

《 解 説 》

ゼオライトを用いたタンパク質のリフォールディング

角田達朗*, 知久浩之**, 坂口謙吾**, 水上富士夫*

* 産業技術総合研究所コンパクト化学プロセス研究センター,

** 東京理科大学理工学部応用生物科学科

遺伝子の解読が進んだ現在、その遺伝子の持つ情報に従って合成されるタンパク質の機能解明が重要になっている。評価・解析のために限らず、タンパク質を合成しようとする場合、生物の力を借りることになる。分子生物学の進歩により大腸菌を用いたタンパク質合成法は、周辺技術の進歩も大きく比較的簡便でスケールアップも容易であり、経済性が認められる。しかしながら、この手法により合成したタンパク質は正しい高次構造を取れないことが多く、アミノ酸鎖を巻き戻す（リフォールディング）ことが必要になる場合が多い。リフォールディング手法は、近年盛んに研究されているものであるが、透析や希釈などの従来法によるものが多く、長い処理時間を必要とし、なおかつ汎用的であるものはほとんどない。そこでゼオライトの吸着性能を利用して、タンパク質を巻き戻す手法を新たに開発した。本手法には、処理時間が短く、なおかつ処理方法がタンパク質の違いに依存しない利点がある。アミノ酸鎖を一旦引き延ばしてゼオライトに吸着させ、その後剥離剤を用いることでリフォールディングを起こさせるものである。剥離剤に用いるバッファー組成の調整のみで、多様なタンパク質に対応できる可能性がある。大腸菌によるタンパク質合成を経済的に成立させるためには、汎用的なリフォールディング手法の確立がなくてはならず、今後の発展が期待される分野である。ゼオライトの新しい利用法として、新規なリフォールディング法を紹介する。

1. はじめに

生体内で実際に作用し機能しているのは、遺伝子ではなくその情報から作成されるタンパク質である。人の遺伝子の塩基配列の解読が済んだ現在、そこから作成されるタンパク質の機能について解明していくことが、今後、重要となる。人のタンパク質は3万種類近く存在すると言われているが、そのほとんどは何のための何をするタンパク質であるかが解明されていない。すなわち、タンパク質の機能・構造の解明・解析は、病気の治療や創薬に直結することになる。このため、種々のタンパク質を様々な方法

で合成・生産し、それらの構造を調べ、生体内における作用機構と役割を解明することが活発に行われている。これがゲノムの時代からプロテオームの時代に、といわれている所以である。タンパク質の機能解明には、タンパク質試料が大量に安価に入手できることが望ましく、それに寄与できる手法がゼオライトを用いたタンパク質のリフォールディング手法である。研究そのものが始まったばかりであることから、深い議論よりも周辺状況との関係などを中心に紹介させていただく。

2. タンパク質合成の概略

タンパク質は分子量数万から十数万を越える生体高分子であり、その合成はもっぱら生物細胞を用いて行われる。これらの技術を支えるのが、生命現象を分子の構造と機能、そしてそれらの相互作用を解明しようとする分子生物学である。分子生物学の発展と関連分野の技術革新により、遺伝子の組換え技術が確立され、比較的容易に目的のタンパク質が合

受理日：2006年4月11日

〒305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5
産業技術総合研究所コンパクト化学プロセス研究センター

e-mail: t.tsunoda@aist.go.jp

成できるようになった。タンパク質を構成するアミノ酸は20種類に限定される。生体内のタンパク質には20種以外のアミノ酸を含むものもあるが、それはタンパク質が合成された後で酵素によって修飾された場合である。すなわち、タンパク質の一次構造はこの20種のアミノ酸のペプチド結合による配列で規定される。二本鎖のDNAの一方の鎖を鋳型にして転写される分子がRNA（正確にはmRNA）である。一本鎖のRNAにおける塩基配列の3塩基（コドン）が一つのアミノ酸に対応する。RNAを構成する4種の塩基は、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、ウラシル（U）であり、その3塩基の配列（コドン）と20種のアミノ酸が対応している。その関係はコドン表に示される。タンパク質合成の場はリボソームであり、リボソームがRNAの塩基配列を読み取り、対応するアミノ酸を合成し、つなげてタンパク質を合成していく。この過程を翻訳と読んでいる。タンパク質の合成を開始させる、また終止させるコドンが存在しており、遺伝情報に従ったタンパク質が合成される。この分野の詳細は多くの書籍等にわかりやすい記述があるので、それらを参照されたい。

大腸菌を用いたタンパク質合成の実際は、まずプラスミドと呼ばれる環状DNAの中に目的タンパク質の合成情報の入った配列を組み込む。この用途に用いるプラスミド（ベクターと呼ばれる）は、多くの種類が用意されており、目的に合わせて選択が可能である。また、外部からの試薬による信号でタンパク質合成を開始するような機構やこのプラスミドを取り込んだ大腸菌が抗生物質に対する耐性を有するように機能する機構も備えている。抗生物質の入った培地で培養する際、抗生物質耐性を持たせた遺伝子組換えを施した目的の大腸菌のみが繁殖することができ、外部から混入する雑菌などを排除することができるわけである。このプラスミドを菌内に入れた大腸菌をある程度の数に増やした後、タンパク質合成開始の信号を送ると、大腸菌内にタンパク質が合成されることになる。つまり、この方法では、目的タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列が解明されていれば、その一次構造の合成は可能であり、またその後の処理や操作に必要な部位を付加することも可能ということになる。

タンパク質の合成には、大腸菌のほかに酵母や昆

虫細胞、哺乳動物細胞等の発現系が用いられる。それぞれの発現系には、おのおの特徴がある。昆虫細胞や哺乳動物細胞による合成では、得られるタンパク質は糖鎖の付加やリン酸化、アセチル化などの翻訳後修飾も施されて可溶性であることが多い。しかし、この方法は分離精製の操作が非常に煩雑で熟練を要するものであり、培養規模あたりのタンパク質発現量が少ないという欠点がある。結果としてコスト高となるばかりか、全工程に要する時間も月単位である。これに対して、大腸菌による合成は操作が簡単な上、目的タンパク質を得るのに要する期間は数週間程度で、培養規模あたりに得られるタンパク質も多く、経済性が認められる。このため、現在は目的タンパク質の合成を担う遺伝子コードを組み込ませた大腸菌を用いる方法がタンパク質合成の主流となっており、生産プロセスも確立されつつある。

しかしながら、大腸菌によるタンパク質合成にも問題点がある。大腸菌にタンパク質を合成させると言うことは、大腸菌が必要としない、あるいは本来合成しないタンパク質を作らせるということであり、すべてがうまくいくというものではない。大腸菌によるタンパク質発現では、翻訳後修飾はなく、高次構造も本来の形になることは少ない。ここでタンパク質の高次構造について触れておく。タンパク質の構造は、アミノ酸配列のみで規定されるものではなく、階層構造を有しており、一次構造から四次構造までが定義されている。一次構造はアミノ酸配列やその配列間のS-S結合などを含む。二次構造は α -ヘリックス、 β -シート、 β -ターンなどの水素結合による主鎖の局所的構造を指す。三次構造は二次構造が折り畳まれて形成される立体構造である。四次構造は三次構造を取った分子複数個により形成されるサブユニット構造を指す。タンパク質の機能は、一次構造すなわち、アミノ酸の配列・鎖長によって規定されるものでなく、三次、四次構造（高次構造）によって決まることは周知のことである。高次構造は機能発現と密接に関係しており、高次構造を変化させることで、機能を発揮したり停止したりなどの現象も数多く確認されている。

人など高等生物のタンパク質を大腸菌発現系で合成した場合、アミノ酸の結合順序や数すなわちアミノ酸鎖長に関しては設計どおりのタンパク質が得られるものの、その立体構造には秩序が無く高次構造

が制御されていない、すなわちアミノ酸鎖がもつれ絡まった、いわゆるインクルージョンボディと呼ばれる不溶性タンパク質が得られる。これはアミノ酸鎖の形成速度が鎖の折り畳みに対して速いことや合成されるアミノ酸鎖の数が多いことなどが原因となっている。当然のことながら、この不溶性タンパク質インクルージョンボディは、所定の機能・性能を持たず、活性を示さない。このため、大腸菌による生産プロセスでは、インクルージョンボディを解きほぐし、高次構造を整え、秩序だった立体構造を持つ可溶性タンパク質に変換する操作、すなわちインクルージョンボディのリフォールディング（巻き戻し）が必要である。この種のリフォールディング技術は、大腸菌生産タンパク質のみならず、熱履歴等ある種の原因で失活したタンパク質の再生にも応用できる重要な技術と考えられる。大腸菌発現系を用いたタンパク質合成の経済性確保のためには、それに適合したリフォールディング技術の確立が必要である。

3. リフォールディング法の現状

前節で示したように、大腸菌発現系にはリフォールディング技術を欠くことは出来ない。

Monash大学のホームページ上にリフォールディング実証例のデータベースが公開されている (<http://refold.med.monash.edu.au/>)。平成18年3月現在430件のタンパク質のリフォールディング例が紹介されているが、そのうちの80%以上が、透析および希釈とその複合による方法である。透析や希釈は最も古くから良く用いられているリフォールディング法である。前者は、タンパク質を界面活性剤や変性剤を含む水溶液に溶かし、これを界面活性剤や変性剤を含まないバッファー（緩衝液）で透析することで、界面活性剤や変性剤の濃度を下げて、タンパク質をリフォールディングするものである。変性剤はアミノ酸鎖間の水素結合を切る作用をしており、界面活性剤はそれぞれのアミノ酸鎖を絡まない状態にしていると理解できる。それらの成分が減少することで、タンパク質のリフォールディングを起こさせている。後者ではタンパク質を界面活性剤や変性剤を含む水溶液に溶かした後に、これを単に希釈して行くことで界面活性剤や変性剤の濃度を下げリフォールディングさせることが行われている。言

うまでもなくデータベースが示すように、個々のタンパク質の状態に合わせて、透析や希釈の条件、特にバッファーの組成などを設定しており、多種多様なタンパク質に対して同一条件というわけには行かない。汎用性を狙った典型例として、Hampton Research社製FoldItキットなどをあげることが出来る。Hampton Research社のキットによる操作法では、Ligand binding domains from glutamate and kainate receptors, Lysozyme, Carbonic anhydrase Bなど限られたタンパク質でリフォールディングが起こることが確認されている²⁾に過ぎず、十分な適用例があるとは言い難い。基本的な機構は同様であるが、界面活性剤Sodium N-lauroyl sarcosinate溶液にグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質を溶かし、それを1~2%のTriton X-100（界面活性剤）で希釈し巻き戻す³⁾など希釈剤を用いた例もある。

リフォールディングに吸着分離カラムを用いることも試されている。尿素・塩酸グアニジンで変性させたタンパク質、チオレドキシンをゲル濾過にかけると、ゲル濾過中にその巻き戻りが起こる⁴⁾。しかし、リフォールディングは必ずしも十分ではなく、他のタンパク質では満足できる結果が得られないことが多い。この方法は基本的に透析や希釈と同様、バッファーの交換によるものである。バッファー交換だけでなく、構造が壊れたタンパク質の巻き戻しを促進するタンパク質の一種である分子シャペロン*の機能を複合させた方法も提案されている。分子シャペロンGroELを固定したカラムに、8 Mの尿素で可溶化したタンパク質を吸着させ、塩化カリウムと尿素をそれぞれ2 M含む溶液で溶離すると、溶離タンパク質の巻き戻りが起こる⁵⁾。しかし、Cyclophilin Aなど極めて限られたタンパク質で認められているに過ぎない。そもそも分子シャペロンとタンパク質の組合せは限定的なものであるからである。また、リフォールディング促進に関与すると考えられるタンパク質3種、GroEL、DsbA

* 単にシャペロンとも言う。細胞内で合成されたタンパク質の折り畳みを助ける一群のタンパク質。現在では、折り畳みに限らず様々な細胞の制御にも関わっていることが明らかになっている。

(大腸菌の disulfide oxidoreductase) および PPI (human proline cis-trans isomerase) を同時に固定した樹脂に、塩酸グアニジンで変性したタンパク質 Scorpion toxin Cn5 を混ぜると、このタンパク質の巻き戻りが樹脂上で起こる⁶⁾ことも報告されているが、これについては Scorpion toxin Cn5 などの特定タンパク質にしか適用できない欠点に加え、タンパク質3種を固定した樹脂の調製が煩雑で価格的にも高く付くという問題もある。カラム上の固定物質として巻き戻したタンパク質の代わりに金属キレートを用いる場合もある。ニッケルキレートを固定した樹脂に、塩酸グアニジンと尿素を含む水溶液で溶解変性した His6-タグ融合タンパク質を吸着させ、変性剤を含まないバッファーで洗うと、該融合タンパク質の巻き戻りが起こる⁷⁾。本法の適用がこのタンパク質に限られることと、樹脂の調製が煩雑で高価格になることは同じである。

人工シャペロンとして β -シクロデキストリンやシクロアミラーゼを用い、このシャペロン溶液に界面活性剤で変性したタンパク質を混ぜると、界面活性剤の人工シャペロンによる取り込み除去が生じ、この過程でタンパク質が巻き戻るとの報告⁸⁻¹⁰⁾もある。しかし、carbonic anhydrase B などで成功しているに過ぎず、シャペロンは使い切りであるため、タンパク質を大量に処理することは非現実的である。

種々の方法が提案されているが、それらのほとんどはリフォールディング率が低いうえに、ある限定されたタンパク質（とくに分子量の低い特定タンパク質）に対して偶発的に好ましい結果が得られたに過ぎないことも多く、種々のタンパク質に適用可能な一般性、普遍性のある、しかもリフォールディング率の高い効率的な方法となっていない。合成タンパク質の経済性を確保するためには、鎖長の長短を問わず種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用可能な一般性、普遍性の高い、低コストの高効率リフォールディング法の開発が望まれることになる。

4. ゼオライトを用いたリフォールディング法

タンパク質の吸着に対して、今までに用いられてきた無機材料としては、主としてリン酸系の材料がある。リン酸カルシウムゲルとその結晶形であるハイドロキシアパタイトが代表である。ハイドロキシ

アパタイトは2本鎖DNAと1本鎖DNAに異なる親和性を示し、その分離に用いることができた¹¹⁾。これがタンパク質精製の吸着体としても用いられる。タンパク質を吸着した後、リン酸イオンの濃度勾配によってそれを溶出することができ、タンパク質の精製に利用可能である。一方、ゼオライトの吸着機能は、気体液体の脱水・乾燥など広範に利用されているものである。工業分野においては、吸着のみならず分離・精製材としての利用も著しい進歩を見せている。しかしながら、生体材料への利用例は必ずしも多いものではない。ゼオライトによるタンパク質の吸着に関する報告¹²⁻¹⁷⁾は、数例を認めることができるが、吸着機構に踏み込んだ検討は認められない。そこで、DNA、RNA、タンパク質等バイオポリマーのゼオライト等金属酸化物上への吸着状況を詳細に調べた¹⁸⁻²⁰⁾。その研究の過程で、大腸菌等の発現系で生産した高次構造未形成タンパク質あるいは熱履歴等ある種の原因で失活したタンパク質を β -ゼオライトで処理すると、それらタンパク質が本来の機能・活性を示すようになることを見出し、タンパク質のリフォールディングを都合よく行わせている現象を確認した²¹⁾。

以下に、ゼオライトを用いたリフォールディング法とその事例について紹介する。基本的なスキームを図1に示す。大腸菌発現系で得られた不溶性のタンパク質いわゆるインクルージョンボディを変性剤により溶解する。この溶液にゼオライトを混合し、ゼオライトに変性状態のタンパク質を吸着させる。溶液とゼオライトを遠心分離などの方法により分離し、界面活性剤を含む溶液と置換して、ゼオライトから吸着タンパク質を剥離させる。剥離の際、リフォールディングが完了し、その後はアフィニティークラムなどを用いてタンパク質を精製し、活性の測定を行う。

4.1 インクルージョンボディの作成と変性剤による溶解

ここではDNA複製に関与するタンパク質RPA70 (replication protein A 70) について示す。大腸菌に遺伝子を運搬する役割のベクターに、このタンパク質をコードする配列を遺伝子操作により組み込む。このベクターを一度、プラスミドコピー用の大腸菌に導入する。この大腸菌を培養して、先のベクター

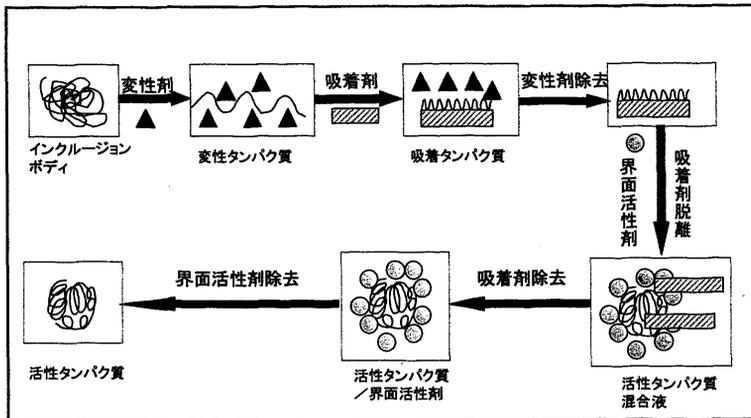


図1 リフォールディングの基本的スキーム

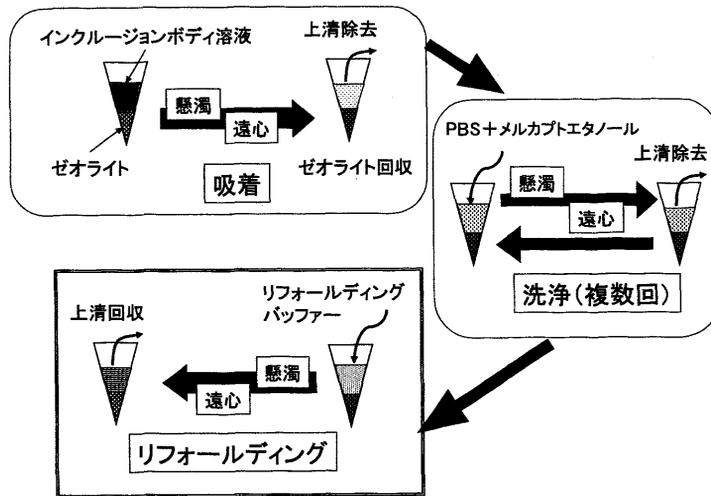


図2 リフォールディング操作の実際

を増やし回収する。通常、タンパク質の発現前にベクターを増やす操作を行っている。このベクターを今度はタンパク質発現用の大腸菌に導入し、寒天培地の上でコロニーを形成させる。所定のタンパク質が発現していることが確認できたコロニーから大腸菌を液体培地に移し、タンパク質を発現させる。所定の培養時間の後、遠心分離によって菌体を回収する。菌体を洗浄後、大腸菌の膜を溶解させる酵素を加えると共に、超音波により菌体を破碎し、菌体内のタンパク質を遊離させる。これを遠心分離することにより、インクルージョンボディが回収される。インクルージョンボディに対しても洗浄処理を行った後、6 M 塩酸グアニジンと 20 mM β-

mercaptoethanol, PBS (phosphate-buffer saline) を加え溶解する。塩酸グアニジンはアミノ酸鎖間の水素結合を切る働きをし、もつれ合ったアミノ酸鎖を解くことになる。

4.2 ゼオライトへの吸着とリフォールディング操作 (図2)

変性剤により溶解されたタンパク質溶液にゼオライトを加え、タンパク質を吸着させる。用いたゼオライトは、東ソー製β-ゼオライト (Na-BEA, SiO₂/Al₂O₃ 比 27) をはじめ多様なものを用いた。ゼオライトの種類は、結果と共に表1に示す。ゼオライト溶液をチューブに入れて、巡回ミキサー

表1 リフォールディングタンパク質の活性回復ゼオライト依存性

タンパク質吸着剤	活性 (fmol)
Na-BEA	258
Ga-BEA	143
Fe-BEA	59.6
H-Y	16.4
MCM-22	14.4
H-USY390	10.7
K-LTL	2.90
カネマイト	2.46
HOM (pore 6mm)	2.38
ZSM-5	2.22
ハイドロキシアパタイト	1.76
K-FER	1.71
RUB-15	1.63

タンパク質：RPA70, リフォールディングバッファー組成：50 mM HEPES, pH7.5, 1 % Tween20, 0.5 % PEG20k, 20 mM メルカプトエタノール

(20 rpm 程度) で30分から3時間程度、緩やかに懸濁状態を維持する。その後、遠心分離によりゼオライトを沈降させ分離する。タンパク質の吸着したゼオライトを20 mMのβ-mercaptoethanolを加えたPBSで再度懸濁し遠心分離する操作を4回繰り返し洗浄する。次にタンパク質を脱離させる溶液(リフォールディングバッファー)を加える。組成は、50 mM HEPES (pH 7.5)(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 0.5 M NaCl, 0.5 % (w/v) polyethylene glycol (PEG) 20000, 20 mM β-mercaptoethanol, 1 % (v/v) Tween 20を用いた。先と同様に10時間程度回転ミキサーで懸濁状態を維持し、タンパク質を脱離させる。途中、適宜アフィニティーカラムによるタンパク質の精製を行い、大腸菌が本来有するタンパク質(不純物)などを除去する。

4.3 タンパク質の定量と活性評価

タンパク質の定量には主にブッラドフォード法²²⁾を用いた。操作の各段階で溶液中のタンパク質を定量することで、吸着や脱離の状況を確認した。リフォールドしたタンパク質の活性は、ゲルシフト法により評価した。今回用いたタンパク質RPA70は、DNAの複製に関与するタンパク質のため、その活性があればDNAと結合する。このためポリアクリルアミド電気泳動を利用して、タンパク質とDNA

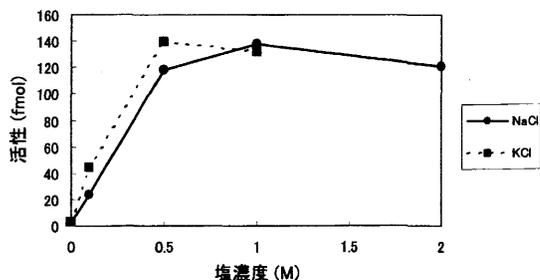


図3 リフォールディングバッファーにおける塩濃度の影響。
タンパク質：RPA70,
リフォールディングバッファー：NaCl or KCl
+50 mM HEPES, pH 7.5 +1 % Tween20
+0.5 % PEG20k +20 mMメルカプトエタノール

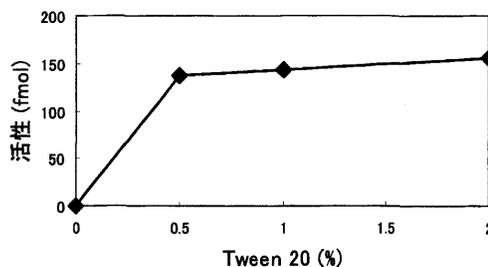


図4 リフォールディングバッファーにおける界面活性剤濃度の影響。
タンパク質：RPA70,
リフォールディングバッファー：Tween20
+50 mM HEPES, pH 7.5 +0.5 % PEG20k
+0.5 M NaCl +20 mMメルカプトエタノール

の結合の状況が評価できる。すなわち、タンパク質にDNA結合活性がある場合、DNAにタンパク質が結合し、見かけ上分子量が増大し移動度が小さくなる。これにより電気泳動が遅くなりバンド(ゲル上での位置)がシフトするので、活性が判定できる。バンドの検出は、同位体を用いたオートラジオグラフィによる。

4.4 リフォールディング操作の結果

表1に用いたゼオライトとリフォールディングされたタンパク質の活性を示す。タンパク質はRPA70で、ゲルシフト法によりDNA結合活性を評価した。ゼオライトの種類により大きな差があり、β-ゼオライトの性能が飛び抜けて高いことが分かる。骨格構造への置換元素の影響なども認められる。ここで、先のリフォールディング操作条件設定までの検討を

表2 リフォールディング促進因子の影響

リフォールディング因子	活性 (fmol)
なし	0.434
0.5% PEG20K	122
0.5% PEG8000	109
1.0% PEG3350	97.6
1.0% PPG2000	12.0
5.0% PPG400	5.85
5.0% Ficoll70	0.395
10.0% Ficoll400	0.360
10.0% スクロース	0.129
0.1% β -シクロデキストリン	0.112
10.0% グルコース	0.087
10.0% グリセロール	0.0225
10.0% ポリリン酸	0
5.0% myo-イノシトール	0

タンパク質：RPA70,
リフォールディングバッファー：
リフォールディング促進因子成分,
+50 mM HEPES, pH7.5+1% Tween20,
+0.5% PEG20k+20 mMメルカプトエタノール
遊PEG：ポリエチレングリコール, PPG：ポリプロピレングリ
コール)

紹介する。まず、リフォールディング時の溶液組成について、塩類の濃度および界面活性剤の濃度の影響を調べた。それぞれのパラメータのみを変化させ、回収された、すなわちリフォールドされたタンパク質の活性を図3、図4に示す。界面活性剤や塩類の共存は、必要量までは効果が期待されるが、ある値を越えるとタンパク質そのものの活性にダメージを与えるようになり、必要以上の共存は避けなければならない。そういった意味での最小量をこれらの結果から掴むことができた。また、表2には、やはり同様にリフォールディング促進因子と考えられるPEGとそれ以外の添加した物質の効果を示した。これらの検討は、生化学の実験においてバッファーの作成時等に経験的に効果が期待され、広く用いられているものを対象として検討を加えたものである。それぞれの効果が明確になっていないものもあり、それらの情報と合わせてより詳細な検討が必要であることは言うまでもない。ただ、実験的には条件を変化させることは困難ではなく、時間的な問題に帰着できる。

先にも示したが、タンパク質のリフォールディングには、透析および希釈、それとこれらを組み合わせた方法が一般的である。RPA70に関しては、可溶

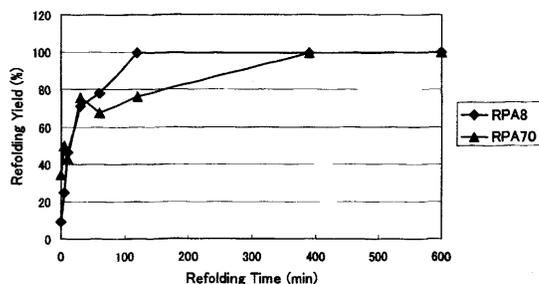


図5 リフォールディングの処理時間依存性。

タンパク質：RPA8, RPA70,
リフォールディングバッファー：
50 mM HEPES, pH7.5, 1% Tween20, 0.5 M NaCl
0.5% PEG20k, 20 mMメルカプトエタノール

性のタンパク質、すなわちきちんとフォールディングしたタンパク質の大量入手が困難なため、天然型との活性比較はできないが、透析による方法とゼオライトによる方法の結果を比較した。リフォールドできたタンパク質の割合は、それぞれ57.6%と32.5%であった。一方、それぞれの比活性は60.5 nmol/mgと357.0 nmol/mgになった。結論として、ゼオライトによる方法は、リフォールドできた割合は低かったが、最終的に重要な比活性は優位であった、ということになる。大腸菌によるタンパク質産生は、スケールアップが容易であり、リフォールドできる割合や回収できる割合よりも、きちんとした活性を有するタンパク質が取れるかどうか重要になる。さらに、ゼオライトからの脱離によるリフォールディングに要する時間を検討した。結果を図5に示す。リフォールディングバッファーを加えて2時間程度でリフォールディングが終了していることが分かる。この時間は透析や希釈法に要する時間と比較すると10分の1程度である。処理に要する時間的な優位性は、ゼオライトによる方法にあることが分かる。この手法を他のタンパク質にも適用し、11種について有効であることを認めた(表3)。さらに、表中のRPA8 (replication protein A 8) について、本法によるリフォールディングタンパク質と天然型とをNMR測定で比較したところ、一次元、二次元スペクトルとも極めてよく一致した。これは、本法では生化学的のみならず構造的にも活性な、すなわち本来の正しい高次構造を取るタンパク質が得られることを示している²³⁾。

上記適用例は、タンパク質の種類の高さやその多

表3 リフォールディングの適用例

タンパク質	由来	分子量	リフォールディング前の状態	可溶化	活性	タンパク質回収率
RPA8	ショウジョウバエ	12kD	インクルージョンボディ	○	— (NMR)	45%
P53	ヒト	44kD	インクルージョンボディ	○	○	<10%
RadA ($\Delta 1-169$)	イネ	50kD	インクルージョンボディ	○	○	<10%
RadA	イネ	66kD	インクルージョンボディ	○	○	<10%
RPA70	ショウジョウバエ	67kD	インクルージョンボディ	○	○	33%
DNA ligase I	ヒト	105kD	インクルージョンボディ	○	○	24%
DNA polymerase α p180 core domain	マウス	110kD	インクルージョンボディ	○	○	<10%
DNA polymerase δ ($\Delta 1-50$)	イネ	119kD	インクルージョンボディ	○	○	<10%
Topoisomerase I	ショウジョウバエ	135kD	インクルージョンボディ	○	○	26%
XPG	ショウジョウバエ	139kD	インクルージョンボディ	○	○	17%
DNA polymerase α p180	マウス	180kD	インクルージョンボディ	○	○	<10%

様性を考えると決して十分な量ではないが、現在も有効事例は増えつつあり、また、分子シャペロンのように個々のタンパク質に対して、厳密に試薬を準備することもないので、おそらく、操作条件を変えることなどで、多様なタンパク質に対応できる汎用的操作となる可能性が極めて高い。先にも示したように、条件の最適化を行うことで、ゼオライトを用いた方法を、大腸菌発現系を用いたタンパク質合成の経済性確保のために寄与できるものと考えている。

5. 終わりに

現在のところ、ゼオライトと変性タンパク質との相互作用について、ハイドロキシアパタイトとの相互作用ほどの解釈はできていない。ゼオライトの骨格構造の他、内包されるカチオンや残存するプレートの影響も認められる。そもそもタンパク質のフォールディングに関する研究が盛んになったのもそれほど古いものではなく、詳細な検討は現在進行形である。このあたり、詳細に触れることができなかったことはご容赦願いたい。処理に要する時間や最適化のための条件振りが、実験的に困難なことは少なく、今後の進展は確実である。ゼオライトの生体高分子への利用という新しい分野の発展を期待し

たい。

文 献

- 1) たとえば、前野正夫、磯川桂太郎、「はじめの一步のイラスト生化学・分子生物学」羊土社、(1999); 田村隆明、山本 雅、「分子生物学イラストレイテッド」羊土社、(1998)など。
- 2) N. Armstrong, A. de Lencastre, and E. Gouaux, *Protein Sci.*, **8**, 1475 (1999).
- 3) J. V. Frangioni and B. G. Neel, *Anal. Biochem.*, **210**, 179 (1993).
- 4) W. Shalongo, R. Ledger, M. V. Jagannadham, and E. Stellwagen, *Biochemistry*, **26**, 3135 (1987).
- 5) M. M. Altamirano, R. Golbik, R. Zahn, A. M. Buckle, and A. R. Fersht, *Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3576 (1997).
- 6) M. M. Altamirano, C. Garcia, L. D. Possani, and A. R. Fersht, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 187 (1999).
- 7) K. Hancock, *Life Science News (Japan Ed.)*, **3**, 6 (2001).
- 8) D. Rozema and S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2373 (1995).
- 9) D. Rozema and S. H. Gellman, *J. Biol. Chem.*, **271**, 3478 (1996).
- 10) S. Machida, S. Ogawa, S. Xiaohua, T. Takaha, K. Fujii, and K. Hayashi, *FEBS Lett.*, **486**, 131 (2000).
- 11) N. Okuyama, T. Ogawa, and M. Ebihara, *Gypsum &*

- Lyme*, **210**, 65 (1987).
- 12) Y. C. Huang, Y. C. Yu, and T. Y. Lee, *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 564 (1995).
 - 13) Y. C. Huang, Y. C. Yu, and T. Y. Lee, *Biotechnol. Prog.*, **14**, 332 (1998).
 - 14) D. Klint and H. Eriksson, *Protein Expression Purif.*, **10**, 247 (1997).
 - 15) D. Klint, G. Karlsson, and J.-O. Bovin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2560 (1999).
 - 16) D. Klint, P. Arvidsson, Z. Blum, and H. Eriksson, *Protein Expression Purif.*, **5**, 569 (1994).
 - 17) S. Ghose and B. Mattiasson, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **18**, 311 (1993).
 - 18) F. Mizukami, H. Izutsu, T. Osaka, Y. Akiyama, N.Uiji, K. Moriya, K. Endo, K. Maeda, Y. Kiyozumi, and K. Sakaguchi, *J. Chromatogr. A*, **697**, 279 (1995).
 - 19) M. Matsui, Y. Kiyozumi, T. Yamamoto, Y. Mizushina, F. Mizukami, and K. Sakaguchi, *Chem. Eur. J.*, **7**, 1555 (2001).
 - 20) K. Sakaguchi, M. Matsui, and F. Mizukami, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 306 (2005).
 - 21) H. Chiku, M. Matsui, S. Murakami, Y. Kiyozumi, F. Mizukami, and K. Sakaguchi, *Anal. Biochem.*, **318**, 80 (2003).
 - 22) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
 - 23) H. Chiku, A. Kawai, T. Ishibashi, M. Takehara, T. Yanai, F. Mizukami, and K. Sakaguchi, *Anal. Biochem.*, **348**, 307 (2006).
-

A Protein Refolding Technique using Zeolites

Tatsuo Tsunoda*, Hiroyuki Chiku**, Kengo Sakaguchi**, and Fujio Mizukami*

* Research Center for Compact Chemical Process, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

**Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo

We presented a simple and effective refolding method using a zeolite. This method involves in a three-step procedure. First step is the denature and solubilization of inclusion body proteins. Second step is the adsorption of solubilized protein onto the zeolite. Final step is the desorption of the protein from the zeolite and the protein is refolded successfully under well-controlled conditions. The refolded proteins are biochemically active, and NMR spectrum supports that refolding is correctly performed. This method can be simple and widely applied to any denatured proteins. In the postgenomics era, this refolding technique contributes to the good combination with recombinant system of *Escherichia coli* that produces economically many proteins.

Keywords: refolding, zeolite, protein, inclusion body, recombinant, *Escherichia coli*