

速度論効果を利用する多段階蛋白質フォールディング促進

(東農工大院工¹・神奈川産技総研²) ○村岡 貴博^{1,2}

Protein Folding Promotion by Kinetically Controlled Multistep Reactions (¹*Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology*, ²*Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology*)○Takahiro Muraoka,^{1,2}

Folding is a critical reaction of proteins to acquire the biological functions. In the oxidative protein folding, disulfide bond formation between the native cysteine pairs allows for folding to the native forms, while misfolded forms are produced by the disulfide bonding between non-native cysteine pairs. Therefore, promotion of not only disulfide bond formation but also its shuffling is important for encouraging the folding into the native forms. In this study, thiol-based synthetic protein folding promoters have been developed. Inspired by protein disulfide isomerase (PDI), an enzyme promoting oxidative protein folding, synthetic compounds bearing activated thiol units with enhanced nucleophilicity and oxidizability have been designed. These chemical characteristics of the thiol unit are effective for prompting the protein folding, which afforded the native form proteins with significantly high yields. Molecular design and biochemical characterizations of the thiol compounds will be presented.

Keywords : Thiol; Protein Folding; Kinetic Effect; Disulfide; Redox

タンパク質は生命活動の中心を担う生体高分子であり、近年では、医薬品開発の主要物質としても注目を集める。遺伝子改変技術や、計算科学など、タンパク質構造の精密エンジニアリングを可能にする生物学・物理学アプローチが進展しつつある。タンパク質の機能発現には、その立体構造が密接に関わる。立体構造形成（フォールディング）を制御、促進する技術は、遺伝子改変技術によって設計された一次構造を、計算科学で予測される三次構造へ導くものであり、目的の生化学的機能を得る上で必要不可欠である。我々は、タンパク質のフォールディングプロセスを有機化学的にとらえ、低分子化合物を基盤とする化学的なフォールディング促進技術の構築を目指している¹⁾。

タンパク質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形成に加え、複数のシステイン残基を有する場合、共有結合であるジスルフィド(SS)結合形成を伴う。SS結合形成を伴うフォールディングは酸化的フォールディングと呼ばれ、SS結合を組むシステインペアによりタンパク質の立体構造は操作される。天然型システインペアによるSS結合形成は天然構造を与える一方、非天然型システインペアによるSS結合形成は非天然構造に導き、時に凝集体を形成する。SS結合を有するタンパク質は、抗体やインスリンなど多種に及び、その効率的なフォールディング促進は、学術、産業分野において重要である。

細胞内では、複数酵素が段階的に翻訳タンパク質に作用し、そのフォールディングを促進していることが近年報告されている²⁾。中でも、主に次の2つの素反応の連携が示されている。

i) SS 結合導入の促進 : ERp46 が触媒。粗雑ながらタンパク質に SS 結合を迅速に組み込む。

ii) SS 結合組替えの促進 : PDI が触媒。非天然型 SS 結合を天然型へと組み替える。

タンパク質が高濃度に密集する細胞内環境で酵素による多段階反応が行われており、我々はこの仕組みが、疎水部を表面露出した還元変性タンパク質の凝集を抑え、迅速なフォールディングを進めることに効果的であると着想した。つまり、ERp46 の作用により基質タンパク質を迅速に折り畳み、表面疎水性を低下させた後、PDI の作用により天然構造形成に至る多段階反応触媒の機序である。そこで本研究では、ERp46 と PDI それぞれ類似の作用を示す化合物を開発し、それらを連携させることで、凝集しやすい濃縮環境においてもフォールディングを促進する反応システムの構築を目指した。

Bovine Pancreas Trypsin Inhibitor (BPTI)をモデルタンパク質に用い、逆相 HPLC 分析によりフォールディング過程をモニターした。ERp46 模倣分子を加えたところ、添加後 1 分で還元変性体に対して迅速に SS 結合を導入する作用が観察されたが、殆どは非天然型へのジスルフィド結合の導入であった。PDI 模倣分子を用いたところ、ERp46 模倣分子と比較しゆっくりと還元変性体が減少し、60 分時点の天然構造収率が 66% まで向上した。興味深いことに、ERp46 模倣分子と PDI 模倣分子を段階的に加えることで、天然構造の収率が 98% まで飛躍的に向上し、両化合物の連携による相乗効果が示された。

次に、BPTI 濃度を 10 倍増加させた濃縮環境におけるフォールディング促進効果を評価した。還元変性体に対する PDI 模倣分子のみの添加では、反応開始直後に凝集体が形成された一方、ERp46 模倣分子添加では凝集が抑えられた。その後、PDI 模倣分子を添加すると、天然構造の収率が大きく向上した。単一化合物を用いる従来法に比べ、高い天然構造形成の収率だけでなく、高濃度条件でもフォールディングを促進する点で、本多段階反応システムの高い効果が示された。

1) S. Okada, M. Matsusaki, K. Arai, Y. Hidaka, K. Inaba, M. Okumura, T. Muraoka, *Chem. Commun.*, **55**, 759 (2019).

2) R. Kojima, M. Okumura, S. Masui, S. Kanemura, M. Inoue, M. Saiki, H. Yamaguchi, T. Hikima, M. Suzuki, S. Akiyama, K. Inaba, *Structure*, **22**, 431 (2014).