

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19760549
 研究課題名(和文) コンビナトリアルアプローチによる人工シャペロン分子の開発とプロテオミクスへの応用
 研究課題名(英文) Development of artificial chaperone molecules by combinatorial approach for applications to proteomic researches
 研究代表者
 山口 哲志 (YAMAGUCHI SATOSHI)
 東京大学・大学院工学系研究科・助教
 研究者番号 80398106

研究成果の概要：リード化合物の構造を多様化した候補合成小分子ライブラリーを合成し、その中から水溶液に添加することによって蛋白質の構造形成をほとんど阻害せずに蛋白質の凝集を効果的に抑制できる分子を探索し、既存の蛋白質凝集抑制剤よりも蛋白質のリフォールディング収率を大幅に向上できる分子を開発することに成功した。また、合成小分子添加剤を添加することによって、SDS-PAGE 後のゲル内での酵素の再生速度と再生率が向上することも証明することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能バイオプロセス

キーワード：人工シャペロン、リフォールディング、コンビナトリアルアプローチ、プロテオミクス、凝集抑制剤、ゲル電気泳動

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質の機能・構造解析のために遺伝子をクローニングし、適当な宿主によって目的蛋白質を発現させた際に、目的蛋白質の凝集が起こり、研究が円滑に進まないことが多々ある。これは、蛋白質が変性・フォールディングする過程で、本来分子内部に埋もれているはずの疎水性ドメインが分子表面に露出し、強力な分子間疎水性相互作用によって凝集するためである。そこで、不可逆的な凝集を適切に抑制し、機能の発現を介助する

人工小分子(人工シャペロン小分子)を創成できれば、蛋白質科学の進展に大いに貢献できる。

(2) 蛋白質の凝集抑制剤は、国内外を問わず、昔から広く研究されてきた。しかし、ほとんどの凝集抑制剤が蛋白質を変性させたり、その機能をも阻害したりしてしまう。一方、アルギニン塩酸塩は、蛋白質を変性させること無く効果的に凝集を抑制するため、蛋白質の精製やリフォールディングプロセスに広く用いられている。しかし、アルギニン

塩酸塩の効果も、全ての蛋白質に対して万能では無いため、新しい人工シャペロン小分子の開発が望まれていた。また、その「蛋白質に優しい」凝集抑制のメカニズムは依然説明されていないため、どのような物性の小分子が適しているのか不明であり、合理的に人工シャペロン小分子を設計するのは不可能であるのが現状であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、コンビナトリアルアプローチによって、人工シャペロン小分子を開発することを目的とする。また、その開発の過程で得られた多様な合成小分子の機能や物性を詳細に評価することにより、人工シャペロン小分子に求められる分子構造やそれに伴う物性を明らかにし、その「蛋白質に優しい」凝集抑制メカニズムを解明する。

(2) 獲得した人工シャペロン小分子を用いて、ゲル電気泳動後のゲル中で蛋白質をリフォールディングする技術の開発にも挑戦する。人工シャペロン小分子を用いて蛋白質科学における技術的ブレークスルーを生み出すことを最終目的としている。

3. 研究の方法

(1) 合成小分子ライブラリー水溶液中で数種の変性蛋白質をリフォールディングし、蛋白質の構造形成は阻害せずに、凝集を効果的に抑制する小分子を探索した。また、それらの合成小分子水溶液の表面張力を測定し、蛋白質のリフォールディングに与える影響との相関も調べた。

(2) 人工シャペロン小分子を含むリフォールディング用緩衝液中にゲル電気泳動後のアクリルアミドゲルを浸漬し、電気泳動で単離した変性蛋白質のリフォールディングを行った。リフォールディングした蛋白質の生理活性を利用した染色により、ゲル内リフォールディングの評価を行った。

4. 研究成果

(1) 1-メチル-3-オクチルイミダゾリウム塩酸塩 (C_8MImCl) をリード化合物として、アルキル鎖や対アニオンの異なるジアルキルイミダゾリウム塩の小ライブラリーを調製し、凝集抑制剤としての効果を網羅的に調べた。変性リゾチームのリフォールディング収率を指標に、網羅的なスクリーニングを行った結果、アルキル鎖の短い5種類のメチルイミダゾリウム塩酸塩が、凝集体の形成を抑制し、リフォールディング収率を著しく向上させた (図1)。特に、濃度1Mの1-メチル-3-ブチルイミダゾリウム塩酸塩 (C_4MImCl) を添加した場合、無添加では5%以下しか得られないリフォールディング収率が84%まで向上した。




Yield (%)	Yield (%)
C_1MImCl : R= CH_3 36	C_8MImCl : R= C_8H_{17} 14
C_2MImCl : R= C_2H_5 77	$C_{12}MImCl$: R= $C_{12}H_{25}$ 15
C_3MImCl : R= C_3H_7 74	isoButylMImCl: R=  73
C_4MImCl : R= C_4H_9 84	ButenylMImCl: R=  32
C_5MImCl : R= C_5H_{11} 70	BenzylMImCl: R=  3.6
C_6MImCl : R= C_6H_{13} 9.7	
C_7MImCl : R= C_7H_{15} 8.3	

図1 各種小分子添加剤を含む水溶液中での変性リゾチームの最大リフォールディング収率

(2) 上記のジアルキルイミダゾリウム塩群の作用機序をより詳細に理解するために、速度論的解析を試みた (図2)。各条件下で、酵素活性の時間変化を測定し、凝集速度がリゾチーム濃度の3乗に比例するというモデルに従って、実験データにモデル式をフィッティングし、フォールディング速度定数 (k_N) と凝集速度定数 (k_A) を得た。その結果、収率を著しく向上させる短鎖アルキルを有する塩は、長いアルキル鎖を有する塩よりも凝集速度を大きく低下させる一方、フォールディング速度への影響は比較的小さいことが分かった。また、中程度の疎水性側鎖を有する有機塩は、最も凝集抑制能が低く、フォールディング速度への影響も大きいため、不適当であることも分かった。

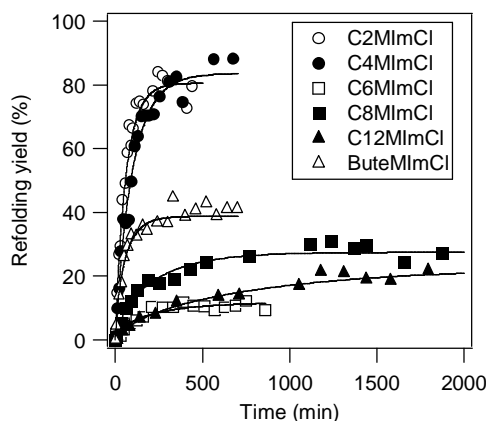


図2 各小分子添加剤水溶液中での変性リゾチームのリフォールディング収率の時間変化

(3) リード化合物のカチオン性親水性部位を、イミダゾリウムやピリジニウム、ピロリジニウムと変化させ、これまでのアルキル鎖部位や対アニオン部位と組み合わせ、ライブラリーの拡張を行った。この合成分子群の蛋白質への影響を網羅的に調べた結果、適度な疎水性部位を有する高水溶性の有機カチオンが、蛋白質の構造形成をほとんど阻害せずに効果的に凝集を抑制することがで

きた。また、これらの合成分子群の水溶液の表面張力を測定したところ、添加によって比較的小さく表面張力を低下させる塩が、人工シャペロン分子に適していることが分かった。

以上のように、構造を系統的に変化させた小分子ライブラリーを作製し、その水溶液中での蛋白質の凝集反応とリフォールディング反応とを詳細に調べた。その結果、モデル蛋白質のリフォールディング収率を劇的に向上させられる「人工シャペロン分子群」が得られた。また、非常に水溶性が高く、表面張力を少しだけ低下させるような小分子が、蛋白質の構造形成をあまり阻害せずに、凝集を抑制できることが、現象論的ではあるが、明らかになった。今後、サイトカインや抗体などの実用的な蛋白質の生産性を向上させる人工シャペロン小分子を開発する際に、本研究で試みたアプローチは有効であることを示すことが出来、また、このようなアプローチを行う際に有用な基礎データが多く蓄積できたとと言える。

(4) SDS-ゲル電気泳動は、蛋白質を分離するための最も簡便な方法である。しかし、ゲル内で分離された蛋白質は、SDSと複合体化した変性体であり、活性を有さない。従って、分離した蛋白質個々の機能を評価するには、ゲル内での再生が必要である。そこで、合成小分子を用いて、ゲル内での再生を促進する方法の開発を試みた。

モデル蛋白質として α -glucosidase (Glu)のSDS-PAGEを行った後、SDSの包接化合物である β -cyclodextrin (β -CD)を含む再生緩衝液中にゲルを30分間浸漬させて、再生した。

ゲル内再生および活性染色の結果、再生用緩衝液中に β -CDを添加した場合のみ、ゲル上のGluのバンド位置に、基質の分解産物に由来する黄色バンドが確認された(図3)。これより、 β -CDの添加により、SDS-PAGE後のゲル内再生率が大きく向上することが示された。

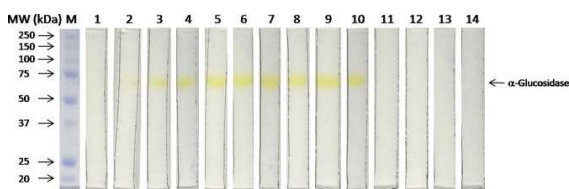


図3 SDS-PAGE後のゲル内酵素再生を行ったゲルの活性染色結果。レーン1: β -CD無し、レーン2~10: 0.01~1.5% β -CD有り。

このように、合成小分子を添加しゲル中でのリフォールディング収率を高めることによって、これまでSDS-PAGE後の活性染色で検出できなかった酵素も、検出できるようになることが示唆された。今後、このようなゲ

ル内リフォールディング促進法は、細胞ライセートの網羅的な解析や、全蛋白質からの有用蛋白質のスクリーニングなどに幅広く応用可能であると考えられる。

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 2件)

Yamaguchi S., Yamamoto E., Tsukiji S., Nagamune T. "Successful Control of the Aggregation and Folding Rates during Refolding of Denatured Lysozyme by adding N-Methylimidazolium Cations with Various N'-Substituents.", *Biotechnology Progress*, **24**, 402-408 (2008). 査読有

Yamamoto E., Yamaguchi S., Nagamune T. "Effect of β -cyclodextrin on the renaturation of enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.", *Analytical Biochemistry*, **381**, 273-275 (2008). 査読有

[学会発表](計 10件)

山本悦司, 山口哲志, 長棟輝行 「人工シャペロン法を用いた新しいバイオテクノロジー:ゲルおよびマイクロ流路中での酵素再生」, 化学工学会第74年会, 横浜, 横浜国立大学, 3月21日2009年

S. Yamaguchi, "Development of Small Molecular Artificial Chaperone for Protein Refolding and Artificial Chaperone-Assisted Proteomics Technology.", International Symposium on Molecular and System Life Sciences, Kobe, December 11, 2008.

山口哲志 「蛋白質凝集を抑制する小分子添加剤の開発と応用」, 第11回生命化学研究会, 水上, 11月28日2008年

S. Yamaguchi, E. Yamamoto, T. Nagamune. "Development of Artificial Chaperone Small Molecules for Protein Refolding.", NanoBio-Seoul 2008, Seoul, Korea, October 31, 2008.

山本悦司, 山口哲志, 長棟輝行 「人工シャペロン法を用いたSDS-PAGE後のゲル内酵素再生」, 化学工学会第40回秋季大会, 仙台, 東北大学, 9月25日2008年

山本悦司, 山口哲志, 長棟輝行 「SDS-PAGE後のゲル内酵素再生における β -cyclodextrinの効果」, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 横浜, 東京工業大学, 9月20日2008年

山口哲志 「蛋白質リフォールディングのための人工シャペロン小分子の開発」, 第

18回バイオ・高分子シンポジウム，東京，上智大学，7月26日2008年

山本悦司，山口哲志，長棟輝行 「タンパク質リフォールディング用添加剤としてのイオン液体」化学工学会第73年会 浜松，静岡大学，3月19日2008年

S. Yamaguchi, E. Yamamoto, T. Nagamune. "Successful Control of the Aggregation and Folding Rates during Refolding of Denatured Lysozyme by adding N-Methylimidazolium Cations with Various N¹-Substituents.", The 13th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC 2007), Seoul, Korea, October 21, 2007.

S. Yamaguchi, "Artificial Chaperone Molecules and Matrices for Controlling the Folding and Aggregation of Refolding Intermediates.", YONSEI U-U of TOKYO Joint Symposium, Seoul, Korea, August 8, 2007.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 哲志 (YAMAGUCHI SATOSHI)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：80398106

(2)研究分担者

(3)連携研究者