

タンパク質再生技術

1. はじめに

遺伝子組換え技術により、ヒトを始めとする様々な生物種由来の有用タンパク質を大腸菌等の微生物を宿主として大量に生産することが可能となって久しい。しかしながら、大腸菌内で発現させたタンパク質は、不溶性かつ不活性な凝集体 (inclusion body: 封入体) となる場合が多く (一説には封入体を形成する確率は75%にも達するといわれている)、タンパク質の大量発現における最大の問題となっている。この問題を解決し、活性のあるタンパク質の大量調製を可能とすべく20年来様々な試みがなされて来た。代表的な手法として、以下のものがある。

1) 分子シャペロンとの共発現

通常、細胞内で翻訳されたタンパク質は分子シャペロン (後述) と呼ばれる介添え役のタンパク質の助けを借りて正しい立体構造を形成する。組換えタンパク質の大量調整時においては、この分子シャペロンが不足することが封入体形成の一因と考えられ、そこで分子シャペロンも同時に大量発現させてこれを補う。

2) 発現宿主の検討

最も一般的な宿主である大腸菌の代わりに酵母、昆虫や動物の培養細胞、カイコなどに目的タンパク質を生産させる。

3) 試験管内でのタンパク質生産

遺伝子の転写から翻訳までの全てを試験管内で行う。ウサギの網状赤血球系、コムギ胚芽系などが知られており、キットとして販売もされている。

一方、現時点でも大腸菌による発現系は、最も安価で簡便な生産系であると考えられている上、形成された封入体自身は90%以上の純度で目的タンパク質を含有し、プロテアーゼによる分解からも保護されているため精製そのものは容易であるという利点がある。こうした点を踏まえて、封入体から活性のあるタンパク質を効率的に得ることを可能にする技術はないか? という観点からの研究も展開されてきた。これは正しい高次構造を取れずに封入体を形成したタンパク質の間違った構造を解きほぐした (アンフォールディング) 後、正しい高次構造に巻き戻す (リフォールディング) ことを目指した “タンパク質再生技術” の確立を目的とした一連の研究であり、英語のカタカナ書きであるリフォールディングという言い方が最も一般的に使用されている。筆者らもこのリフォールディングの観点からタンパク質再生技術の開発に取り組み2000年末に基本的な技術 (以下CA法と呼ぶ) の確立に成功すると共に、2001年秋にはタカラバイオ株式会社からキット販売に至るなど実用化にも成功した。そこで本稿では、CA法開発に至る経緯、

その内容、並びに今後の展開に関して解説する。

2. 従来のリフォールディング手法

開発した手法の特徴を明確にするため、最初に従来法に関して簡単に整理しておく。いずれの手法も、第一段階は、封入体を形成したタンパク質の間違った構造を完全に解きほぐす（アンフォールディング）段階を経る。通常、塩酸グアニジン、もしくは尿素のような変性剤が使用される。さらに、間違ったジスルフィド結合もこの段階で完全に還元しておく必要があるため、このアンフォールディングにはジチオスレイトールなどの還元剤が添加される。この段階に続いて実際のリフォールディングの過程に入っていく訳であるが、最も一般的な手法が稀釈透析法¹⁾である。これはアンフォールディングに用いた塩酸グアニジンなどの変性剤を徐々に低下させることにより（この徐々に！がポイント）タンパク質の高次構造形成を促す手法である。目的タンパク質は、変性剤の存在により可溶化状態を維持しているため、この方法では変性剤濃度の低下に伴いタンパク質の再凝集が生じることが多く効率的な手法とは言い難い。しかし、中にはこの方法で比較的容易にリフォールディングするタンパク質も存在し、最も初期の頃から試みられている手法である。さらに、単に稀釈するのみではなく、少しでもリフォールディング効率をあげるべく、アンフォールディング後のタンパク質の一端を固相上に固定し、変性剤の濃度を徐々に低下させていくなどの改良がなされてきた（Refolding on Resin）。また稀釈透析の過程で生じる凝集体の問題を解決する目的で、各種の添加剤を加える手法も報告されており、Dilution additive methods²⁾と呼ばれている。添加剤としてよく知られているものとして、アルギニン、ポリエチレングリコール、界面活性剤などがある。特に近年では、アルギニン添加により良好な結果を得たとの報告が多い。

これら従来法のいずれもが成功例として報告されつつも、決め手となる手法とはなり得なかったわけだが、その問題点を整理すると以下ようになる。

- 1) 複雑な操作が必要である（多数のサンプルの処理が困難）。
- 2) 操作に時間がかかる（数日間かけて変性剤を徐々に稀釈する場合もある）。
- 3) リフォールディング効率が低い。
- 4) 汎用性に欠ける（対象タンパク質毎に適した条件を検討する必要がある）。

3. “人工シャペロン” というアイデア

1990年代後半よりアンフォールディングに用いた変性剤を単に稀釈するだけでなく、変性剤の稀釈に伴うタンパク質分子の凝集を防ぎ、さらにリフォールディングを促すような化合物を添加する手法が検討され始めた。細胞内で翻訳完了直後の新生タンパク質は、分子シャペロンと呼ばれる一連のタンパク質分子の助けにより不規則な凝集体の形成を免れた後、次の段階で正しい高次構造形成を促

される。この一連の過程を試験管内で再構成することを目指した手法であることから、用いられる化合物を試験管内で機能する分子シャペロンと見なし、“人工シャペロン”という用語も使用されている³⁾。筆者らが開発したCA法も、この人工シャペロンによるフォールディング過程の再構成という視点に基づいたものである。人工シャペロンとして注目されている物質として、筆者らが着目した環状糖質以外にも、リボソーム固定化担体⁴⁾、両親媒性ポリマー分子集合体（ナノゲル）⁵⁾、熱応答性ブロックコポリマー分子集合体⁶⁾などが上げられる。いずれの手法もリフォールディング実験に汎用されてモデルタンパク質に対しては一定の効果をあげており、今後の封入体への適用などの発展が期待されている。そうした中で、重合度17~数百におよぶ大環状-1,4-グルカン（高重合度シクロアミロース：CA）を利用したCA法は研究用試薬としてキット化されすでに販売が開始されており、多くの研究者の評価や批判を基に改良を重ねるべき段階に達している⁷⁾。

4. “人工シャペロン”によるリフォールディングの原理

筆者らが開発したCA法は、大腸菌内で新生タンパク質が正しい立体構造を形成していく過程を非常に単純化して捉え、その過程を模倣し試験管内で再構築したものである。大腸菌細胞内のタンパク質濃度は20%程度といわれており、かなり混み合った状態である。さらに、翻訳直後の新生タンパク質は高次構造を形成していないため極めて凝集し易い状態であるため、お互いの凝集を如何に防ぐか、また立体構造を形成していないタンパク質はプロテアーゼの攻撃を受け易いのでプロテアーゼによる分解から如何に身を守るかが極めて重要である。ここで機能するのが分子シャペロンである。シャペロンとは、社交界にデビューしたての令嬢の付き添い役の意味であるが上手いネーミングである。細胞内において新生タンパク質は、まず上流で働く分子シャペロンであるDnaJ, DnaKタンパク質、などに補足され凝集から保護される。さらに下流に働く分子シャペロンであるGroEL/ESタンパク質により正しい立体構造へとフォールディングされ、機能を有するタンパク質へと成熟する（図1）。CA法の開発は、この細胞内の過程をタンパク質の凝集を防ぐ段階、タンパク質のフォールディングを促す段階の2段階に単純化し、各々の段階において機能しえる人工シャペロンを検索することから始まった。第一段階に機能する人工シャペロン候補として界面活性剤を、第二段階に機能する人工シャペロン候補として環状糖質（界面活性剤を取り込むであろう包接能力に期待）に着目し、最適な人工シャペロンの検索を進めた。

結果的に確立されたCA法は、以下の3つの反応から成る（図2）。

- 1) 封入体を形成しているタンパク質の間違った高次構造をアンフォールディングする。間違った構造を完全に解きほぐす目的から、6M（最終濃度）の塩酸グアニジンを使用する。アンフォールディングされたタンパク質は細胞内におけるタンパク質のフォールディング過程を模倣した次の2過程によ

・細胞内でのタンパク質フォールディング過程を模倣し、試験管内で再構成する

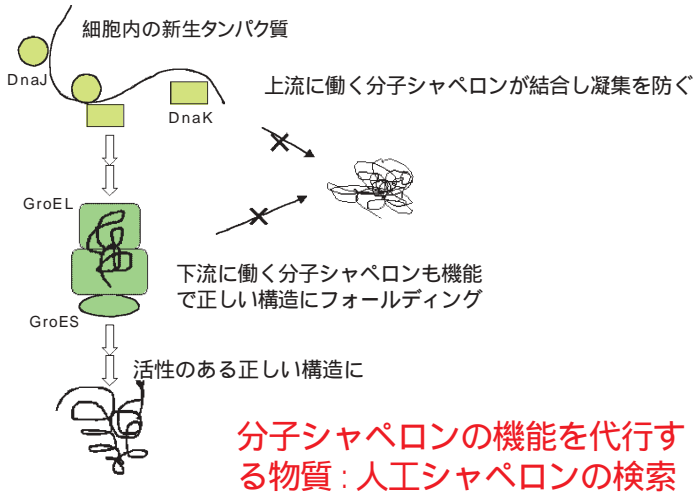


図1 大腸菌細胞内におけるタンパク質のフォールディング過程と本技術との関連

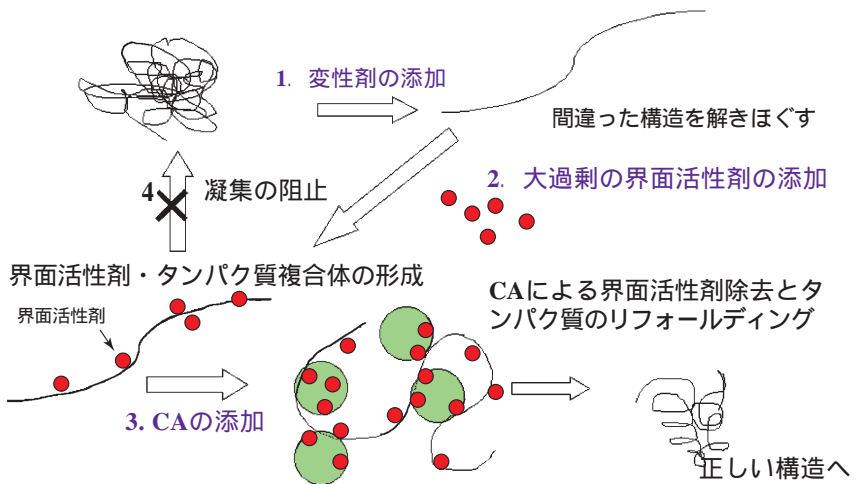


図2 CA法によるタンパク質リフォールディング過程

リフォールディングされる。

- 2) 変性剤を除去（稀釈）する段階．変性剤の稀釈に伴うタンパク質分子の不規則な凝集の阻止が問題となる．この問題は，大過剰の界面活性剤溶液を添加することにより解決された．タンパク質分子に応じた適切な界面活性剤の選択が重要となる．タンパク質は界面活性剤と複合体を形成することにより，再び不規則な凝集体を形成することから逃れる．
- 3) タンパク質・界面活性剤複合体から界面活性剤を剥離し，タンパク質の正しい高次構造形成と活性の回復を促す過程．この最終過程において大環状-1,4-グルカンであるCAの包接能が極めて効果的に機能することが明らかとなった．CAの包接能，つまり糖のリングの機能が本手法のポイントである．

5．重合度シクロアミロースの人工シャペロンとしての機能

環状-1,4-グルカンとして，シクロデキストリン（以下CDと省略）が良く知られているが，最初にCDの包接能の人工シャペロンとしての可能性に着眼したのが Gellmanらである⁸⁾．彼らは，TritonX-100（界面活性剤）と-CD（重合度7）を組み合わせることで，従来リフォールドが困難な酵素として知られていた変性クエン酸シンターゼ（CitSynと省略）の活性を65%まで回復させることに成功した．これは従来法による活性回復率（通常40%以下）から判断するとかなりの高率である．しかしながら，-CDは溶解性が低く，包接能に寄与する疎水性空洞の大きさに制約があるなどの問題がある（図3）．

-CDのような従来型の環状グルカンに対して，重合度が17～数百におよぶ高

Cyclodextrin : CD

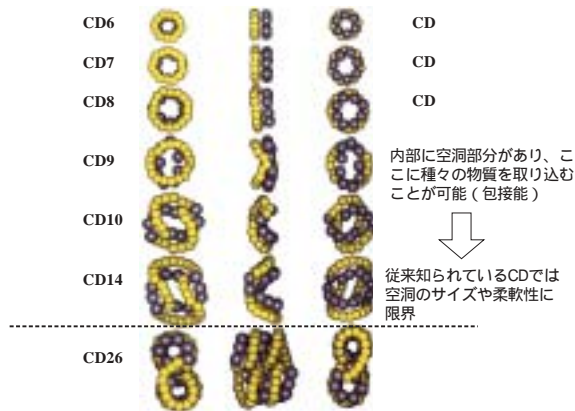
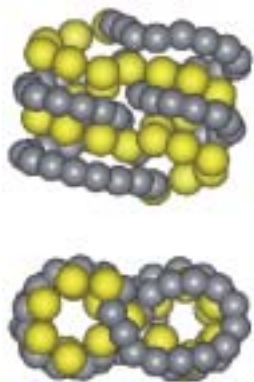


図3 CDの構造

CA :高重合度シクロアミロース



17～数百のグルコースが
環状につながった新規糖質

江崎グリコ(株)生物化学研究所
が合成に成功

内部に空洞部分があり、
ここに種々の物質を取り込む
ことが可能(包接能)

図4 重合度26のCAの結晶構造

重合度シクロアミロース(CA)の合成に江崎グリコ(株)生物化学研究所が最近成功した⁹⁾。CAは、疎水性部位の構造が柔軟性に富んでいることが予想され(図4)、種々の無機、有機化合物と包接体を形成可能なことが期待される。タンパク質の再凝集を防ぐ目的では、対象タンパク質に応じて様々な界面活性剤が選択されるため、その構造にかかわらず良好な包接能を示すことが汎用性の高い技術開発につながると考えられる。実際にCAは、長いアルキル基をもつ界面活性剤の包接が可能である。複数の封入体に対して良好な結果を与える界面活性剤である臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)もアルキル基の長さはC16であり、その他有望な界面活性剤もC16、C18のものが多い(後述)。また、重合度26のCAに関しては、その結晶構造が明らかにされ、界面活性剤であるSDSを包接する様子をシミュレーションした結果も示されている。さらにCAは、実験に供するのに十分な溶解度を有している。筆者らは、このCAの性質が人工シャペロンとして優れていることに着目し、新たな人工シャペロン系の構築を試み、キットの原型となる手法の確立¹⁰⁾に至った。

6. CA法開発に関するデータ

CA法を開発するにあたり、異なった特徴を有する3種類のタンパク質をモデルタンパク質として選定し検討を行った。CitSyn(分子量49,000/モノマーのダイマー酵素、主たる構造をヘリックス)、炭酸脱炭酸酵素B(CABと省略、分子量30,000のZn酵素、主たる構造はシート)、およびリゾチーム(分子量15,000、4

つの分子内S-S結合を有する)である。これらの酵素は構造上の共通点が無く、いずれも自然にリフォールディングする可能性が低く、さらにリフォールディング効率の評価(変性前の活性を100%とした場合の活性回復で評価)が容易という観点から選択された。これらのリフォールディング結果を示すと共に、手法の詳細について解説する。

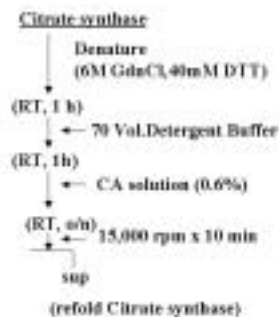
1) オリゴマー酵素への適用

CitSynは、従来からリフォールディングの困難な酵素として、リフォールディング手法検討のための材料として用いられていたが、最大の特徴はダイマー酵素という点である。最終濃度6Mの塩酸グアニジンにより1時間処理し完全にアンフォールディングした後、30種類以上の界面活性剤とCAもしくはCDの組み合わせによるリフォールディング効率を検討した。その結果、非イオン性界面活性剤であるTween40, Tween60(最終濃度0.05%)と1時間反応させタンパク質・界面活性剤複合体を形成させた後、CA(最終濃0.6%)の包接能により複合体から界面活性剤を剥離させると共に高次構造形成を促したところ、100%近い活性を回復させることに成功した(表)。さらにリフォールディングに要する時間に注目した場合、CA添加後1時間以内に活性がほぼ完全に回復していた(図5)。これは、変性剤処理による最初の反応から始まる全反応が半日以内で完了可能なことを意味している。

表I.Citrate Synthaseのリフォールディング効率

イオン性界面活性剤	CA(%)	CA(%)
CTAB	30.2	9.8
SDB 34	0	0.0
非イオン性界面活性剤		
CaE2		
CHIF8	0	25.0
CHIF9	0	35.7
CHIF10	0	26.4
Dq 52	0	36.7
Lauryl PS	15.7	0
CaFE2		
Triton X-100	2.9	3.0
Ca surfact E2		
Tween 20	76.5	54.0
Tween 40	100	100
Tween 60	100	100
Tween 80	81.6	95.7
Tween 81	19.2	11.0

CA(%)=重合前(2-4%)、CA(%)=重合後(4%以上)
活性回復率は以上の数値のあったもののみ記載



リフォールディング効率(活性の回復で評価)
変性前の活性を100%とした。

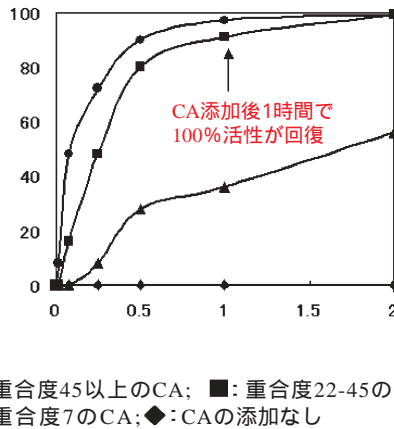


図5 CAによるCitrate synthaseの活性回復の経時変化
最終濃度で0.6%のCAを添加し、一定時間毎に活性の回復を測定した。

2) 金属酵素への適用

炭酸脱炭酸酵素B (CAB) はアンフォールディングされにくい酵素であるため、塩酸グアニジンとの反応時間は16時間とした。他の実験方法は、CitSynと同様である。しかしながら、有効な界面活性剤の種類に、大きな違いが見られた。非イオン系界面活性剤にほとんど効果が見られないのに対して、イオン系界面活性剤であるCTAB, SB3-14を用いた際に90%の高率でリフォールディングが達成された。

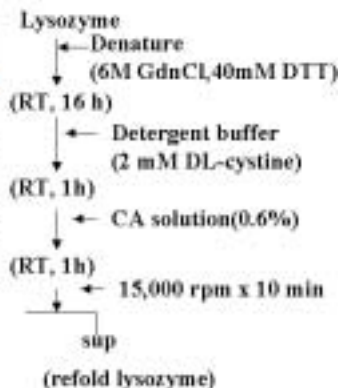
3) 分子内ジスルフィド結合を有する酵素への適用

構造・機能研究や産業上の利用のために必要とされている多くのタンパク質は、ジスルフィド結合を含むものである。しかしながら正確なジスルフィド結合の再生は容易ではない。この目的に適用可能な手法とするため、リゾチームを還元条件下(4 mM DTTを含む6 M塩酸グアニジン)で16時間処理しS-S結合を切断した後、リフォールディング可能を検討した。CAB同様にCTAB, もしくはSB3-14溶液にDL-システインを添加することにより、極めて高率な活性回復が観察された(表)。この結果からCAによるリフォールディング手法は、正しいS-S結合の形成にも適用可能な手法であることが示唆された。

表II.還元条件下で変性したLysozymeの
リフォールディング効率

	CA(S)	CA(L)
CTAB	48.9	91.9%
SB 3-14	50.3	85.2
SB 12	34.8	42.4
N-ethyltrimethyl ammonium bromide	48.7	66.7
Hexadecyltrimethyl ethyl ammonium bromide	58.0	77.2
Hexadecylpyridium chloride monohydrate	49.9	39.2
Dodecyltrimethyl ammonium bromide	35.4	14.6

リフォールディング効率: 活性の回復で評価
変性前の活性を100%とした。活性回復10%以上の効果のあるもののみ記載



7. 封入体への適用に際して

実際にCA法により封入体からタンパク質をリフォールディングする際に注意すべき点についても情報が蓄積されつつある。封入体からのリフォールディング条件決定のためのプロトコールは、図6に示した通りであり、条件決定後のスケールアップは十分可能である。

各段階ごとの注意点を記載していくと以下ようになる。

1) 先ずリフォールディングに供するタンパク質濃度であるが、封入体懸濁液を調製し、Lowryの変法により定量して、25~30mg/mlの濃度が上限であると思われる。懸濁液であるので不正確ではあるが、筆者らは必ずタンパク質濃度は定量している。収率を落とさないためのタンパク質濃度上限の簡便な目安としては、塩酸グアニジン（最終濃度6M）による変性タンパク質溶液が十分な流動性を確保していることである（A280を測定した場合、25が限界?）。変性剤により間違った高次構造を完全にアンフォールディングしておくことは、リフォールディング効率を上げるために必須である。従って、変性時間は標準で1時間としているが、場合によっては1晩以上変性処理を行っている。また、誤ったS-S結合はこの段階で還元しておくことが必須であるので、40mM（最終濃度）DTTを同時に添加する。

2) 次に界面活性剤の添加であるが、効果が期待される界面活性剤の代表的なものとして、筆者らの研究室では4種類の界面活性剤による事前検討を行っている。すなわちイオン系界面活性剤であるTween 40, Tween 60, 非イオン系界

<p><u>8 μl 封入体懸濁液</u></p> <p>25 μl of 8M塩酸グアニジン (最終濃度: 6M) 0.3 μl of 4M DTT (最終濃度 40 mM) (室温, 1時間) (場合によっては一晩)</p> <p>8 μl 変性タンパク質溶液 560 μl of 界面活性剤溶液(最初の検討は0.1%) (含 2mM DL-cystine) (室温, 1 時間)</p> <p>142 μl of 3 % CA溶液(最終濃度0.6%) (室温, 1時間以上) 遠心(15,000rpm \times 5 min)</p> <p><u>上清</u> (リフォールディング溶液)</p>

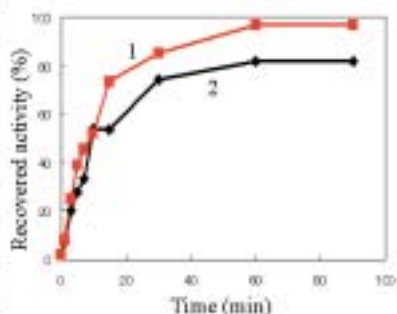
図6 封入体からのリフォールディング条件決定のためのプロトコール

面活性剤であるCTAB, SB3-14である。殆どの場合、添加濃度0.05~0.12% (通常, 0.1%の濃度で最適な界面活性剤の種類を決定)の範囲に至適濃度がある。0.15%を超えるとリフォールディング効率は顕著に低下する。変性溶液に対して70倍容量の界面活性剤溶液を添加するが、転倒混和により素早く混合した後、室温で1時間静置する。いずれの界面活性剤でも良好な結果が得られる場合は、品質(界面活性剤は、そのポリオキシエチレン鎖やアルキル基の長さの不均一性など、品質は一定しない。メーカーによる品質の差も大きいので注意を要する)、安定性、リフォールディング後の扱い易いさを考慮して、CTAB, ないしはSB3-14を選択することを薦める。また、正しい位置でのS-S結合形成を促すためにDL-システンを添加している。S-S結合再生の手法として、チオールジスルフィド酸化還元緩衝液(酸化型グルタチオン:GSSGと還元型グルタチオン:GSHを加えた緩衝液)がよく使用されている¹⁰⁾。DL-システンの代わりに様々な比率のGSH/GSSGを添加し、比較検討を行ったところ、安価なDL-システんで十分にリフォールディングされることが示された(表)。

- 3)最後に3%CA溶液を添加し(最終濃度0.6%),さらに室温で1時間静置する。この段階で、CAが界面活性剤を包接した不溶性の包接化合物を形成し白色沈殿を生じる場合があるが、沈殿量とリフォールディング効率に相関はない。前述の界面活性剤の濃度範囲で実験を行っている限りでは、0.6%以上にCA濃度を上げて、顕著なリフォールディング効率の改善はみられない。ここで

表III. 還元状態(DTT存在下)で変性したLysozymeの
リフォールディング効率

	活性回復 (%)
(一)	0
2 mM DL-cystine	92
GSH/GSSG	1
	2
	5
	10
	20



GSH: glutathion;
GSSG: oxidized glutathion

1: DL-cystine, 2: GSH/GSSG (-5)

リフォールド効率: 活性の回復で評価: 変性前の活性を100%とした

最も注意を要するのは、CA溶液の取り扱いである。CAの環状構造はその包接能に必須である。よって、CAの開環はリフォールディング効率に致命的な影響を及ぼす。CA溶液へのアミラーゼや細菌の汚染を防ぐためにCA溶液の調製はオートクレーブ滅菌水を用い、調製後の取り扱いにおいても汚染を防ぐように配慮すべきである。

本技術が従来法に比べ優れている点を整理すると以下ようになる。

- 1) 操作が簡単である(自動化、スケールアップへの対応が容易)。
- 2) 汎用性が高い(対象タンパク質に応じて条件を検討する必要がない)。
- 3) 操作に要する時間が短い(数日要していたものが半日程度に)。
- 4) 活性型への変換効率が高い(80%以上活性が回復するものが多い)。

8. リフォールディング試料の取り扱いとリフォールディング効率の確認

CAの添加後1時間を経過した試料を15,000rpm × 5分間、遠心することにより得られる上清をリフォールディング溶液としている。CA添加後12時間以上静置することによりリフォールディング効率が劇的に改善される例もあるので、最初の段階ではCA溶液を添加後1晩放置し、リフォールディング効率を確認した方が無難かもしれない。リフォールディング効率は、上清画分と沈澱画分に回収される目的タンパク質をSDS-PAGE上で見積もることにより行い、さらに活性測定法がある場合には、活性を確認しリフォールディングの良否を検定している。ただし、タンパク質によっては、界面活性剤により活性が阻害される場合もあるので、

必ず界面活性剤の活性への影響は検討しておく。さらにタンパク質の2次構造を反映したスペクトルが得られる円二色性(circular dichroism:CD)測定などにより何らかの構造を取っていることを確認して、次の段階に移っている。

リフォールディング後の試料の取り扱いとしては、通常のタンパク質溶液の扱いと基本的には変わらない。ただし、精製などの操作を行う際に過剰の界面活性剤が邪魔になる場合がある。その場合には、非極性のポリスチレン系の吸着剤(筆者らの研究室ではBioRadのBioBeadsを使用)を1/5容量添加し2時間混和することにより、遊離のイオン系界面活性剤はほぼ完全に、非イオン系界面活性剤の場合は90%程度を除去可能である。また、リフォールディング溶液中に存在するCAであるが、イオン交換樹脂には結合しないこと、分子量の範囲が5,000前後であること等から、タンパク質精製の過程におけるカラム操作などを経ることにより分離可能である。

9. 封入体への適用例

モデルタンパク質ではなく、実際の封入体への適用事例として、本稿では受容体のリガンド認識領域の再構築を紹介する⁽¹¹⁾。対象とした受容体は、動脈硬化危険因子である酸化LDLを認識するスカベンジャー受容体ファミリーに属する受容体であり、ヒト大動脈内皮細胞由来のhuman C-type lectin like oxidized low density lipoprotein receptor (hLOX-1)である。この受容体は、細胞質領域、一回の膜貫通領域、細胞外領域の3つからなりC末側がリガンド認識には特に重要である(図7)。hLOX-1のリガンド認識に必須の領域、並びに、細胞外領域全長を大腸菌体内で大量発現させると封入体を形成する。この封入体にCA法によるリフォールディングを試みると90%以上が可溶性画分に移行した(図8)。さらに可溶性画分に回収されたリガンド認識領域を精製後CD測定を行うと、CA法により立体構造形成が促されヘリックスの存在を示す特徴的なスペクトルが観察された(図9)。さらに、その特異的なリガンド認識能の再構築を評価するため、リフォールディング完了後のリガンド認識領域とリガンドとの相互作用を表面プラズモン共鳴により確認した。その結果、hLOX-1が細胞上で機能する時同様、LDLに対する親和性は低いですが、変性LDLである酸化LDL、並びにアセチル化LDLに対しては高い親和性を示し、その機能も再構築されていることが確認された。

さらに、受容体のN末側のみをビオチン化した状態で大腸菌体内に大量に蓄積させた後に再構築することにも成功し、ストレプトアビジン(ビオチンとの特異的結合能を利用して、ビオチン化タンパク質の固定化に頻繁に用いられるタンパク質)を介することにより、リガンド認識領域(C末側に存在)の向きを描えて、目的に応じた基板上に固定化することも可能となった^(12,13)。膜タンパク質である受容体機能の解析と利用には多くの克服すべき問題点があるが、その解決に向けての一つの手法となり得ると期待される。

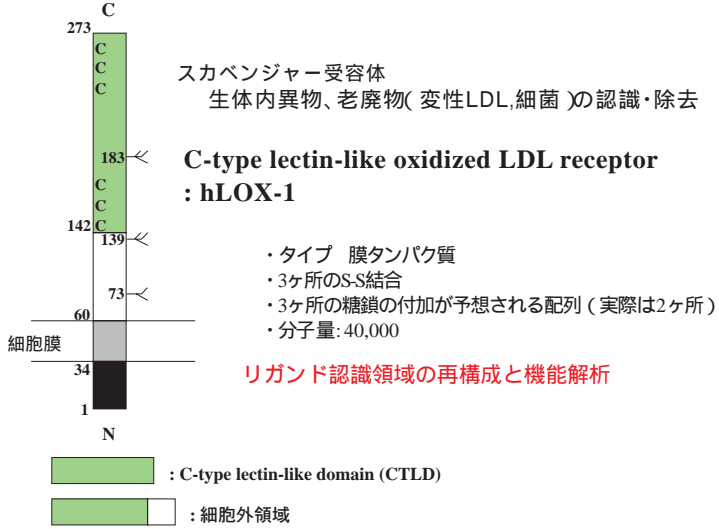


図7 hLOX-1の構造

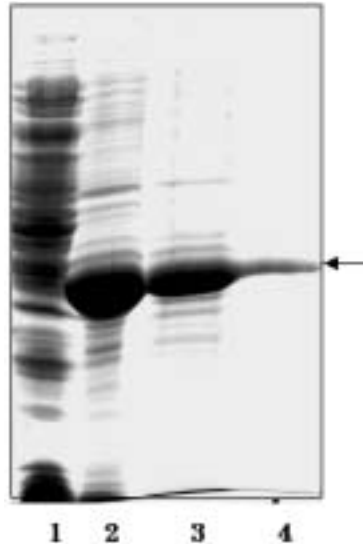
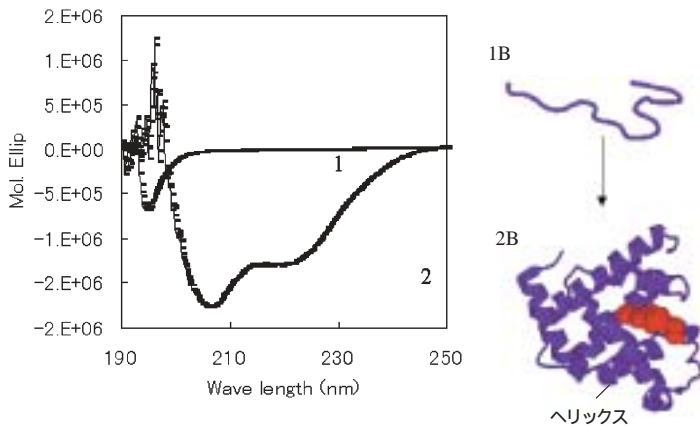


図8 リフォールディング後のリガンド認識領域
 レーン1 : リフォールディング前の可溶性画分、 2 : リフォールディング前の不溶性画分、 3 : リフォールディング後の可溶性画分 : hLOX-1のリガンド認識領域



- 図 9 リフォールディング前後のCDスペクトル変化
1. リフォールディング前：一定の構造をとっていないことを示すスペクトルが得られ、実際のタンパク質の構造は1Bのようであると考えられる。
 2. リフォールディング後：208nm, 222nm付近に負の極大を、193nm付近に正の極大を示すスペクトルが得られ、2Bに観られるようなヘリックス構造が形成されたことが予測される。

10. CA法の問題点

CA法によるリフォールディングの場合、現時点で明らかな問題点がある。現在その点を解決する改良法を検討中であるが、問題点を認識した上で実験計画を立てることが可能なように、以下に整理しておく。

- 1) プレプロタイプで発現するタンパク質（トリプシンなど）の成熟体領域のみを発現した場合のリフォールディングは不可能である（プレプロ配列にフォールディングに必要な配列が含まれているためと思われる）。

2) 試料の稀釈の問題

CA法のプロトコールに従うと、過剰量の界面活性剤の添加、CAの添加などにより、リフォールディング溶液は、最終的には100倍以上に稀釈される。容量の増加に伴い取り扱いが面倒になる他、目的タンパク質濃度の低下により検出が困難になることがある。この点も考慮し、リフォールディング系に供するタンパク質濃度は、リフォールディング効率に影響を与えない範囲で、可能な限り高くしておくことが望ましい。

11. 今後の展開

本技術により、今までリフォールディングが不可能だった多くのタンパク質を活性型へ再生する可能性が開けてきたように思われる。しかしながら、現時点でも解決すべき課題があり、より簡便で効率的な手法へと改良を進めていく予定である。

1) リフォールディング溶液中に存在するフリーの界面活性剤の除去法

界面活性剤がリフォールディング後のタンパク質の精製、機能解析などで問題になる場合が想定される。現時点では本文中でふれたように非極性のポリスチレン系の吸着剤を利用しているが、産業レベルでのタンパク質調製を考えた場合、非効率な手法である。イオン系、非イオン系双方に適用可能なフリーの界面活性剤を除去方法を現在検討中である。

2) リフォールディングされたタンパク質の品質

筆者らのグループでは、リフォールディング効率を活性回復で評価しているが、果たして全ての分子が同一の天然状態の構造にまでリフォールディングされているのか確認していない。特にDL-シスチンを添加するだけという単純な手法で本当に全ての分子で正しいS-S結合が形成されているのか、不安が残るところである。本稿で取り上げたりゾチームに関しては、当所の状態分析研究室の協力により、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析計によりS-S結合が間違いなく形成されていることを確認している。現時点では、高次構造解析を試みているグループなどによる厳密な評価を待っている状態である。

3) タンパク質分子に結合している界面活性剤の解釈

リフォールディング過程で用いた界面活性剤が、リフォールディング後のタンパク質に結合したままである可能性は極めて高い。タンパク質の産業上の利用、あるいは構造解析などの分野において、この点が問題になるか否かはその目的によるが、結合量に関する的確な情報提供を可能にする解析系の構築も目指している。

4) CAの安定供給

CAは比較的高価な試薬である。現在CAの供給先である江崎グリコ株式会社・生物化学研究所における研究の進展に伴い、2001年のキット販売開始時に比べて、安価な供給が可能になってきている。さらなる検討により、産業レベルにおける大容量リフォールディングに適応するような人工シャペロンの開発を目指したい。

12. おわりに

本技術は、従来法を大きく上回る汎用性の高いリフォールディング手法としてキット化され、2001年11月よりタカラバイオ(株)より研究用試薬 (Refolding CA

Kit)として発売が開始された。多くの研究者に使用して頂き、様々な観点から評価、批判を受けることが現時点では大切なことである。使用例が蓄積され評価を受ける中で、さらに優れた技術とすべく改良を重ねていきたい。本技術が、タンパク質の構造、機能解析、並びに有効利用のためのタンパク質調製技術として、さらにはリフォールディング過程の解析手法として、ポストゲノムシークエンス時代のタンパク質研究に少しでも貢献できたら幸いである。

謝辞

本研究は、農林水産省「民間結集型アグリビジネス創出技術開発事業」、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構基礎研究推進事業の助成を受けて進められたものである。

(応用微生物部生物変換研究室 町田 幸子)

引用文献

- 1) Marston, F.A.O. (1986), *Biochem. J.*, 240, 1-12
- 2) Wetlaufer, D.B. and Xie, T (1995), *Prot. Sci.*, 4, 1535-1543
- 3) D. Rozema, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2373 (1995)
- 4) M. Yoshimoto, et al., *J. Chromatogr. B*, 743, 93 (2000)
- 5) Y. Akiyoshi, et al., *Bioconjugate Chem.*, 10, 321 (1999)
- 6) R. Kuboi, et al., *J. Chromatogr. B*, 743, 215 (2000)
- 7) 町田幸子ほか *BioView*, 41, 7 (2002)
- 8) D. Rozema, & S.H. Gellman., *Biochemistry*, 35, 15760 (1996)
- 9) T. Takaha, et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 2902 (1996)
- 10) S. Machida, et al., *FEBS Lett.*, 486, 131 (2000)
- 11) Q. Xie, et al., *Protein Expression and Purification*, 32, 68-74 (2003)
- 12) 町田幸子ほか 特願2003-304624 (2003)
- 13) S. Machida, et al., US patent 10-653687 (2003)