

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570108

研究課題名（和文） スルホベタイン類によるタンパク質凝集防止機構の解明と不安定タンパク質への応用

研究課題名（英文） Mechanism analysis of sulfobetaines' activity to prevent protein aggregation and application of sulfobetaines to unstable proteins

研究代表者

若松 馨 (WAKAMATSU KAORI)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40222426

研究成果の概要（和文）：

タンパク質の凝集は医薬品開発で深刻な問題を起こす。スルホベタイン類（以下SB類）はタンパク質の凝集を防ぐが、そのメカニズムは不明であった。今回、SB類はタンパク質のコンフォーマー間の変換速度を上げる事、ループの運動性を上げる事がわかった。また、タンパク質や条件によってはSBは不安定化する事、凝集防止と熱安定化とは直接関係ない事がわかった。抗体の保護や不安定タンパク質の精製に有用である事もわかった。

研究成果の概要（英文）：

Aggregation of proteins brings about severe problems in drug development. Although sulfobetaines have been known to prevent protein aggregation, its mechanisms have been elusive. Here we found that sulfobetaines accelerate inter-conformer exchange rates of proteins and increase flexibility of loops. In addition, sulfobetaines were found to make proteins unstable depending on the identity of proteins and buffer conditions. Prevention of protein aggregation by sulfobetaines did not correlate with enhancement of thermostability of proteins. Sulfobetaines were found to be useful for protecting antibodies and for efficient purification of unstable proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質、凝集防止、安定化、スルホベタイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Vuillardらは1分子内にN<sup>+</sup>とSO<sub>3</sub><sup>-</sup>からなるスルホベタイン基と小さい疎水性基を有するnon-detergent sulfobetaine (NDSB)を種々合成し、それがタンパク質の凝集を防止し安定化する事を示した（図1）。これらの

分子は疎水性が低く高濃度でもミセルを形成しない。

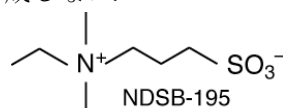


図1. NDSBの例

(2) スルホペタイン (以下 SB と略す) はタンパク質の三次構造を安定化するものの、立体構造に大きな違いが無いことを申請者は示していた。一方、タンパク質の遅い運動性に影響を与えるという予備的なデータを得ていた。

(3) 凝集には複数のステップがあると考えられているが、これらの凝集防止剤がどのステップにどのように作用しているのか等の凝集防止メカニズムは不明であった (図2)。それを解明する事によって、より効果的な凝集防止剤を開発する事も可能になると期待される。

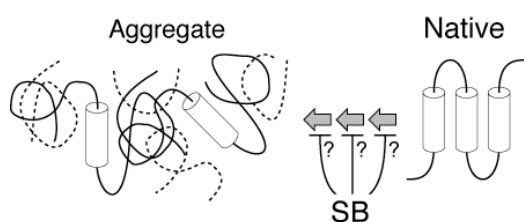


図2. SBによる凝集防止機構の解明

## 2. 研究の目的

(1) SBによるタンパク質安定化メカニズムを解明するために、SBがタンパク質の遅い運動 (コンフォーマー間の変換速度やループの運動性) にどのような影響を与えるのかを解析する。

(2) SBによるタンパク質安定化メカニズムを解明するために、SBがタンパク質の物理化学的性質に与える影響を解析する。

(3) SBは抗体などの実用的なタンパク質の安定化にも有効であるかを検証する。

(4) SBが不安定なタンパク質の調製に有効であるかを解析する。

## 3. 研究の方法

(1) タンパク質のコンフォーマー間の変換速度にSBが与える影響についてはNMRの $R_2$ -dispersion法で解析した。また、ループの運動性に与える影響については、温度と磁場強度を変化させたNMR測定で解析した。

(2) SBがタンパク質の熱変性温度 ( $T_m$ ) に及ぼす効果はDSCで、熱凝集温度 ( $T_a$ ) に及ぼす効果は濁度と光散乱で解析した。

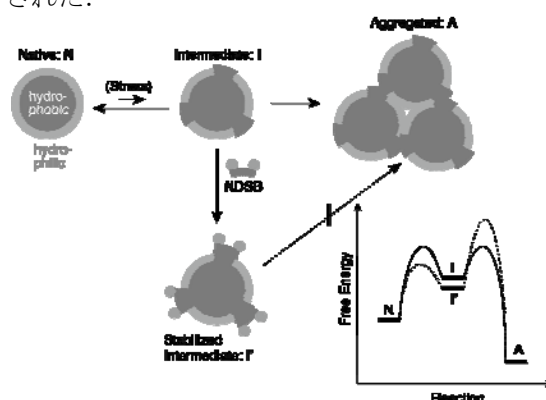
(3) SBによる抗体の安定化はSBの存在下/非存在下で凍結融解を繰り返した抗体サンプルを用いたELISAおよびDSCで評価した。

(4) SBによるタンパク質の調製の促進につい

ては、不安定なタンパク質で凝集しやすい酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF) を存在下/非存在下でIMACおよびゲル濾過で精製し、各ステップの収率で評価した。

## 4. 研究成果

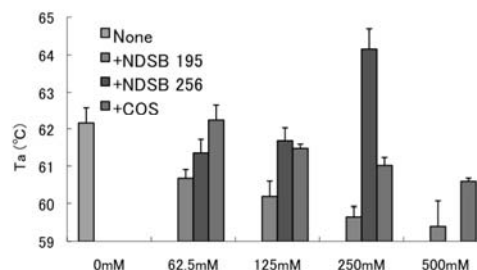
(1) KIX-87は生理的条件下でもnative, 変性中間, 変性状態の3つの状態の平衡にある珍しいタンパク質である。native  $\rightleftharpoons$  変性中間の交換速度とそれぞれの割合を $R_2$ -dispersion法で解析したところ、SBはnative  $\rightarrow$  変性中間, 変性中間  $\rightarrow$  nativeの両方の速度を増加させること、変性中間体の割合を上げることが分かった。このことから、SBは変性中間体を安定化することによって、それ以上の変性を防いでいる可能性が示唆された。



SBがループの運動性に及ぼす影響についてはユビキチンで解析した。SBは予想に反して、ループの運動性を高めていることが分かった。

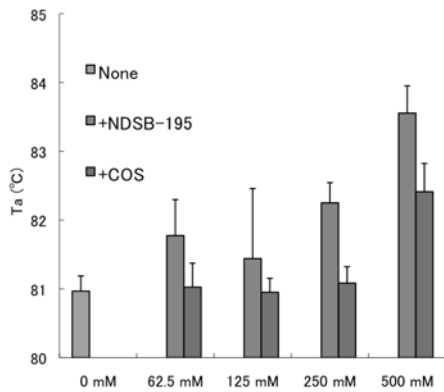
(2) SBは殆どのタンパク質の熱凝集温度を上げ、凝集を防止するが、アポミオグロビン (aMb) の凝集は促進する事 (pH 7 で) がわかった。

### aMb in Tris-HCl (pH 7.7)

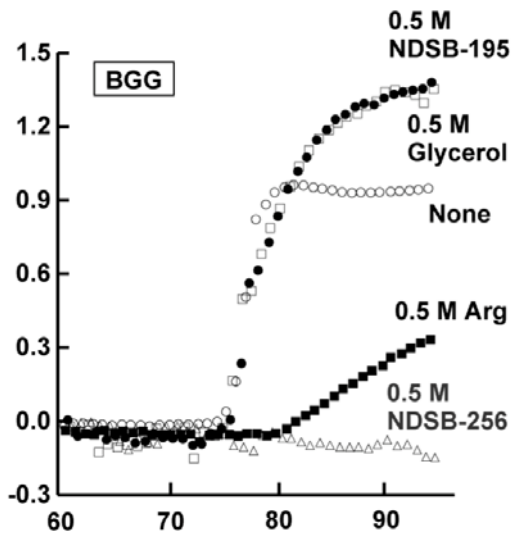


一方、同じaMbでもpHが異なると、SBは熱凝集温度を上げることがわかった。このことから、SBによるタンパク質の凝集防止は単純なメカニズムではないことが予想された。

### aMb in Acetate-NaOH (pH 3.9)

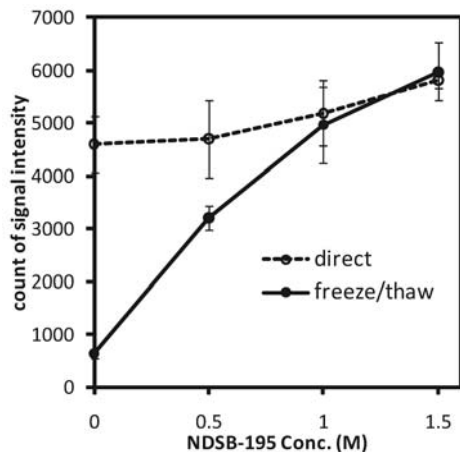


NDSB-256 はタンパク質の熱凝集を防止し、その効果は他のどの安定化剤よりも強かった。牛ガンマグロブリン (BGG) の例を示す。

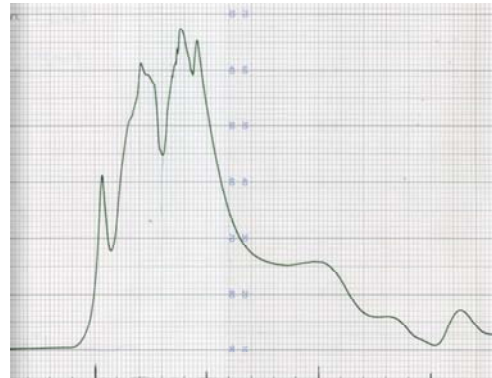


しかし、NDSBはBGGの熱変性温度を濃度依存的に低下させた。そこで、熱凝集の防止と熱安定化とは直接関連しないことが分かった。

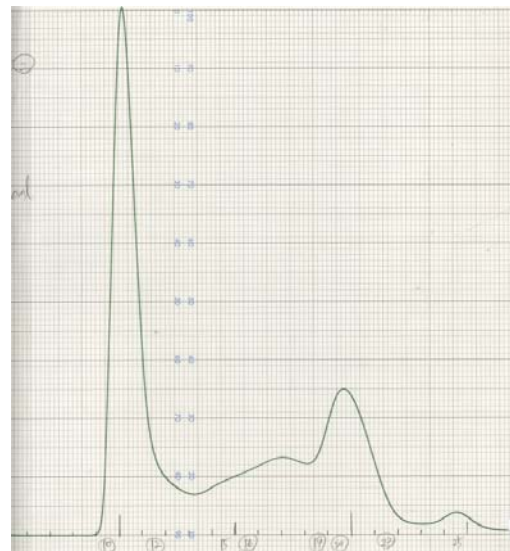
(3) NDSB-195 は抗体の凍結変性を防いだ。



(4) aFGF を SB 非存在下でゲル濾過にかけると下図のようにモノマーのピークがなく、殆どが凝集体として溶出した。



一方 SB 存在下ではモノマーのピークが明確に現れ、収率も10倍以上向上した。そこで、SB は不安定なタンパク質の精製に役立つ事が明らかになった。



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

① M. Hagihara, A. Takei, T. Ishii, F. Hayashi, K. Kubota, K. Wakamatsu, and N. Nameki, Inhibitory effects of choline-O-sulfate on amyloid formation of human islet amyloid polypeptide, FEBS Open Bio, 査読有, 2, 20-25 (2012).

② Y. Toyama, K. Miyamoto, K. Kubota, K. Wakamatsu, N. Nobukazu, T. Saheki, and M. Ochiai, Additive effects of betaines on

the fibrinogen cryogelation induced by low temperature. Trans. Materials Res. Soc. J., 査読有, 36, 393-396 (2011)

③ Y. Konno, Y. Kobayashi, K. Takahashi, E. Takahashi, S. Sakae, M. Wakitani, K. Yamano, T. Suzawal, K. Yano, T. Ohta, M. Koike, K. Wakamatsu, and S. Hosoi, Fucose content of monoclonal antibodies can be controlled by culture medium osmolality for high antibody-dependent cellular cytotoxicity, Cytotechnology, 査読有, online (26. Aug, 2011)

④ T. Yoshino, T. Ishikawa, T. Ishihara, Y. Takeuchi, H. Yoshikawa, H. Yoshida, H. Yoshida, and K. Wakamatsu, Evaluation of the aggregation states of monoclonal antibodies by diverse and complementary methods, Biol. Pharm. Bull., 査読有, 34, 1273-1278 (2011).

⑤ Y. Konno, M. Aoki, M. Takagishi, N. Sakai, M. Koike, K. Wakamatsu, and S. Hosoi, Enhancement of antibody production by the addition of Coenzyme-Q<sub>10</sub>. Cytotechnology, 査読有, 63, 163-170 (2011).

⑥ T. Ishikawa, T. Ito, R. Endo, K. Nakagawa, E. Sawa, and K. Wakamatsu, Influence of pH on Heat-Induced Aggregation and Degradation of Therapeutic Monoclonal Antibodies. Biol. Pharm. Bull., 査読有, 33, 1413-1417 (2010).

⑦ T. Nakagawa, T. Ishihara, H. Yoshida, T. Yoshida, K. Wakamatsu, and T. Kadoya, Relationship between human IgG structure and retention time in hydroxyapatite chromatography with sodium-chloride gradient elution, J. Sep. Sci., 査読有, 33, 2045-2051 (2010).

⑧ T. Ishikawa, N. Kobayashi, C. Osawa, E. Sawa, K. Wakamatsu, Prevention of stirring-induced microparticle formation in monoclonal antibody solutions, Biol. Pharm. Bull., 査読有, 33, 1043-1046 (2010).

⑨ T. Nakagawa, T. Ishihara, H. Yoshida, T. Yoneya, K. Wakamatsu, and T. Kadoya, Relationship between human IgG structure and retention time in hydroxyapatite chromatography with sodium-phosphate gradient elution. J. Sep. Sci., 査読有, 33,

37-45 (2010).

⑩ M. Tanio, K. Wakamatsu, and T. Kohno, Binding site of C-reactive protein on M-ficolin, Mol. Immunol., 査読有, 47, 215-221 (2009).

⑪ M. Kubota, T. Tanaka, T. Kohno, and K. Wakamatsu, GDP-GTP exchange processes of G·il protein are accelerated/decelerated depending on the type and the concentration of added detergents, J. Biochem., 査読有, 146, 875-880 (2009).

[学会発表] (計 20 件)

① K. Wakamatsu, H. Wang, M. Takahashi, K. Nakazawa, M. Yoshizawa, T. Demura, K. Hosoda, S. Terawaki, N. Nameki, K. Sugase, Stabilization of proteins by choline-O-sulfate during preparation and NMR measurement, The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, 2011.11.15, 横浜大さん橋ホール (神奈川県)

② 若松馨, 五十嵐麗樹, 金子敬輔, 高橋雅彦, 真井隆徳, 手塚福栄, 中沢和磨, 高橋玲羅, 王海梅, 石井毅, 細田和男, 寺脇慎一, 行木信一, 窪田健二, 各種NDSBがタンパク質の凝集防止と安定化に及ぼす効果, 第 84 回日本生化学会大会, 2011.09.21, 国立京都国際会館 (京都府)

③ M. Takahashi, K. Igarashi, K. Kaneko, E. Miura, H. Wang, T. Ishii, K. Kubota, K. Wakamatsu, Elucidation of the mechanisms whereby NDSBs protect proteins from denaturation and aggregation, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011.09.16, 兵庫県立大学書写キャンパス (兵庫県)

④ 若松馨, 王海梅, 五十嵐麗樹, 神谷歩, 高橋雅彦, 手塚福栄, 向隴, 石井毅, 細田和男, 行木信一, 菅瀬謙治, 蛋白質・ペプチドの溶液NMRへのスルホベタイン類の応用, 第 49 回NMR討論会, 2010.11.15, タワーホール船堀 (東京都)

⑤ 若松馨, 王海梅, 松井文香, 神谷歩, 加藤瀬里, 行木信一, 菅瀬謙治, NDSB類が蛋白質のタキナミクスに及ぼす効果, 第 48 回NMR討論会, 2009.11.10, 九州大学 (福岡県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://wakamatsu-lab.dept.eng.gunma-u.ac.jp/Wakamatsu-lab/Top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若松 馨 (WAKAMATSU KAORI)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40222426

### (2) 連携研究者

菅瀬 謙治 (SUGASE KENJI)

(財) サントリー生物有機科学研究所・主席研究員

研究者番号：00300822

### (3) 連携研究者

行木 信一 (NAMEKI NOBUKAZU)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80302959