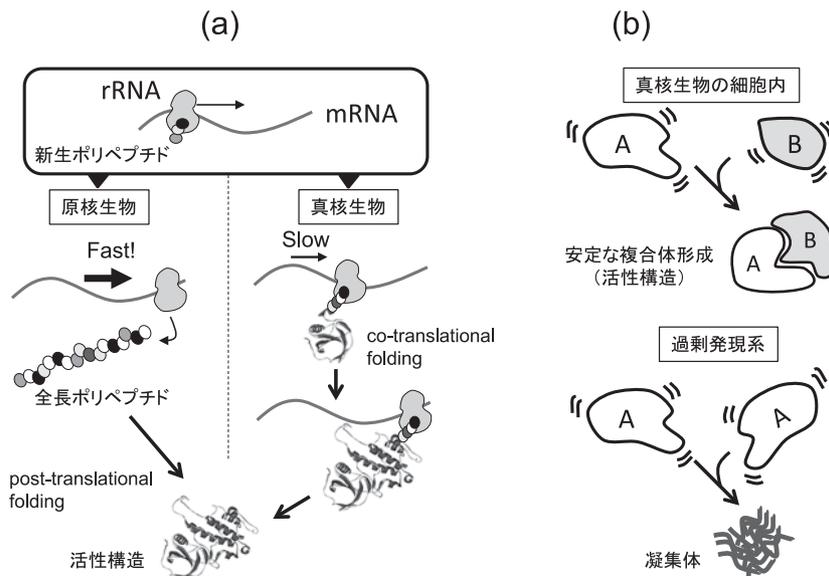


図3. タンパク質の翻訳速度とフォールディングの関係 (a) と不規則領域を持つタンパク質の複合体形成 (b)

パク質)では、水和状態よりも凝集状態の方が安定となることが多いようである。

変性タンパク質の活性構造へのリフォールディング

1961年にAnfinsenは分子内に四つのSS結合を持つウシ膵臓由来型RNaseA (124 a.a.)を変性・還元した後、空気酸化により熱力学的にもっとも安定なNative構造へと自発的に再生できることを示した³⁾。8個のSH基から分子内のみでSS結合を形成すると仮定しても、 $7 \times 5 \times 3 = 105$ 通りの組合せがあり、もっとも安定な4ペアのみがNative構造の形成に選択されている。RNaseAの場合、エントロピーが高い変性・還元ポリペプチドから出発し、分子内で構造形成に関わるさまざまな化学結合が蓄積 ($\Delta H < 0$) して、安定なNative構造を形成 ($\Delta S < 0$) するまでの一連の自由エネルギー変化 ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) 値は負であり、自発的に進む。正しいSS結合ペアをリフォールディング過程で見つけてもらうためにも、反応系はSH/SS交換反応が触媒されるように酸化型/還元型グルタチオンなどで適切な酸化還元系にしておくことが好ましい。リフォールディング過程での最大の問題が分子間凝集による不溶化である。Anfinsenが用いたRNaseAは比較的疎水性アミノ酸が少ないタンパク質で、変性・還元状態でもある程度の溶解性を維持しており、低濃度にしておけば凝集が進まずリフォールディングが進行する。まさにこの証明実験に好適なタンパク質であった。

インクルージョンボディの夾雑物に注意せよ

大腸菌を宿主としたタンパク質発現では、pETシステムのような過剰発現系を利用すると、菌体の溶菌・破碎後のインクルージョンボディの純度がSDS-PAGE上で90%を超えることも珍しくない。これを変性剤で溶解すればそのままリフォールディングに使えるものがあるが、核酸をはじめとした非タンパク質性の菌体由来の夾雑物がリフォールディング効率を大幅に低下させてしまうことがある。核酸の場合は高塩濃度 (>0.4 M) 共存下で不都合な静電相互作用が軽減されるが⁴⁾、HisTagなどの変性剤中でも利用できるタグを利用してあらかじめ精製したり、TAPS-SulfonateのようなCys残基に対する可逆的な化学修飾試薬を活用して粗精製しておくこと、その後のリフォールディング効率が大幅に改善することがある⁵⁾。ちなみにインクルージョンボディの沈殿物を効率的に溶解する際にもコツがある。変性剤として6 M塩酸グアニジンや8 M尿素が一般的に用いられるが、これらを粘性の高いインクルージョンボディの沈殿

物に直接添加してもなかなか溶解できない。ところが、事前にごく少量の水で沈殿物をピペッティングなどでほぐしておいてから変性剤を添加すると、きれいに溶けてくれる。

変性剤の「保護」からの独り立ちがリフォールディング

高濃度の変性剤中で溶かされている変性タンパク質を、凝集との競争反応という危険な橋を渡りながら、立派に独り立ちできる活性構造までリフォールディングできるようにサポートしてあげる場を提供するのがリフォールディング実験の最重要ポイントである。分子内にSS結合の形成が必要なタンパク質の場合は、本来のフォールディング環境であるER/ゴルジ内の適切な酸化還元系(酸化型/還元型グルタチオンが汎用される)を準備してあげる必要もある。リフォールディングの手順としては高濃度の変性剤中に存在する変性タンパク質溶液を透析チューブ内に保持しながら、徐々に変性剤を抜いていく「透析法」と、一気に低濃度に下げる「希釈法」(図4)の二つに大別される。前者はタンパク質濃度を高めに保つことができるため、複合体形成を伴うリフォールディングには有利である。後者はタンパク質濃度が一気に低下するので、変性タンパク質どうしが凝集するリスクが軽減できる利点がある。高濃度の変性剤中で溶解されている変性タンパク質を出発材料として透析法や希釈法でリフォールディングを開始する際に、低濃度の変性剤がリフォールディングの途上のタンパク質分子間の好ましくない疎水相互作用を軽減してくれる凝集抑制効果をうまく活用すべきである。リフォールディングするタンパク質の安定性にもよるが、塩酸グアニジンでは0.4 M程度、尿素では2 M程度が凝集抑制効果の至適濃度となる。その他にもリフォールディング効率を改善する添加剤としてL-アルギニンや高濃度のグリセロールが汎用されている。L-アルギニンのフォールディング促進効果は、低濃度の塩酸グアニジンと類似の凝集抑制作用と考えられる。タンパク質の保存安定化剤としても汎用されているグリセロールにも併用効果が期待できる。糖類が示すタンパク質の安定化機構にはさまざまな議論があるが、高濃度の糖類が存在すると変性状態のタンパク質分子表面に特異的な水和水が増えてくる例が観察される⁶⁾。これは変性状態のエントロピーを低下させることで、相対的に活性構造との ΔG を大きくしている機構が推定される。経験的な結論としてタンパク質の種類とリフォールディングを改善する添加剤には「相性」があるようで、スクリーニングにより最適条件を見いだすことが成功の鍵となる。さまざまな成功例をベースに開発

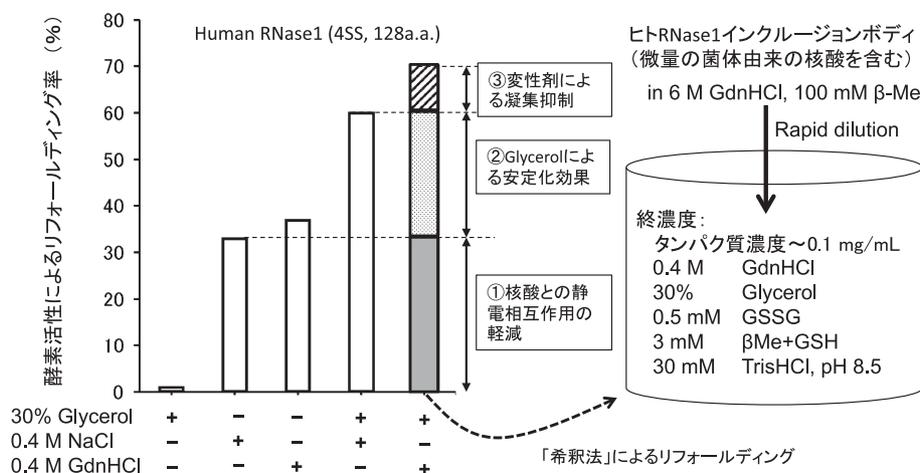


図4. インクルージョンボディ由来タンパク質の「希釈法」による酸化還元系でのリフォールディング条件の最適化例⁴⁾. 添加剤によるリフォールディング改善は相乗効果として現れる.

された市販のリフォールディング条件のスクリーニングキットもあるので、これらの条件でまず試してみるのもよい.

組換えタンパク質の発現系の構築段階でまずは可溶性発現を願い、GST融合タンパク質のように大腸菌での可溶性発現効率の向上と簡便なアフィニティ精製を同時に達成できる発現系からスタートする人が多いであろう。しかし残念ながらGST融合タンパク質がインクルージョンボディを形成してしまう事態も少なくない。GST融合タンパク質のリフォールディングにはGSTドメインと目的タンパク質の二つのドメインを同時にリフォールディングする必要があり、より複雑な系となる。筆者の経験上、GSTドメインのリフォールディング効率はあまりよくなく、GSTドメインを含まない構築でリフォールディング条件をスクリーニングしたほうが、効率が良さそうである。

リフォールディングを指標としたスクリーニング例

近年、ヒト由来の組換えタンパク質の調製にはHek293細胞やCHO細胞といった培養細胞を宿主とした組換えタンパク質の高発現システムがラボレベルで簡便に取り扱えるようになり、研究に必要なタンパク質を活性構造で生産できる可能性が高まっている。タンパク質の機能解析のためにインクルージョンボディからのリフォールディングを試さざるを得ない機会は減ってきているかもしれない。一方で、タンパク質が変性状態から試験管内でリフォールディングできるか否かを指標としたスクリーニング法が重宝されている例がある。近年、腫瘍免疫応答の活性化が、がん治療にきわめて重要なことが明らかとなってきた。がん細胞を殺傷する能力があ

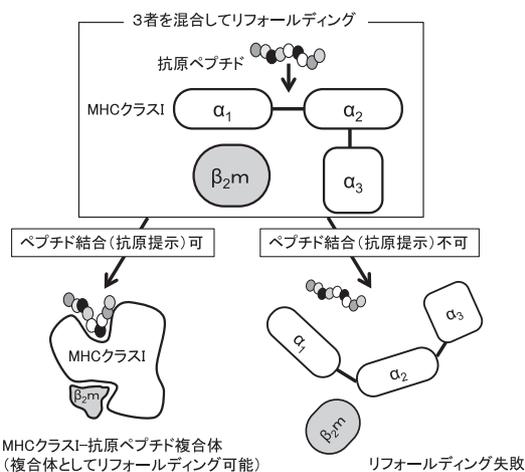


図5. MHCクラスI (細胞外ドメイン) 上に抗原提示可能なペプチドのスクリーニングはβ2ミクログロブリン (β2m) とともに複合体を形成するリフォールディングの成否で判断ができる。

る細胞傷害性T細胞は、がん細胞内のがん抗原がペプチドに分解されてMHCクラスI上に提示されている状態を認識している。このがん抗原には、発がんの過程で生じた変異タンパク質由来のneo-antigenが含まれるが、個々の患者で異なっている。したがって個別化医療の領域になるが、neo-antigenに対する免疫応答の強化はきわめて有望な治療法であり、個々の患者で細胞傷害性T細胞を強化できるペプチドワクチンの探索研究が進んでいる。この抗原ペプチドにはMHCクラスI上に提示される能力が必須である。きわめて多様なペプチドと結合する能力があるMHCクラスIであるが、抗原性のあるペプチドと会合したときのみ正しくリフォールディングできるため、リフォールディングの成否でペプチドワク

チンのスクリーニングが可能となる⁷⁾ (図5)。このリフォールディングアッセイの場合は3者の複合体形成が必要なので、タンパク質濃度を比較的高濃度に保つ必要があり、「透析法」が採用されている。

最後に

タンパク質は高精細な仕事ができる「生もの」であり、変性しないように細心の注意を払って取り扱うことが生化学の常識である。しかしあまり崇拜して盲目的に扱っていると本質を見逃してしまうかもしれない。DIY（日曜大工）で家具を作ると家具の強度や耐久性のポイントがよくわかる。タンパク質のリフォールディングをやってみると、タンパク質構造の構築原理が見えてくる。

文 献

- 1) Hermanson, G. T.: *Bioconjugate Techniques*, 3rd Ed., p. 143, Academic Press (2013).
- 2) Netzer, W. J. and Hartl, F. U.: *Nature*, **388**, 343 (1997).
- 3) Anfinsen, C. B. and Haber, E.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 1361 (1961).
- 4) Futami, J. *et al.*: *J. Biochem.*, **127**, 435 (2000).
- 5) TAPS-Sulfonateユーザーガイド: http://www.katayamakagaku.co.jp/img/TAPS-sulfonate_model_protocol_3.6.pdf (2017/4/11)
- 6) Abe, M. *et al.*: *Protein Sci.*, **22**, 467 (2013).
- 7) Redenko, B. *et al.*: *Nat. Protoc.*, **1**, 1120 (2006).