

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26888016

研究課題名(和文) マイクロフロー化学を応用した含SS結合タンパク質の効率的フォールディング手法開発

研究課題名(英文) Development of an effective folding procedure for SS-containing proteins by using a micro flow chemistry

研究代表者

荒井 堅太 (Arai, Kenta)

東海大学・理学部・助教

研究者番号：60728062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：合成ポリペプチド鎖はジスルフィド(SS)形成およびSS異性化反応によって活性な天然構造へフォールドする必要がある。本研究では特殊な試薬を用いず、短い拡散距離による迅速な化学反応を実現するマイクロリアクター(MR)を用いることで、誰もが簡単にフォールディング反応を達成できるような簡易手法の開発を目指した。還元体リゾチームおよびグルタチオンの溶液を同時にMRへ流入しフォールディング反応を促したところ、バッチ条件よりも迅速に活性型リゾチームが再生した。同様の挙動は二本鎖インスリンのフォールディングにおいても観測された。MRを利用するだけで、酸化的フォールディングの効率化を実現した。

研究成果の概要(英文)：A chemically or biologically synthesized polypeptide needs to fold into the bioactive native form through random disulfide (SS) formation and SS isomerization. In this research, development of a facile methodology, which allows any scientists in various fields to achieve an effective folding, was attempted only by using a micro flow reactor (MR), which enables a rapid reaction due to the very short diffusion distances, without special organic reagents. When the each solution of reduced lysozyme as a model protein and glutathione was flowed into the MR at the same time, the bioactive lysozyme was gradually recovered. It is worth noting that the refolding velocity under a flow condition was faster than that under a batch condition. Similar folding behavior was observed for the folding of double-chain insulin coupled with inter-chain SS formation. In conclusion, the micro flow technology has enabled the effective oxidative folding reaction without a complicating methodology.

研究分野：生物物理化学

キーワード：フォールディング マイクロリアクター ジスルフィド フローケミストリー インスリン リゾチーム

1. 研究開始当初の背景

20 種のアミノ酸が連なった生体高分子であるタンパク質は、固有の天然立体構造 (N 体) を構築することで生理活性を発現する^[1]。このタンパク質の天然構造構築反応 (フォールディング) を人工的にコントロールし、迅速かつ効率的に行うことは、人工タンパク質の創生、ペプチド系新薬開発、ひいては医療技術の発展につながる重要課題である^[2]。システイン残基 (Cys, C) は側鎖にチオール (SH) 基をもち、隣接する 2 個の SH 基が酸化的に二量化し、ジスルフィド (SS) 結合を架橋することで N 体を安定化させる。SS 結合はアミノ酸配列上、常に決まった組み合わせで架橋されなくてはならず、でたらめに架橋された SS 結合は異性化により SS 結合位置を組み替える必要がある^[3]。反応容器内で行われるこのような酸化的フォールディングでは SS 結合形成反応 (Fig 1, Step A) と、掛け違った SS 結合の組み合わせを修正する SS 結合異性化反応 (Fig 1, Step B) をいかに効率化するか短時間・高収率フォールディングを実現する鍵である^[2]。

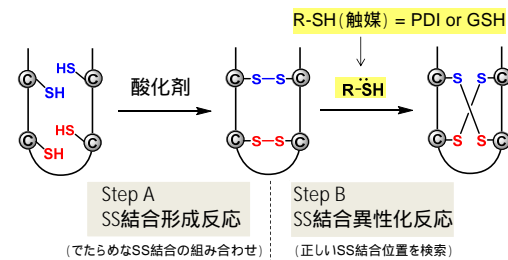


Fig 1. タンパク質の SS 結合形成反応 (Step A) と SS 結合異性化反応 (Step B)

2. 研究の目的

SS 結合形成反応 (Fig 1, Step A) と SS 結合異性化反応 (Fig 1, Step B) を促進する一つの戦略として、SH あるいは SS 系の酸化還元有機化合物の添加が最も一般的である^[2]。故に、試験管内フォールディング反応の効率化を図るには、新しい SH/SS 有機分子触媒の開発に主眼が置かれてきた。しかし、有機合成手法はタンパク質の効率的なフォールディング手法を最も欲する医学、生化学研究者にとってバリアが高く、簡便な効率化手法とは言い難い。そこで本研究では、マイクロフロー反応場 (マイクロリアクター、以下 MR) を利用することで、市販のごく一般的な SH/SS 試薬による SS 結合形成を物理的に加速させ、誰もが迅速かつ効率的にフォールディング反応を行う手法の確立を目指すことを目的とした。MR 系内では、分子や熱の移動距離が短いため分子間衝突頻度、熱伝導性が著しく、迅速な分子間反応を可能にするため、変性-還元型タンパク質と酸化剤が効率よく反応し、迅速かつ高収率で天然型タンパク質を得られるものと期待した。フォールディング研究における代表的なベンチマークタンパク質であるニワトリ卵白リゾチーム (HEL)

および A 鎖 (21 残基) と B 鎖 (30 残基) の二本のペプチド鎖が 2 つの分子間 SS 結合によって架橋された構造を持つインスリンをモデルタンパク質として以下のようなフローフォールディング実験を試みた。

3. 研究の方法

(1) 一本鎖タンパク質の酸化的フォールディング

還元処理によって SS 結合が開裂された変性-還元型 HEL は適切な酸化処理によって徐々に元の天然型 HEL にフォールドする^[4]。初めに市販の天然型 HEL を変性剤存在下、還元剤ジチオスレイトールで処理し、4 つの SS 結合を開裂した。脱塩後、凍結乾燥し、還元型 HEL (HEL-R) の白色粉末を得た。HEL-R の白色粉末は、市販の酸化還元剤 (グルタチオン: GSSG/GSH) を含む 20 mM 酢酸緩衝溶液 (pH 4.0) に溶解した (A 液)。フォールディング反応は Fig 2 のような MR 装置を組み、A 液および SH を活性化させるための弱塩基性 100 mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 8.0) (B 液) をシリンジポンプによって MR に同時に流入し、マイクロフロー系内にてそれぞれを混合することで反応を進行させた。流速を変えることで、流路内での反応時間を変動させた。反応停止剤として 0.1 M 塩酸使用駅を流路末端にて合流させ、最終的に得られた試料溶液の酵素活性測定を行い、HEL の活性回復率からフォールディング収率を見積もった。

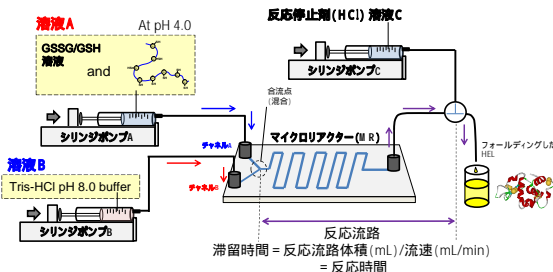


Fig 2. 還元変性リゾチームの酸化的フォールディング反応に対するフローセットアップ。

(2) インスリンの酸化的フォールディング

Fig 3 のような装置を組み立て、ウシ膵臓インスリンのフォールディングの迅速化を試みた。還元型インスリン A 鎖 (R^A) および B 鎖 (R^B) は以前の我々の手法によって調整した^[5]。反応条件 (温度、pH、濃度等) はバッチ法で最適化したものを適用させた^[6]。あらかじめ水溶性セレン含有酸化剤 (DHS^{ox})^[7] によって分子内で SS 結合を形成させた酸化型インスリン A 鎖の溶液 (A 液) と SS 結合をもたない還元型インスリン B 鎖の溶液 (B 液) をシリンジポンプ A および B によってそれぞれ押し出し、MR 内へ同時に流入させて反応を開始させた。流路末端から得られた反応溶液は SH 基ブロック試薬を添加することによって反応を停止させた。得られた試料溶液は逆相 HPLC によって分析し、天然型インスリンのピーク面積よりフォールディング

収率を見積もった。

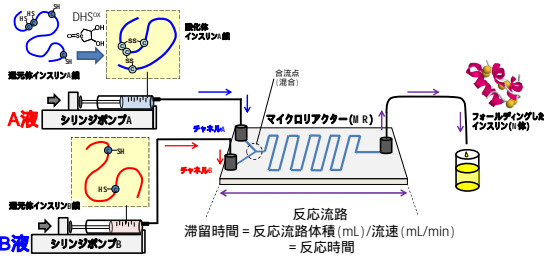


Fig 3. ウシ膵臓インスリンの酸化的フォールディング反応に対するフローセットアップ。

4. 研究成果

(1) マイクロリアクターを用いた一本鎖還元タンパク質のフォールディング

Fig 2. に従い、フロー反応装置をセットアップし、リゾチームの酸化的フォールディング反応を開始した。Fig 4 は一般的なバッチ法およびMR法で得られたフォールディング収率を反応時間に対してそれぞれプロットしたものである。MR法では反応溶液の流路内における滞留時間を反応時間として定義した。期待通り、MR法を用いることで、従来のバッチ法より反応速度を向上させることができた。これは、マイクロ流路において、タンパク質とGSSG/GSHの分子拡散速度が促進され、流路内における効率的なSH-SS分子間反応がなされたためであると考えられる。特筆すべきは、フォールディング速度の加速に特殊な酸化還元剤を利用してきた従来法に対して、本研究では、マイクロ反応場の特性を利用した単純な戦略であるという点である。またこの結果はMR法によるフォールディング反応の促進を実験的に示した初めての例である。現在、異なる一本鎖のモデルタンパク質に同様の手法を応用し、その汎用性を証明する実験を行っている。実験データがまとまり次第、学術論文誌に成果を発表する予定である。

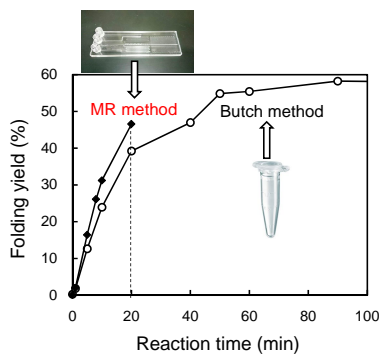


Fig 4. MR法および一般的なバッチ法によって得られたHELのフォールディング収率の反応時間に対するプロット。反応条件：[HEL] = 10 μM, [GSSG/GSH] = 0.4/4.0 mM, [urea] = 0.25 M, pH 7.14, and 37 °C.

(2) バッチ法による二本鎖インスリン類のフォールディング反応と条件の最適化

糖尿疾患の薬として知られるインスリンでは、構成ペプチド鎖、A鎖とB鎖を直接的な鎖間SS架橋によって達成することは極めて難しい。構成ペプチド鎖をそれぞれ1:1のモル比で混合し、リズナブルな収率で天然型インスリンを得ることができれば、安価なインスリン製剤の市場供給や新規人工インスリン製剤の合成などを可能にするものと考えられる。このようなコンセプトに基づいて、インスリンA鎖とB鎖の分子間SSカップリングをMRによって効率化できないかと考えた。

MRによってこの反応の効率化を図る前に、まず一般的なバッチ法による反応条件を最適化した。反応時間、温度、pH、ペプチド濃度、添加剤を最適化したところ、ウシ膵臓インスリンを最高収率37%、インスリンスーパーファミリーであるリラキシンを76%で得ることに成功した。この結果は、単純な鎖間SS架橋法では類を見ない高収率であり、我々の研究グループは本手法を天然の構成鎖をカップリングさせる新手法、Native Chain Coupling (NCC) 法と名付けた。インスリンのNCC経路 (Fig 6) も詳細に明らかにすることができ、NCCのさらなる効率化へ向けたヒントを多数得ている^[6]。一方で、バッチ法では反応の完結には長時間 (~7日間) 要するため、改善の余地が残された。

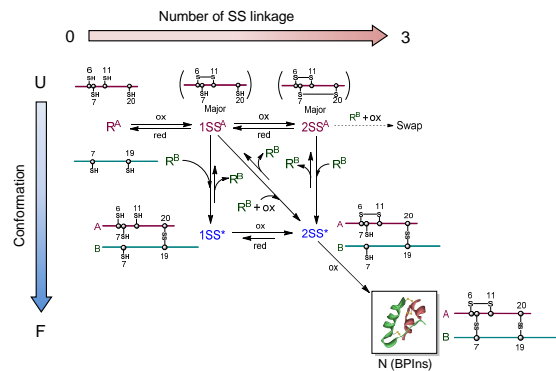


Fig 5. ウシ膵臓インスリンのNCC経路

(3) マイクロリアクターを二本鎖インスリン類タンパク質のフォールディング反応

Fig 4のような装置を組み立て、インスリンのフォールディングの迅速化を試みた。反応はバッチ条件で最適化したものを採用し、MR内に流入させて反応を開始させた。結果として、バッチ条件では最大7日間かかる反応がわずか数時間で30~40%の収率で天然型インスリンを与えることが明らかとなった。現在、より効率的なインスリンのフォールディング手法の開発を目指している。本来、このフォールディングは低温で反応が効率よく進行することがわかっているが、現在、フロー反応において低温条件を厳密に制御する環境が整っていない。これを克服することでさらに良好な結果が得られるものと考えられる。

(4) セレノインスリンの合成と NCC^[6]

インスリンの NCC 反応では分子間の SS 結合架橋が律速段階であり、MR 法を用いることでこの分子間カップリング過程を迅速化することができた。さらなる反応の促進と収率向上を目指して、分子間 SS 結合部位の Cys 残基をセレノシステイン (Sec) 残基に置き換えたセレノインスリン A 鎖および B 鎖を合成し、その NCC 反応を試みた。Sec は Cys の Se アナログであり、SH 基の代わりにセレノール (SeH) 基を有する。SeH 基の酸化還元電位 ($E = -383 \text{ mV}$) は SH 基のそれ ($E = -238 \text{ mV}$) よりも低いことから、SS 結合よりも優先的にジセレニド (SeSe) 結合が架橋される。そこで A 鎖および B 鎖の Cys^{A7} および Cys^{B7} をそれぞれ Sec 置換した Se アナログペプチドを化学合成し、律速となる分子間カップリングの加速を図った。結果として NCC 反応は、わずか数時間で完結し、そのフォールディング収率は単離収率 48% と良好であった。現在、セレノインスリンの MR を用いた NCC 反応を試みている。

(5) その他の本研究に関わる派生実験

タンパク質の SS 架橋に伴うフォールディング、すなわち酸化フォールディング反応の効率化を図るため、界面活性を有するセレン含有酸化剤を合成し、フォールディング反応へと応用した。この試薬がもつ長鎖アルキル基はタンパク質分子の疎水性表面と親和性を示すため、効率的なタンパク質分子内への SS 結合導入を可能にした^[8]。新規化合物の合成と HEL をモデルとした酸化フォールディング反応への応用例をまとめた論文が 2014 年度、学術論文誌に受理された。

今後 MR 法と当該化合物の相乗効果によりインスリンをはじめ様々な含 SS 結合タンパク質の酸化フォールディングのさらなる効率化を目指す。

(6) 総括

MR 法を用いた一本鎖 SS 結合含有タンパク質の効率化に成功したが、インスリンのフォールディング研究についてはさらなる反応条件の検討が必要であると考えられる。現在、前記したものとは異なる位置の Cys 残基を Sec 残基に置換した A 鎖および B 鎖を合成し分子間反応のさらなる効率化を図っている。MR 法とあわせ、より効率的なインスリンの NCC 法を提示できるものと期待している。

一本鎖の SS 結合含有タンパク質の MR 法を用いたフォールディング手法、およびバッチ法でのインスリンのフォールディング研究においては現時点ですでにインパクトの高い結果を得ている。現在、前者については現在、論文の投稿準備を進めており、後者については既に成果を論文雑誌へ投稿済みである。

< 引用文献 >

- Anfinsen, C. B., *Science*, **1973**, *181*, 223.
Yamaguchi, S., et al., *Biotechnol. J.*, **2013**, *8*, 17.
Rothwarf, D. M. and Scheraga, H. A., *Biochemistry*, **1993**, *32*, 2671.
K. Arai, et al, *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, *14*, 13194
K. Arai, et al., *FEBS Open Bio*, **2013**, *3*, 55.
K. Arai, et al., Native Chain Couplin: a facial protocol for insulin preparation, submitted.
K. Arai, et al., *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 481.
K. Arai, et al., *Chem. Asian J.*, **2014**, *9*, 3464.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Kenta Arai, Michio Iwaoka, Tetrahydroselenophene. A Unique Structural Motif for Biochemical Applications. *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20*, pp.155-165. (DOI: 10.2174/1385272819666150724233306)

査読あり

Kenta Arai, Fumio Kumakura, Motoi Takahira, Natsumi Sekiyama, Nozomi Kuroda, Toshiki Suzuki, Michio Iwaoka, Effects of Ring Size and Polar Functional Groups on the Glutathione Peroxidase-Like Antioxidant Activity of Water-Soluble Cyclic Selenides. *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, pp.5633-5642. (DOI: 10.1021/acs.joc.5b00544)

査読あり

Kenta Arai, Kenji Moriai, Akinobu Ogawa, Michio Iwaoka, An Amphiphilic Selenide Catalyst Behaves Like a Hybrid Mimic of Protein Disulfide Isomerase and Glutathione Peroxidase 7. *Chem. Asian J.*, **2014**, *9*, pp.3464-3471. (DOI: 10.1002/asia.201402726)

査読あり

[学会発表] (計 3 件)

Kenta Arai, Michio Iwaoka, SYNTHESIS OF WATER-SOLUBLE CYCLIC SELENIDES AND APPLICATION AS A GLUTATHIONE PEROXIDASE MIMIC, *The 11th International Conference on Heteroatom Chemistry*, **Jun. 2015**, Caen France (Oral presentation).

Kenta Arai, Michio Iwaoka, Synthesis and application of cyclic selenides having high-polar functional groups as ER-resident oxidoreductase models. *The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015*, **Dec. 2015**,

Hawaii USA (Oral presentation).
Kenta Arai, Michio Iwaoka, Modeling of ER-resident oxidoreductases by using a small molecule with tetrahydroselenophene skeleton, *6th International Conference on Metals in Genetics, Chemical Biology and Therapeutics*, **Feb. 2016**, Bangalore, India (Oral presentation, Invited lecture).

〔その他〕

ホームページ等

<http://k-arai4470.wix.com/tokai-arai-lab>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 堅太 (ARAI, Kenta)

東海大学・理学部化学科・助教

研究者番号：60728062