

整理番号	2019-J-029	報告者氏名	村岡 貴博
------	------------	-------	-------

研究課題名

ジスルフィド結合交換に注目したタンパク質フォールディング促進剤の開発

<代表研究者> 機関名：東京農工大学 職名：教授 氏名：村岡 貴博

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

多数のアミノ酸が特定の配列に従って連結され構成されるタンパク質は、そのポリペプチド鎖が特定の立体構造、つまり天然構造へ折りたたまれることで、本来の生物学的機能を獲得する。このポリペプチド鎖のフォールディングは、水素結合や疎水性相互作用などの非共有結合に加え、共有結合形成を伴うジスルフィド結合の形成によって進行する。細胞内環境では、様々なシャペロンやジスルフィド結合交換酵素の働きにより、天然構造へのタンパク質フォールディングが高効率に進行する。一方、試験管環境での自発的タンパク質フォールディングは、非天然型構造の形成や分子間相互作用による凝集形成などの影響で、効率的に進行しない場合が多い。タンパク質は、バイオマテリアルや触媒、さらには医薬品として有用であり、また改変型タンパク質は分子生物学研究において重要な役割を担う。従って、目的とするタンパク質を効率的にフォールディングさせる技術は、材料科学、薬学、さらには広く生物学に貢献する。

そこで本研究では、多数のジスルフィド結合を有するタンパク質のフォールディングを、試験管環境で効率的に進行させるアプローチとして、ジスルフィド結合交換反応を促進する添加剤を用いる方法に着目した。このアプローチは、細胞内で働くジスルフィド結合交換酵素の活性中心で行われる化学反応を、試験管環境で再構築することとらえることができる。我々はこれまでに、タンパク質ジスルフィド結合交換反応を促進する添加剤として、酸性度の高いチオール化合物が有効であることを見出した (Okada et al. Chem. Commun. 2019)。この知見を基盤とし、本研究では、ジスルフィド結合交換促進剤の分子骨格が、その機能に与える効果を詳細に調べ、より効果的な促進剤開発につながる分子設計指針を得ることとした。

我々の先行研究から、塩基性官能基を連結したチオール化合物が、ジスルフィド結合交換促進機能を示すことが見いだされている。そこで、塩基性官能基とチオール基との距離の効果を調べた。その結果、両官能基をより短い距離で連結した構造が、高い促進効果につながることを示された。両官能基間の距離が短いほど、チオール基の酸性度が向上したことが、高い促進効果につながる要因と考えられる。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

岡田隼輔, 松崎元紀, 稲葉謙次, 奥村正樹, 村岡貴博,
タンパク質酸化的フォールディングを促進するチオール化合物の新たな分子デザイン
日本化学会 第100 春季年会 (2020)
2020 年 3 月 22 日、口頭発表、オンライン開催

村岡貴博
Protein Stabilization by Small Organic Molecules
令和 2 年度化学系学協会東北大会 有機化学コロキウム
2020 年 9 月 26 日、口頭発表（招待講演）、オンライン開催

村岡貴博
生体内環境で機能する超分子
高分子学会第 63 回茨城地区活動講演会
2020 年 11 月 5 日、口頭発表（招待講演）、オンライン開催

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

研究の目的

多数のアミノ酸が特定の配列に従って連結され構成されるタンパク質は、そのポリペプチド鎖が特定の立体構造、つまり天然構造へ折りたたまれることで、本来の生物学的機能を獲得する。このポリペプチド鎖のフォールディングは、水素結合や疎水性相互作用などの非共有結合に加え、共有結合形成を伴うジスルフィド結合の形成によって進行する。細胞内環境では、様々なシャペロンやジスルフィド結合交換酵素の働きにより、天然構造へのタンパク質フォールディングが高効率に進行する。一方、試験管環境での自発的タンパク質フォールディングは、非天然型構造の形成や分子間相互作用による凝集形成などの影響で、効率的に進行しない場合が多い。タンパク質は、バイオマテリアルや触媒、さらには医薬品として有用であり、また改変型タンパク質は分子生物学研究において重要な役割を担う。これらの目的タンパク質を人工的に合成する際に、往々にして、フォールディングプロセスで収率が低下する 경우가多く、現状の技術的な限界が、タンパク質を用いる応用や基礎研究の妨げの一つとなっている。従って、目的とするタンパク質を効率的にフォールディングさせる技術は、材料科学、薬学、さらには広く生物学に貢献する。

ジスルフィド結合形成を伴うタンパク質フォールディングは、特に酸化的タンパク質フォールディングと呼ばれ、抗体などの分泌性タンパク質の多くに見られる。本質的に可逆的なダイナミクスを有する非共有結合とは異なり、共有結合は可逆性に乏しいため、酸化的タンパク質フォールディングにおいて、ジスルフィド結合形成はフォールディング経路に大きく影響する。つまり、天然型のシステインペア間でのジスルフィド結合形成は、天然構造へのフォールディングに帰着する一方、非天然型のシステインペア間でのジスルフィド結合形成は、天然構造へのフォールディングを阻害する。

細胞内では、Protein Disulfide Isomerase を始めとするジスルフィド結合交換反応を促進する酵素群の働きにより、非天然型のシステインペア間でのジスルフィド結合の天然型への組み替えが行われ、天然構造へのフォールディングが進行していることが知られている。そこで本研究では、多数のジスルフィド結合を有するタンパク質のフォールディングを、試験管環境で効率的に進行させるアプローチとして、ジスルフィド結合交換反応を促進する添加剤を用いる方法に着目した。このアプローチは、細胞内で働くジスルフィド結合交換酵素の活性中心で行われる化学反応を、試験管環境で再構築することととらえることができる。最近、我々のグループは、チオール基とウレア型基のカップリング効果が酸化的なタンパク質のフォールディングを促進することを報告した (Okada et al. Chem. Commun. 2019)。特に、塩基性のイミノウレア (=グアニジル) ユニットを持つチオール化合物 (GdnSH) は、高効率なフォールディング促進効果を示した。グルタチオン (GSH) と比較して、GdnSH を還元型アンフォールド Bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) に添加すると、折りたたみ反応が促進され、60分後のネイティブフォームの収率が2.1倍になった。リボヌクレアーゼ A (RNase A) の酸化的フォールディングも、GdnSH の存在下では速やかに進行し、効率が向上した。還元されてアンフォールドした RNase A のフォールディングに GSH が存在すると、180分後に34%の酵素活性が回復した。さらに、GdnSH の存在下では、天然構造を形成した RNase A の回収率が高まり、63%の活性が得られた。本研究では、GdnSH のチオール基とグアニジル基の間にジェチレングリコール (DEG) スペーサーを導入した GdnDEG-SH (図1) を開発し、2つの官能基の距離が酸化的なタンパク質のフォールディングに及ぼす影響を調べた。

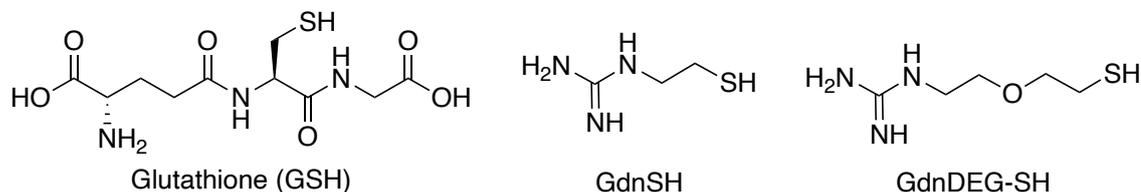


図1 グルタチオン (GSH)、GdnSH、GdnDEG-SH の分子構造

結果

1) GdnDEG-SH の合成

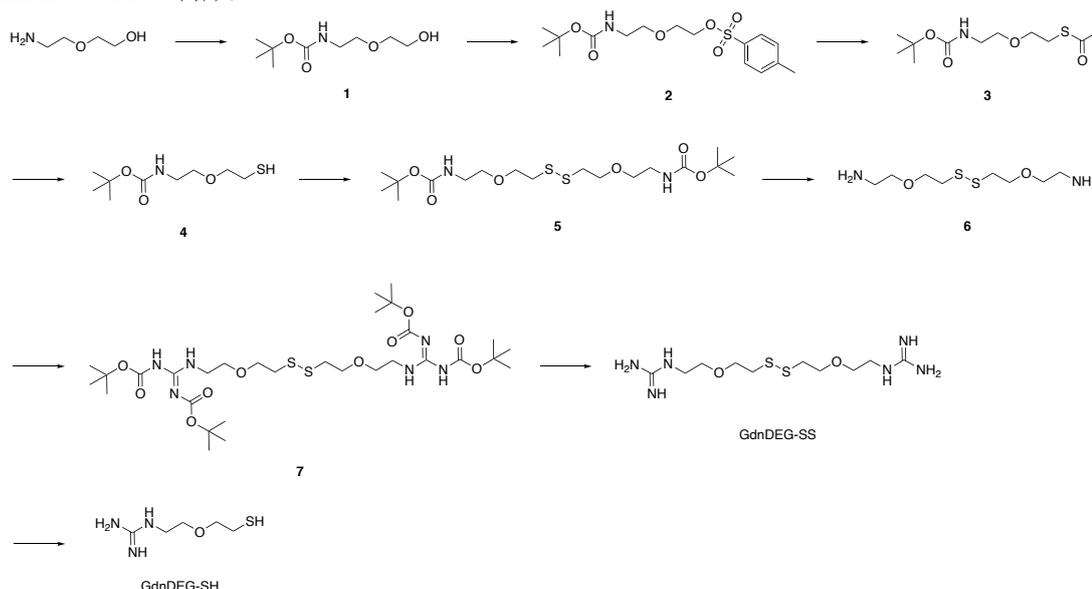


図 2 GdnDEG-SH の合成スキーム

チオール基とグアニジル基の間の距離効果を調べるために、中性で水溶性である DEG をスパーサーとして選択した。GdnDEG-SH は、2-(2-aminoethoxy)ethanol のアミノ基を tert-butoxycarbonyl (Boc) 基で保護し、EtOH 中で (Boc)₂O と反応させることで、収率 94% で化合物 1 を得た (Figure 2)。1 のヒドロキシ基を、NaOH 存在下で TsCl を用いてトシル化し、化合物 2 を収率 86% で得た。2 のトシル基をチオアセチル基に変換し、DMF 中で AcSK と反応させることで、収率 92% で化合物 3 を得た。3 のアセチル基を K₂CO₃ で加水分解すると、化合物 4 が 42% の収率で得られ、これを AcOEt 中で H₂O₂ と NaI で酸化すると、ジスルフィド型の化合物 5 が 80% の収率で得られた。化合物 5 の Boc 基を CH₂Cl₂ 中のトリフルオロ酢酸 (TFA) で脱保護し、化合物 6 を 99% の収率で得た。グアニジルユニットを導入するために、化合物 6 をトリエチルアミンの存在下、DMF 中で N,N'-bis(tert-ブトキシカルボニル)-1H-ピラゾール-1-カルボキサミジンと反応させ、化合物 7 を収率 66% で得た。MeOH と水の中で塩酸を用いて 7 の Boc 基を脱保護し、化合物 GdnDEG-SS を 76% の収率で得た。さらに、水中でジチオスレイトールを用いて還元し、GdnDEG-SH を 82% の収率で合成した。

2) RNase A のジスルフィド結合形成

RNase A は、C26-C84, C40-C95, C58-110, C65-C72 の 4 つのジスルフィド結合を形成する、酸化型的フォールディング研究の代表的なタンパク質である。RNase A のフォールディング過程は、マレイミド PEG (Mw 2,000) を加えて反応を停止させた。マレイミド PEG は、RNase A のチオール基と結合して質量を増加させ、その結果、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) における電気泳動移動度が低下し、RNase A の完全還元型 (R)、フォールディング中間体、完全酸化型 (すなわち、ネイティブ型と 4 つのジスルフィド結合を持つ非ネイティブ型の混合物で、それぞれ N と 4S と表現される) のバンドが分離される。つまり、SDS-PAGE では、ジスルフィド結合形成の進行をバンドの移動度としてモニターする。RNase A のジスルフィド結合形成は、酸化型グルタチオン (GSSG) などの酸化剤の添加によって引き起こされる。GSSG 存在下での RNase A の SDS-PAGE アッセイでは、R のバンド強度はインキュベーション時間の経過とともに減少した (図 3a)。30 分後、R のバンドはほとんど消失し、N/4S のバンドが出現した。N/4S のバンド強度は時間の経過とともに増加し、酸化反応が進行していることが示された。GSH と GSSG の混合液では、酸化反応の速度が低下した。すなわち、30 分後には R バンドが現れ、90 分後には 3S バンドの色濃度が N/4S バンドの色濃度よりも高くなった (図 3b)。また、GdnDEG-SH と GSSG

の混合液でも同様の酸化反応の進行プロファイルが観察された (図 3c)。RNase A の N/4S 形成を定量的に解析すると、GSH/GSSG および GdnDEG-SH/GSSG 系では、GSSG のみの存在下での酸化速度に比べて大幅に低下していた。先に報告したように、GdnSH/GSSG 系は GSH/GSSG 系に比べて還元型 RNase A の酸化反応速度を高めており、GdnSH と GdnDEG-SH の対比効果を示している。

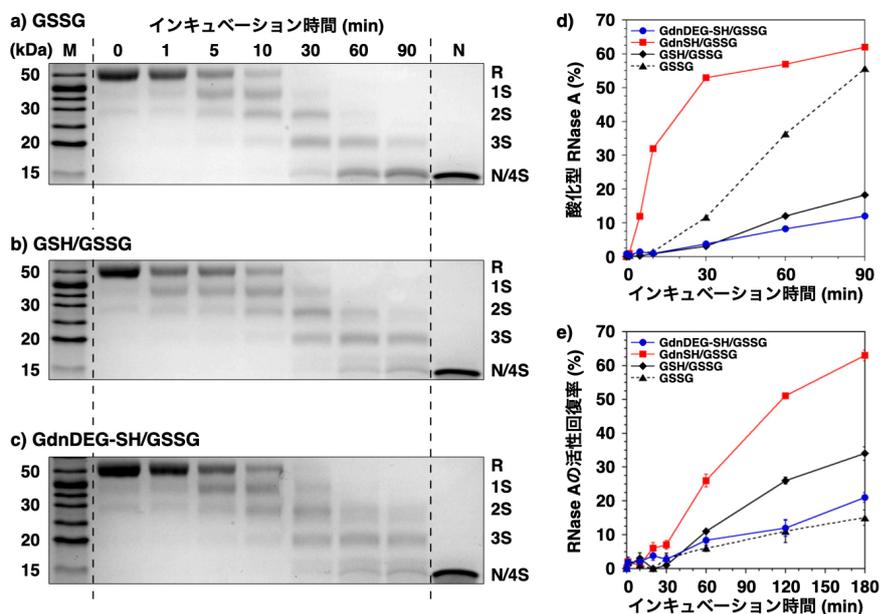


図 3 SDS-PAGE による RNase A の酸化のタイムコース分析。緩衝液中、(a) GSSG、(b) GSH と GSSG、(c) GdnDEG-SH と GSSG の存在下での RNase A の酸化反応をモニターした SDS-PAGE ゲル画像。左端と右端のレーンは、それぞれマーカ (M) とネイティブ RNase A (N) に対応するバンドを示す。R と N/4S はそれぞれ、完全に還元された RNase A と完全に酸化された (ネイティブフォームと 4 つのジスルフィド結合を持つフォールディング中間体の混合物) RNase A を表す。(d) チオール化合物とジスルフィド化合物の混合物の存在下で、完全に酸化された RNase A のコントロール (N) に対する相対的なバンド強度の定量化。(e) 緩衝液中で GdnDEG-SH/GSSG、GdnSH/GSSG、GSH/GSSG、GSSG のみの系でインキュベートした際の RNase A の回復した酵素活性。活性は、30 °C での cCMP から 3'-CMP への加水分解を分光法でモニターすることで評価した。

3) RNase A の酵素活性回復

RNase A の酸化的なフォールディングに対する GdnDEG-SH の効果を調べるために、酵素活性の回復をモニターした (図 3e)。酸化剤としての GSSG の存在下では、酵素活性は時間とともに上昇し、180 分後には 15% に達した。RNase A の回復した酵素活性は、GSSG の存在下で GSH および GdnSH の添加により増加した (それぞれ 34% および 63%)。GdnDEG-SH の添加によって RNase A のフォールディング反応はほとんど促されず、GdnDEG-SH/GSSG 系での酵素活性回復のプロファイルは、GSSG のみの系でのプロファイルと類似していた。

4) BPTI の酸化的タンパク質フォールディング

チオール化合物の存在下で、ウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) の酸化的折り畳みを調べた。BPTI には、C5-C55、C14-C38、C30-C51 の 3 つのジスルフィド結合が存在する。折りたたみ経路において、BPTI は N', N*, NSHSH などの準ネイティブな中間体を形成することが知られており、これらは逆相 HPLC で分離して定量的に分析することができる。Tris-HCl および NaCl を含む緩衝液中で、還元剤としてのチオール化合物および酸化剤としての GSSG の存在下で、還元および変性した BPTI をインキュベートして、ネイティブな形態にフォールディングさせた。還元剤として GSH を用いた場合、最初の 5 分間のインキュベーションでフォールディング中間体の形成が観察された (図 4a)。10 分後にはネイティブフォームに相当する画分が現れ、60 分後のネイティブ体の収率は

24%であった。GdnDEG-SH の存在下でも、基本的に同様の変化が見られ、60 分後のネイティブ体の収率は 19%であった。我々が以前に報告したように、GdnSH の存在下では BPTI の折り畳みが促進され、60 分後のネイティブ体の収率は 51%であった。したがって、チオール基とグアニジル基の間にジエチレングリコール鎖を挿入すると、折り畳み促進機能が著しく低下することがわかった。

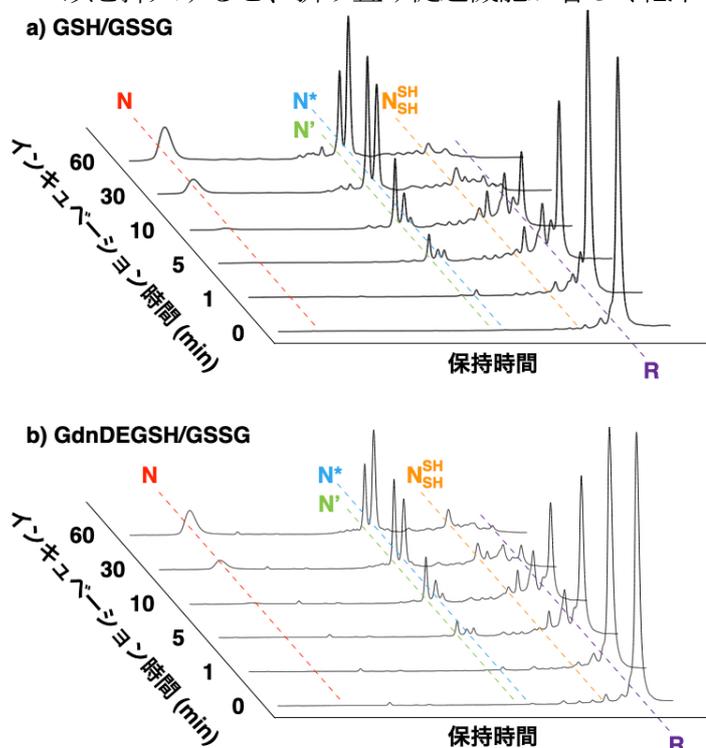


図 4 a) GdnDEG-SH および GSSG、(b) GSH および GSSG の存在下での BPTI の酸化的フォールディングのタイムコース逆相 HPLC 分析。N と R は、それぞれ BPTI のネイティブ型と還元型を表す。N'、N*、NSHSH は BPTI のフォールディング中間体を表す。

考察

酸化的タンパク質フォールディング過程において、ジスルフィド結合形成は、反応を促進し、経路を制御する主要な要因の一つである。ジスルフィド結合を非ネイティブなペアからネイティブなペアに変換することで、ネイティブフォームの収率を高めることができる。求核性や酸化性の高いチオール化合物を添加すると、ジスルフィド結合のシ交換が促進され、酸化的タンパク質フォールディングの促進に有効に寄与する。RNase A と BPTI のフォールディング過程において、GdnDEG-SH の促進効果は GdnSH よりも低く、むしろ GSH と類似していた。チオール基の近傍にグアニジルユニットのような塩基性基を結合させることで、チオールの酸性度を高めることができ、フォールディング促進に有利に働く。GdnDEG-SH の酸性度は GdnSH よりも、さらには GSH よりも低かった。このため、ジエチレングリコール鎖を挿入してグアニジルユニットとチオール基を分離すると、チオールの酸性度を高めるカップリング効果が著しく低下する。また、ジエチレングリコール鎖を挿入すると、チオール化合物の酸化還元電位が低下する。GdnDEG-SH の酸性度が低下すると、還元的な性質を持つため、酸化的タンパク質フォールディングを促進する活性が制限されることになったと考えられる。