



## タンパク質の物性を制御するカチオン化技術と工学的応用

### 1. はじめに

一般に水中に存在する球状タンパク質は、疎水性の側鎖を分子の内側に、親水性の側鎖を分子の外側に配向することで熱力学的に最も安定な立体構造にフォールドし、様々な生理機能を発現している。20種類の天然アミノ酸の各側鎖が示す親水/疎水性は、非極性溶媒と水への各アミノ酸の分配係数から詳細に測定されており<sup>1)</sup>、この数値はタンパク質の立体構造形成や安定性、機能発現を考察するうえで重要な情報となる。特に親水性が高い解離基のうち、正電荷を有する Lys/Arg や負電荷を有する Asp/Glu は大半が分子表面に配向しているため、native (天然) 構造のタンパク質中の Lys/Arg の総数から Asp/Glu の数を引いた net charge (実効電荷) がタンパク質の表面電荷をよく反映し、各タンパク質の機能発現に大きく関わっている。また、通常は球状タンパク質の内側に配向している疎水基も、タンパク質の変性に伴って溶媒に露出しているが、特に疎水性が高い Trp/Ile/Leu/Phe の4残基の含有量が、変性状態のタンパク質の溶解性を推定するうえで非常に重要な指標となる。いずれも非常に単純な見積もりではあるが、タンパク質の物性理解に大きく役立ち、タンパク質を「生もの」ではなく「高分子化合物」として理解するうえで重要な視点となる。本稿では、筆者らが取り組んでいるタンパク質の化学修飾法を駆使して正電荷を付与 (カチオン化) する技術が、タンパク質の高効率な生細胞内導入や、不溶性の変性タンパク質の可溶化、さらには変性状態から試験管内・細胞内で効率的に活性構造に巻き戻す技術として利用できることをご紹介したい。

### 2. 静電相互作用と機能発現

水中に存在するタンパク質分子に働く引力・斥力としてクーロン力が重要である。例えば、きわめて塩基性 (net charge が正の値) の高いタンパク質であるヒストンは、負電荷のポリマーともいえる DNA を静電相互作用により巻きつける芯として機能する。同じく塩基性タンパク質であるリゾチームやヌクレアーゼは、酸性の基質を認識・結合するためにクーロン力を利用しているが、生成物の解離も必要のため、基質と酵素の相互作用に利用されるクーロン力は絶妙のバランスになるように進化してきた。例えば、人体の血清中のタンパク質の大半は酸性タンパク質であるが、これは血管表面を構成する内皮細胞の表面に存在する糖タンパク質が負電荷を帯びており、非特異的な吸着を抑制するためには必須の物性である。このようにタンパク質の表面電荷は、タンパク質の機能発現において極めて重要な物性である。

### 3. タンパク質のカチオン化技術

#### 3-1. タンパク質カチオン化による細胞内導入

動物細胞の表面には細胞膜貫通型あるいは細胞膜アンカー型として存在する膜タンパク質に付加した糖鎖に由来する糖衣と呼ばれる構造体があり、一部に硫酸基やカルボキシ基を多く含むグリコサミノグリカンが多量に存在する。そのため生細胞の表面は負に帯電している。この性質から、正電荷を帯びているタンパク質を細胞に添加すると、静電的に速やかに細胞表面に吸着し、さらに細胞表面に吸着したタンパク質はその後、高効率に主にエンドサイトーシス様の経路で細胞内に取り込まれる。この静電吸着を介した培養細胞内へのタンパク質の取り込み促進は、1965年に既に報告されている<sup>2)</sup>。近年、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 由来の TAT ペプチド (RRRQRKKRG) や Poly-Arg などの塩基性ペプチドをタンパク質に付加させるタンパク質細胞内導入が多用されるようになってきたが、この手法も、細胞表面への静電的な吸着を介して細胞内に導入される経路を活用している。このようにタンパク質のカチオン化はタンパク質の細胞内取り込みを促進する。以下、筆者らのタンパク質を化学修飾によりカチオン化するアプローチを紹介する<sup>3)</sup>。

#### 3-2. ジアミンを用いたタンパク質カチオン化法

Asp/Glu および C 末端のカルボキシ基の大部分はタンパク質の分子表面に露出しており、化学修飾法も容易な官能基である。最も古くから用いられてきたジアミンを用いた

カチオン化法は、エチレンジアミンなどの2価のアミンを保有する低分子化合物を用いてカルボキシ基をアミド化する手法で、1ヶ所の修飾で-1の負電荷を+1の正電荷に反転させることができる(図1A)。この反応では修飾数( $m$ )に応じてタンパク質をカチオン化(+ $2m$ )することが可能であり、縮合剤として用いる水溶性カルボジイミド(EDCなど)の添加量により修飾量を制御できる。この手法は簡便に net charge を変化させることができるが、細胞内への導入効率を上げるためには多点修飾が必要で、タンパク質の生理機能を十分に保ったまま効率的に細胞内に導入できるタンパク質の種類は限定される。この手法による成功例としてはカチオン化 RNase の細胞内導入が挙げられる。この場合、RNA 分解活性は大幅に低下したものの、細胞内の RNA 分解に伴う細胞増殖阻害活性を発現するためには十分な活性であったため、強い細胞毒性を付与することに成功した<sup>4,5)</sup>。また、ジアミンでカチオン化されたタンパク質は *in vivo* では血液脳関門を通過できるとの知見も古くからあり<sup>3)</sup>、タンパク質の脳内輸送にカチオン化法を利用する試みは現在も続いている。筆者らの最近の解析では、ジアミンで修飾されたカチオン化タンパク質は多点修飾による機能低下の問題を伴うものの、細胞内導入効率は秀逸であることも判明しており<sup>6)</sup>、本手法の応用は今後も期待される。

### 3-3. カチオン性ポリマーを用いたタンパク質カチオン化法

ジアミンカチオン化法は多点修飾が必要な問題点があったが、カチオン性ポリマーを用いた限定的な化学修飾を用いればタンパク質の機能を高く維持したまま net charge を大きく変動させることができる。筆者らは、平均分子量が250~1,800程度 of 分岐型のポリエチレンジアミン(PEI)が、タンパク質の機能を高く維持しつつ、細胞に対してもほとんど毒性を示さずにタンパク質をカチオン化できる素材として優れていることを見いだした<sup>7)</sup>。PEIは分子量43あたり1個の窒素原子が含まれる高い正電荷密度が特徴で、遺伝子導入試薬(jetPEI: Polyplus-transfection社など)としても汎用されている。遺伝子導入用のPEIはDNAの負電荷を相殺するだけの正電荷が必要なため、かなり高分子量(数万~数十万)のPEIが使用されており細胞毒性も高い。タンパク質細胞内導入に用いるPEIは1~3級アミンを含む分岐型の合成ポリマーで、末端の1級アミンを用いて様々な化学修飾が行える(図1B)。例えば、汎用されている緑色蛍光タンパク質(EGFP)は net charge が-7であり、培養細胞に添加しても全く細胞表面に吸着しないが、計算上+14の正電荷が含まれる平均分子量600のPEIをEGFPの分子表面に1ヶ所アミド化するだけで net charge が正電荷側に反転し、極めて高効率な細胞表面への吸着と、細胞内部へと移行する能力を付与することができる。本手法では限定的な化学修飾しか施していないためEGFPの蛍光強

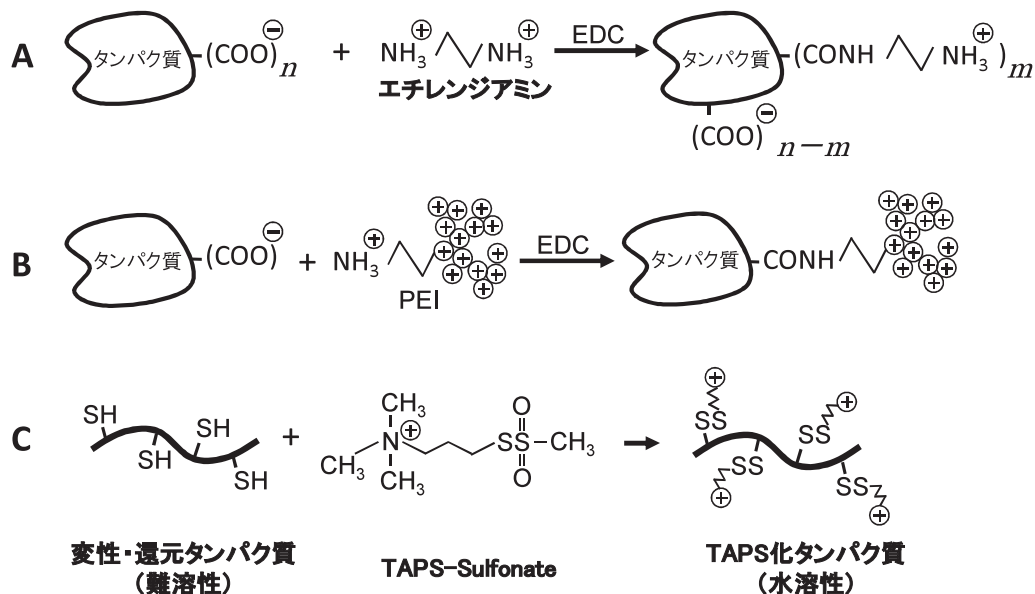


図1 タンパク質カチオン化反応のスキーム

度には変化がない<sup>7)</sup>。また、免疫グロブリン G (IgG) のような安定性の高いタンパク質の PEI カチオン化も有効な手段である。生細胞内の抗原を認識できる抗体の選択が課題ではあるが、生細胞内の抗原のイメージングや中和活性を活用した機能解析にも有用である<sup>7,8)</sup>。

### 3-4. カチオン化キャリアー法

細胞内で機能させたいタンパク質に、本来の net charge を維持したまま機能させたい場合は、カチオン化キャリアー法を用いた細胞内導入の活用が良い手段となる<sup>6,9)</sup>。例えば、IgG に結合するプロテイン A/G やビオチン化タンパク質に結合するアビジンを適切な条件でカチオン化したサンプルを調製しておき、細胞内に導入する直前に抗体やビオチン化タンパク質と混合することでカチオン性複合体が形成できる。細胞質内は還元的な環境であるため、ビオチン化試薬には細胞質内で還元できる SS 結合を利用した試薬 (Pierce 社: HPDP-Biotin や Sulfo-NHS-SS-Biotin) を活用することで、細胞質内で本来の net charge を維持したタンパク質を機能させることができる<sup>6,10)</sup>。また、大腸菌を用いた秀逸な組換えタンパク質の発現・精製系として古くから多用されているグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を細胞内に導入したい場合は、グルタチオンを結合させた PEI が汎用性の高いキャリアーとして活用できる<sup>11)</sup>。

## 4. 変性タンパク質を活用可能とするカチオン化技術

### 4-1. 変性タンパク質の溶解性と net charge

タンパク質の net charge は水中での溶解性にも大きく相関する。native 状態の球状タンパク質の場合は、疎水基が内部に埋もれた高次構造を形成しているが、変性状態のタンパク質は疎水基が露出しており、疎水的な分子間相互作用により凝集・不溶化する。ゼラチンに代表されるとおり、変性状態でも非常に溶解性が高いタンパク質も存在するが、疎水性アミノ酸の含有率が極めて低い特徴がある。筆者らは以前、4 種類の変性・還元タンパク質 [ニワトリ卵白リゾチーム、ウシ臍由来 RNaseA、ウシ血清アルブミン、ダイズトリプシンインヒビター] を用いて溶解度と net charge の相関を調べた研究において、疎水性が大きいアミノ酸 (Trp, Ile, Phe および Leu の 4 種) 1 残基あたりのタンパク質の net charge の値から計算される可溶性指標 (Solubility Index: 下式) は変性タンパク質の溶解性の予測に便利である<sup>12)</sup>。

$$\text{Solubility Index} = \text{net charge} / \text{疎水性残基数}$$

ここで、溶媒の pH が中性付近では Solubility Index が

+0.2 以上、または -0.3 以下の場合、変性タンパク質でも高い溶解度 (1 mg/mL 以上) を示す。このことは、変性状態のタンパク質であっても、正または負の電荷を大きくシフトさせれば、高い溶解性を付与できることを示している。

### 4-2. 変性状態のタンパク質のカチオン化による可溶化

上述の Solubility Index が示すとおり、変性状態のタンパク質であっても正または負に偏った net charge を保有していれば高い溶解性を保つことができる。筆者らはタンパク質の net charge を制御する手法として Cys 残基を対象とした化学修飾を多用している。SH 基に対する修飾には、不可逆的な S-アルキル化と可逆的な S-アルキルジスルフィド化 (SS 結合) を介した手法があり、両者の特性を生かした利用を図っている。タンパク質に付加する電荷についてはアニオン化よりもカチオン化の方が可溶化においては優位性が高い。これは変性状態のタンパク質に対して可逆的な SS 結合を介してカチオン化を施した場合、ごく微量残存する SH 基が交換反応を促進する例があるので、より弱酸性条件 (pH < 6) の方が SS 結合を安定に維持できる。また、さらに酸性条件 (pH < 3) では Asp, Glu 側鎖のカルボン酸がプロトン化に伴い負電荷を失うため、net charge を正電荷側に大きく偏らせることができ、溶解性向上に寄与する。

### 4-3. 可逆的変性カチオン化による封入体由来タンパク質の可溶化

大腸菌を宿主とした発現系は、大量・安価・迅速にタンパク質が発現できるものの、しばしば不溶性の封入体として蓄積してしまい、多くの研究者を悩ませている。1961 年に Anfinsen が変性・還元状態のタンパク質 (RNaseA) を試験管内でリフォールディングが可能であることを示してから半世紀が経つが、native 構造のタンパク質の熱力学的安定性を駆動力としたリフォールディングの成功率は高くはない。筆者らは以前、封入体由来タンパク質は、SDS-PAGE で判断する限り比較的高い純度であっても、実は核酸等の菌体由来の非タンパク質性の夾雑物が混入しており、これらがタンパク質の活性構造への巻き戻しを阻害していることを示した<sup>13)</sup>。最近では、His タグ等のアフィニティタグを利用して、変性剤中で予めタンパク質を精製してから巻き戻しを行う方法もあるが、筆者らは SS 結合を介して化学修飾する可逆的変性カチオン化法を活用し、溶解度の差を利用した変性状態のタンパク質の抽出・精製法を開発した。このような用途に最適な SH 基保護試薬 TAPS-Sulfonate (片山化学工業, 和光純薬) は、図 1C に

示すスキームで還元タンパク質と反応し、TAPS 化タンパク質を生じる。封入体由来のタンパク質を材料とする場合、6M グアニジン等の変性剤中で溶解し、ジチオトレイトール等を用いて完全に還元を行った後、反応液中のSH基に対して小過剰量のTAPS-Sulfonateを添加することで速やかに反応させることができ、酸性条件で水に対して透析すると、可溶性画分に高純度なTAPS 化タンパク質が回収できる。詳細なプロトコールは片山化学工業のホームページに掲載しているので参照していただきたい。TAPS 化タンパク質から活性構造に巻き戻す条件は、個々のタンパク質に最適な添加剤等を探索する必要があるが、菌体由来の夾雑物が除去されており、高い巻き戻し効率が期待される。

#### 4-4. 可逆的変性カチオン化タンパク質の in cell folding

可逆的変性カチオン化タンパク質はカチオン化タンパク質と同様に、細胞表面に静電的に吸着した後、効率的に細胞内へ導入することができる。その後、大部分のタンパク質はエンドソーム様の顆粒内に留まったままであるが、一部は細胞質まで到達する。細胞質内は還元的な環境であるため、SS結合で修飾されたカチオン性基は還元・解離することから、タンパク質は自発的または細胞質内のシャペロンの介在を経て、活性構造に巻き戻ることができる<sup>14)</sup> (図2)。この in cell folding 法は不安定な物性のタンパク質であっても一過的に細胞内で機能させることができる利点がある。一般に、細胞の増殖や分化を制御する転写因子タンパク質は単独では天然変性状態のものが多く、不安定な

物性であるが、本手法を用いて変性状態のまま分離・精製し、in cell folding 法で活性化すれば、細胞の機能制御への応用が期待できる。

#### 5. カチオン化タンパク質の細胞内導入技術の改善と応用

カチオン化タンパク質の細胞内導入は多様な可能性がある技術であるが、主に細胞表面への吸着を介したエンドサイトーシス様の導入経路であるため、エンドソーム様の顆粒内から細胞質への移行促進が課題である。筆者らは最近、26 アミノ酸の Leu/His のみで合成された両親媒性ペプチド (Endo-porter) の併用により、カチオン化タンパク質の細胞質内移行を大幅に向上させることに成功した<sup>15)</sup>。このエンドソームから細胞質への移行促進は、腫瘍免疫分野でも重要な課題である。樹状細胞に取り込まれた抗原タンパク質がクロスプレゼンテーションによりMHCクラスI上への抗原提示と細胞性免疫を誘導する活性も、Endo-porter の併用により大幅に向上した<sup>16)</sup>。

#### 6. おわりに

タンパク質のカチオン化技術は、細胞内透過性の付与、変性状態のタンパク質への水溶性の付与といった物性制御が可能で、タンパク質の機能解析から医用工学への応用まで幅広い分野で活用が期待される基盤技術である。本技術をさらに洗練し、夢のあるバイオテクノロジーを実現するための要素技術に育成したい。

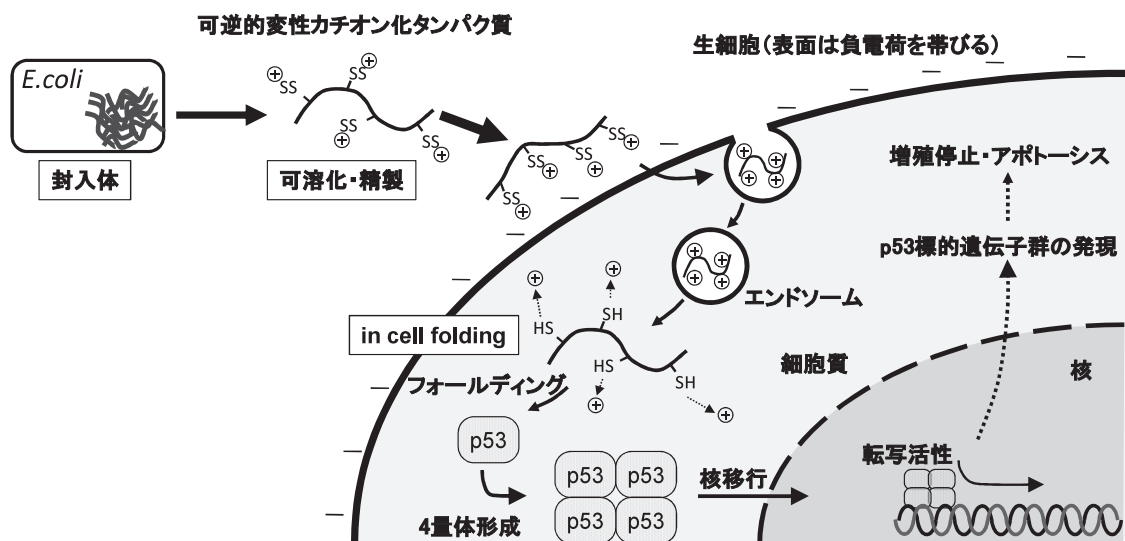


図2 可逆的変性カチオン化タンパク質の in cell folding: がん抑制タンパク質 p53 での成功例<sup>14)</sup>

## 謝辞

本研究は NEDO 産業技術研究助成 (H20) 等にご支援いただいたほか、萌芽期にご支援いただいた日本触媒株式会社に感謝申し上げます。また、本研究の根幹となるアイデアの生みの親である岡山大学名誉教授 山田秀徳先生に心より厚く御礼申し上げます。

- 1) Fauchere, J.L. & Pliska, V. (1983) *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.*, **18**, 369-375.
- 2) Ryser, H.J. & Hancock, R. (1965) *Science*, **150**, 501-503.
- 3) Futami, J., Kitazoe, M., Murata, H., & Yamada, H. (2007) *Exp. Opin. Drug Dis.*, **2**, 261-269.
- 4) Futami, J., Maeda, T., Kitazoe, M., Nukui, E., Tada, H., Seno, M., Kosaka, M., & Yamada, H. (2001) *Biochemistry*, **40**, 7518-7524.
- 5) Futami, J., Nukui, E., Maeda, T., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., & Yamada, H. (2002) *J. Biochem.*, **132**, 223-228.
- 6) Futami, M., Watanabe, Y., Asama, T., Murata, H., Tada, H., Kosaka, M., Yamada, H., & Futami, J. (2012) *Bioconjug. Chem.*, **23**, 2025-2031.
- 7) Futami, J., Kitazoe, M., Maeda, T., Nukui, E., Sakaguchi, M., Kosaka, J., Miyazaki, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., Sasaki, J., Huh, N.H., Namba, M., & Yamada, H. (2005) *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 95-103.
- 8) Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Takaishi, M., Sakaguchi, Y., Makino, E., Kataoka, N., Yamada, H., Namba, M., & Huh, N. H. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 825-835.
- 9) Kitazoe, M., Murata, H., Futami, J., Maeda, T., Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., Huh, N.H., Namba, M., Nishikawa, M., Maeda, Y., & Yamada, H. (2005) *J. Biochem.*, **137**, 693-701.
- 10) Murata, H., Futami, J., Kitazoe, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., & Yamada, H. (2008) *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 34-38.
- 11) Murata, H., Futami, J., Kitazoe, M., Yonehara, T., Nakanishi, H., Kosaka, M., Tada, H., Sakaguchi, M., Yagi, Y., Seno, M., Huh, N.H., & Yamada, H. (2008) *J. Biochem.*, **144**, 447-455.
- 12) Yamada, H., Seno, M., Kobayashi, A., Moriyama, T., Kosaka, M., Ito, Y., & Imoto, T. (1994) *J. Biochem.*, **116**, 852-857.
- 13) Futami, J., Tsushima, Y., Tada, H., Seno, M., & Yamada, H. (2000) *J. Biochem.*, **127**, 435-441.
- 14) Murata, H., Sakaguchi, M., Futami, J., Kitazoe, M., Maeda, T., Doura, H., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., Huh, N.H., & Yamada, H. (2006) *Biochemistry*, **45**, 6124-6132.
- 15) Futami, J. & Yamada, H. (2008) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 180-184.
- 16) Ikeuchi, N., Futami, J., Hosoi, A., Noji, S., Kurachi, M., Ueha, S., Fujii, S., Yamada, H., Matsushima, K., Moriyasu, F., & Kakimi, K. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **392**, 217-222.

二見 淳一郎  
(岡山大学大学院自然科学研究科 (工学)  
化学生命工学専攻)

Protein cationization techniques for artificial control of physical property of protein and their medical applications  
Junichiro Futami (Division of Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan)

## 一酸化窒素 (NO) 結合性 (S-ニトロシル化) タンパク質の網羅的同定

### 1. はじめに

NOはアルギニンからNO合成酵素(NOS)の作用により産生されるラジカル分子である。生体内において記憶形成や血圧コントロールなど多岐にわたる生理機能を担っている。NOの作用メカニズムはこれまで種々提唱されてきているが、とくに有力なものとしてNOが酵素や転写因子などのタンパク質に、直接あるいは間接的に酸化修飾を導入することが近年示され注目を浴びている。NO刺激に伴うタンパク質修飾には、1) チロシン残基へのニトロ化、2) ヘム鉄へのニトロシル化、3) システイン残基チオール部位へのニトロシル(SNO)化が知られている<sup>1)</sup>が、ごく最近、活性化グアニル酸シクラーゼから産生されるcGMPのニトロ化体(8-ニトロ-cGMP)を介したタンパク質システイン残基への修飾(S-グアニル化)が惹起されることも明らかにされている<sup>2)</sup>。

タンパク質に対する修飾はNO適量産生下では多くの場合可逆的であり、このことはNOがシグナル分子として作用していることを示唆している。事実、タンパク質に導入されたSNO基は自発(非酵素)的あるいは酵素(GSNOレダクターゼ、III型アルコール脱水素酵素)によって還元されたり<sup>3)</sup>、タンパク質分子間で転移(トランスニトロシル化)されることも知られている<sup>4)</sup>。

SNO化タンパク質を同定することは、NOが関与する酸化/還元による生体内シグナル調節分子機構を明らかにすることはもちろんであるが、同時にそれらが関与する生理的/病態生理的機構を提示することにもつながる。

SNO化タンパク質を効率よく検出するバイオチンスイッ