

# リポソームと人工シャペロン

— ストレス応答型機能材料の設計 —



久保井 亮 一\*

## Liposomes and artificial chaperones

— Design of stress-responsive functional materials —

**Key Words :** liposome, chaperones, refolding, bio-sensor, chromatography, protein, stress

### 1. はじめに

細胞が通常 conditions で生産、分泌するタンパク質の量は限られるため、医薬、食品工業で利用される有用タンパク質は、遺伝子組換え技術を利用して、大量生産する方法がとられている。このような高発現系で得られるタンパク質は、間違ったフォールディング過程を経て不溶化し、生物活性をもたないため、この不溶化したタンパク質(インクルージョンボディ)を一旦変性剤などで可溶化および還元した後、変性剤を除去し再活性化(リフォールディング)するプロセスが必要である。従来のリフォールディング方法(希釈法、透析法、限外濾過膜を用いる方法など)は、収率、スケールや所要時間、得られるタンパク質濃度、汎用性、操作性の点で一長一短があり、リフォールディング前後の目的タンパク質の精製プロセスを含めると、多段の操作と多大のエネルギーが必要となるのが現状である(図1(左))。

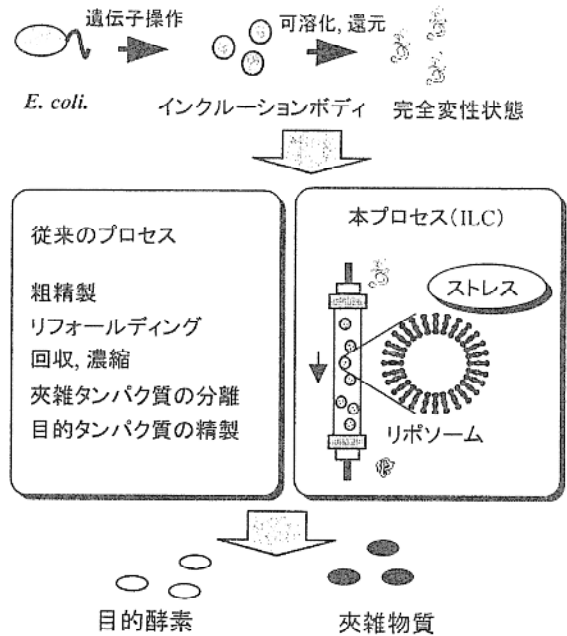


図1 リポソームクロマトグラフィーを利用するインクルージョンボディからのタンパク質のリフォールディング・分離プロセス

\*Ryoichi KUBOI  
 1946年2月14日生  
 1974年大阪大学大学院・基礎工学研究科・化学系専攻(博士)修了  
 現在、大阪大学大学院基礎工学研究科、化学系専攻、機能材料設計学講座、教授、工学博士、化学工学、生物機能材料設計  
 TEL 06-850-6271  
 FAX 06-850-6271  
 E-Mail kuboi@cheng.es.  
 osaka-u.ac.jp



リン脂質を水中に分散させると、二分子膜からなる閉鎖小胞体、すなわちリポソームを自己集成的に形成する。リポソームは生体膜と同様の基本構造をもつことから、膜の物理化学的特性の解析、生体機能を抽出、再構成する場として利用されてきた。また、薬物担体を始めとする機能材料としての応用研究も多分野で進んでおり、最近ではリポソームの微小な内水相を利用するマイクロバイオリアクターリや、機能性膜タンパク質を組み込んだ光エネルギー変換素

子<sup>2)</sup>、バイオセンサープローブの開発<sup>3)</sup>などについても検討されている。また、リポソームをゲル粒子に固定化した担体やジャイアントリポソームの調製法の開発などにより、リポソームの利用分野はさらに拡大しつつある。

我々は、外部環境因子を敏感に認識し、自己組織的に特性・機能を変化させて応答する脂質二分子膜(リポソーム)の動的な機能に着目し、リフォールディングを介助し促進する分子シャペロンを模倣した人工シャペロン、選択的分離材料、さらには新規なドラッグデリバリーシステム(DDS)や環境ストレスセンサーを始めとする環境ストレス応答型の機能材料と、それを利用した環境調和型のバイオ生産分離プロセスの設計・開発を試みている。すなわち生体膜の種々のストレス応答機能を再構成・複合利用する場として、モデル細胞膜であるリポソームを利用する。また、図1(右)に示すように、リポソーム固定化担体(ILC)を人工シャペロンとし、さらに、誘電率変化を利用するストレス応答挙動のオンラインセンシング技術との複合化により、遺伝子組換え菌の生産する、インクルージョンボディからのタンパク質のリフォールディングによる、効率のよい活性タンパク質の生産分離プロセスの構築が可能となる。

工業的に利用できる人工シャペロンを設計する際重要となるのは、汎用性、生産コストの低減、耐久性、再利用の可否である。リポソームは安価な脂質を用いれば大量生産が可能で、目的タンパク質に応じた表面特性の改変も容易であること、また、ストレスに対する安定性も高いなど、タンパク質である分子シャペロンや合成界面活性剤に比べ、工業的規模で利用できる可能性が極めて高い材料であると考えられる。

## 2. リポソームを利用するストレス応答型機能材料の設計、およびそのバイオ生産分離プロセスにおける高度利用

### 2.1 細胞のストレス応答

細胞は、脂質膜を介して環境変化を認識し、それに対して自己組織的・協同的に応答する機能を備えている。例えば、環境からの情報が物理的(熱、圧力変化など)、化学的(有機溶媒、

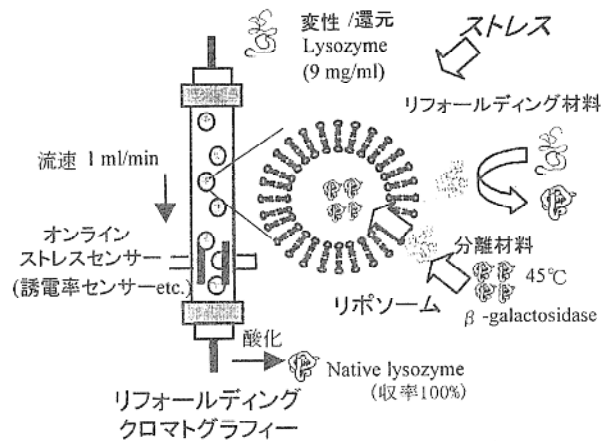


図2 リポソームのストレス応答機能とその高度利用

界面活性剤や環境汚染物質)あるいは生物学的(溶菌酵素、ウイルスなど)ストレスである場合は、細胞は、ストレスタンパク質の生産、各種代謝過程の調整あるいは膜流動性を変化させるなどしてストレスに対して能動的に反応し、細胞内の環境を修復する。すなわち、細胞機能を制御することは、それを誘発する環境因子を制御することでもある。

細胞外の情報は、脂質膜を介して細胞内に伝達されるため、脂質膜の機能は細胞の環境ストレス応答機能を議論する上で最も重要な因子の一つである。実際、細胞膜には、イオンやアミノ酸などのキャリアタンパク質やエネルギー変換タンパク質など、細胞機能の維持に必要な不可欠な多くの要素が組み込まれている。また、それらの膜タンパク質の機能の発現には、脂質膜がもつ、流動性に富んだ両親媒性の環境など、脂質膜独特の物理化学的特性が深く関与している。

環境調和型のバイオ生産分離プロセスを構築するためには、遺伝子・タンパク質レベルから分子集合体・細胞膜、さらには細胞・組織レベルまでの各階層において、生体系の示す高度な機能を細胞-環境因子間相互作用による環境ストレス応答として統一的に捉え、その相互作用機構、制御法を確立することが必要である。

### 2.2 リポソームのストレス応答機能の評価・制御

工業的規模でのリフォールディングプロセスで問題となる収率の低下は、リフォールディン

グ初期に生成する、疎水性の高いタンパク質が分子間で凝集体を形成するのが最大の原因である。タンパク質の分子間相互作用を制御して、高タンパク質濃度条件下でもリフォールディング収率を向上させるための添加剤としては、ストレスタンパク質などの生体由来のリフォールディング助成タンパク質(分子シャペロン)や合成界面活性剤、ポリマーなどがあるが、分子シャペロンの場合には、それ自身の生産、精製過程が煩雑で、従って非常に高価であることや、耐久性、リサイクルの点で問題がある。また、界面活性剤やポリマーを用いる方法も、精製段階で添加物とタンパク質の分離に多大のエネルギーを消費したり後続処理が問題になる場合が多い。

以上の理由から、工業的規模でタンパク質のリフォールディングを短時間で効率的に行うための人工シャペロンの設計、およびそれを有効利用するプロセスの開発が現在の医薬、食品工業では緊急の課題となっているが、リポソームの高度利用は各方面で大きな期待を集めている。

### 2.2.1 ストレス応答の解析手段

環境ストレス応答型の人工シャペロンやリフォールディングプロセスを設計するためには、まず、生産分離対象となるタンパク質の環境ストレス

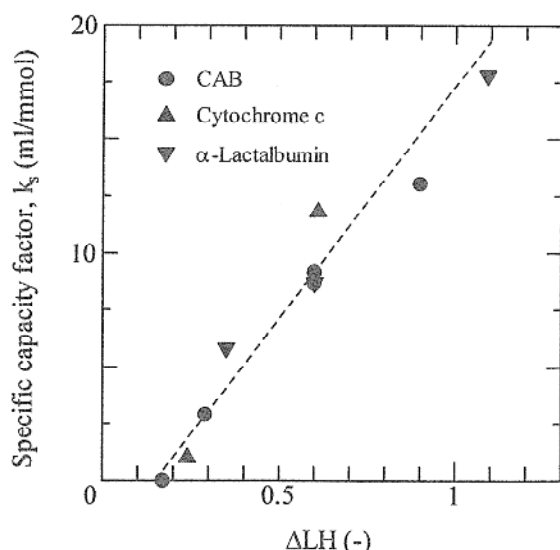


図3 タンパク質の局所的疎水性の native 状態からの増分 ( $\Delta LH$ ) と、リポソームクロマトグラフィーにおける  $k_s$  [ml/mol] 値の関係 ( $k_s = (V - V_N) / P$ ,  $V_N$  は native 状態のタンパク質の溶出体積 [ml],  $P$  は、固定化脂質量 [mmol], CAB; 炭酸脱水酵素)。

応答挙動および脂質膜との相互作用を解析する必要がある。特に個々のタンパク質の構造変化および脂質膜との相互作用を定量的かつ統一的に評価する手法が必要である。本研究では、水性二相分配法および固定化リポソームクロマトグラフィー (Immobilized liposome chromatography; 以下 ILC とする (図 2)) を解析手段として利用する。水性二相分配法の有効性は、すでに報告されているので<sup>4)</sup>、ここでは ILC について述べる。

リポソームあるいは膜タンパク質などの両親媒性分子を組み込んだプロテオリポソームのゲルへの固定化に関しては、立体的封じ込め法、透析法、Avidin-biotin 結合法など様々な方法が提案されている<sup>5,6)</sup>。また、リポソームを固定相として利用することで、薬物やペプチドなどの低分子量物質と脂質膜との静電的・疎水性相互作用がクロマトグラフィーにおける分配係数から定量的に解析可能である。また、グルコース輸送膜タンパク質の機能解析、荷電したリポソームを固定相とした、一種のイオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質の相互分離も可能であるなど、その応用範囲は広い<sup>5)</sup>。

最近、我々は、工技院融合研・三宅グループと共同で、浸透圧や高温条件などのストレス条件下でも安定な、リポソームの新規な固定化方法(共有結合法)を開発し<sup>7)</sup>、この担体が脂質膜とタンパク質のストレス条件下における相互作用の解析、あるいはタンパク質の構造変化を追跡する手段として有効であることを示した。この方法により、例えば、定性的知見に留まっていた脂質膜と構造変化したタンパク質との動的かつ微少な相互作用を定量的に解析することができる<sup>7)</sup>。本 ILC は、後述のように相互作用の解析手段としてだけでなく、ストレス応答を利用するバイオ生産分離プロセスにおいても利用可能である。

### 2.2.2 タンパク質-脂質膜間相互作用の解析

タンパク質、リポソームは共に、通常はそれぞれ疎水性の高いアミノ酸、炭素鎖を核として分子や分子集合体としての立体構造を形成している。熱や pH、浸透圧などのストレス条件下では、構造上の揺らぎが誘発されるため、内部

の疎水部位が動的に水分子と接触できるようになる。この場合、タンパク質やリポソームの表面特性の変化は、動的な疎水部位、すなわち局所的疎水性(LH[-])の増加  $\Delta LH$  として、Triton X-114 や 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid (ANS) などの疎水性プローブを用いた水性二相分配法、蛍光法あるいは ILC により定量化できる<sup>4,7)</sup>。この揺らぎによってつくりだされる局所的疎水部位は、静的な表面全体の疎水性とは区別される特性である。脂質膜の流動性(揺らぎ)と局所的疎水性の定量的な相関関係<sup>8)</sup>や、様々なストレス条件の規格化によるタンパク質の局所的疎水性変化の統一的評価、制御についてもすでに検討されている<sup>9)</sup>。また、脂質膜とタンパク質とのストレス条件下における相互作用に関しては、ILC におけるキャパシティーファクター( $ks$  [ml/mmol])により定量的に評価可能である。 $ks$  値すなわち相互作用の大きさは、脂質膜、タンパク質双方の局所的疎水性の大きさに依存する。例えば、炭酸脱水酵素のモルテングロビュール状態(2次構造は native 構造とほぼ同様であるが3次構造が崩壊している状態)やジスルフィド結合を還元したリゾチーム、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、リボヌクレアーゼ A は高い局所的疎水性をもち、従って脂質膜との相互作用が強いことを定量的に示

すことができる<sup>10)</sup>。また、図3に示すように、タンパク質の天然構造からの局所的疎水性変化( $\Delta LH$ )と  $ks$  値の間には、タンパク質の種類によらない統一的な関係が成立することも見出されている。以上の知見は、ストレス因子でタンパク質と脂質膜との相互作用を制御する際の重要な指針となる。

### 2.3 リポソームのストレス応答機能とその高度利用

脂質膜とタンパク質の間に観測される相互作用は脂質膜表面での構造変化、複合体の形成、膜透過、さらにはタンパク質が引き起こす膜融合など様々である(図4)。通常脂質膜と相互作用しない水溶性のタンパク質においても、変性剤や熱、pH などのストレスにより構造変化が誘発された場合、上述の相互作用が生じる<sup>11,12)</sup>。図4の各相互作用の形態は、タンパク質と脂質膜の局所的疎水性の大きさで決定される相互作用の強度(ILC における  $ks$  値)に依存すると考えられる。すなわち、相互作用が弱い場合から強い場合の順に、1. 脂質膜表面におけるタンパク質の構造変化、2. 脂質膜-タンパク質複合体形成、3. タンパク質の膜透過、4. タンパク質介在型の膜融合が生じると考えられる。さらにこれらはそれぞれ、人工シャペロンの設計、タンパク質機能との複合化による膜の機能化、

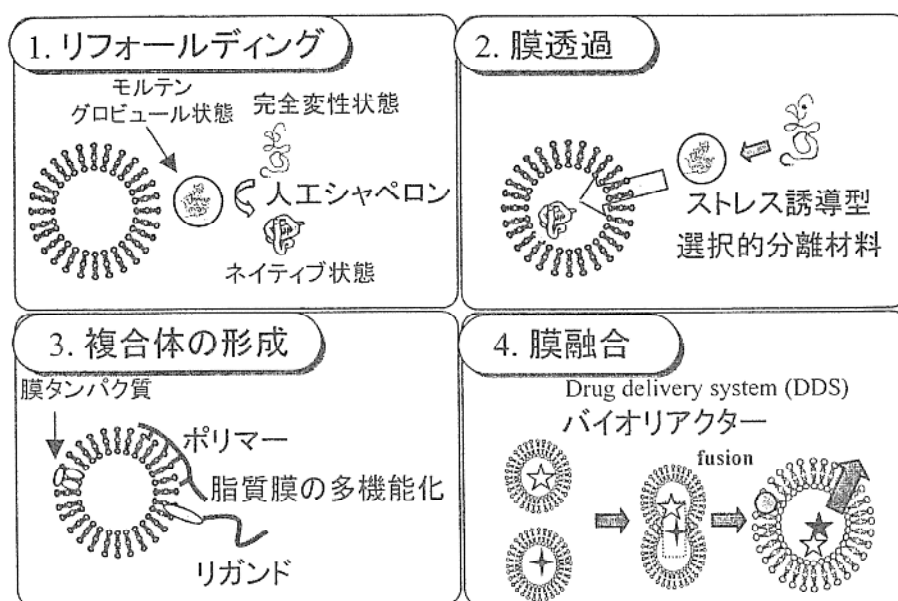


図4 ストレス条件下におけるタンパク質と脂質膜との相互作用とその利用

タンパク質の選択的分離, DDS・バイオリアクターに高度利用することが考えられる. これらリポソームのもつ多様なストレス応答機能を複合的に有効利用すれば, 所期の高度なバイオ生産分離プロセスの構築が可能になる. 以下では, リポソームを利用した人工シャペロン, 選択的分離材料の開発例について述べる. さらにこれらの機能の複合利用による, インクルージョンボディからの活性タンパク質の生産分離プロセスの構築の可能性について考える.

### 2.3.1 人工シャペロン

タンパク質のリフォールディングでは, 初期に生成する, 局所的疎水性の高い中間体の挙動を制御することが重要である. 分子シャペロン GroEL の場合, 自身の局所的な疎水部位にタンパク質の変性中間体をトラップし, タンパク質分子間の不可逆的な凝集を抑制する. 結合したタンパク質の解離には金属イオンや ATP が必要と考えられ, さらには GroES の添加が必要な場合もある<sup>13)</sup>. この機構に関しては様々なモデルが提案されているが, いずれにせよ工業的に利用するためには, 個々のタンパク質に対して複雑な操作, 条件の最適化が必要になることが予想される. 一方, リポソームの分子シャペロンに類似した機能は, タンパク質と脂質膜との比較的穏やかかつ可逆的な相互作用を通じて発現することが, モデル酵素として用いた炭

酸脱水酵素やリゾチームのリフォールディングから分かっている(図5). リポソームは前述のように, 揺らぎ, すなわち膜流動性により本来親水性の表面に動的な局所的疎水部位をつくることができ, この局所的疎水部位がタンパク質の疎水部位と可逆的に結合し, リフォールディングを促進すると考えられる. リフォールディング促進能力がリポソーム表面の局所的疎水性の大きさに依存することは, 粒径や温度変化あるいはコレステロールによる膜修飾などで表面の局所的疎水性を変化させた場合, 炭酸脱水酵素のリフォールディングに及ぼす効果が異なることから確認できる<sup>8)</sup>. 例えば, 粒径が小さく, 表面曲率が大きいリポソームは, 脂質分子の揺らぎが大きいので, 局所的疎水性が高く, リフォールディング促進効果が高いことがわかっている. また, コレステロールは, 脂質膜の局所的疎水性を幅広く制御でき, リフォールディングに適切な膜界面の設計に有効である.

さらに, リポソームの示すシャペロン機能は, ジスルフィド結合をもつリゾチームやリボヌクレアーゼ A についても認められている. ジスルフィド結合の再形成は, リポソームとタンパク質間の相互作用が最も強い状態で開始する方法が有効である<sup>10)</sup>. その他, リポソームの共存による天然タンパク質の熱失活抑制効果も認められているなど, リポソームは様々な特性を持つタンパク質のモルテングロビュール状態を始めとする, 局所的疎水性の高い状態に結合し, 汎用性の高いシャペロン機能を発現する.

### 2.3.2 タンパク質の選択的分離

過度のストレス条件により, 脂質膜とタンパク質双方の大きな構造変化が誘発される場合, 両者の間には, 強い相互作用が起こるため, タンパク質のような巨大分子でも膜透過する場合がある. 4量体タンパク質の $\beta$ -ガラクトシダーゼ(サブユニットの分子量 116 kDa)は, 自身の局所的疎水性が最大となる熱ストレス条件下(45°C 付近)で膜透過し, 膜透過後再活性化される<sup>14, 15)</sup>. 高温条件下では, リポソーム表面の疎水性も増加するため, 相互作用が増幅されると考えられる. 同様の膜透過現象は, 他のいくつかのタンパク質についても確認されており, 局

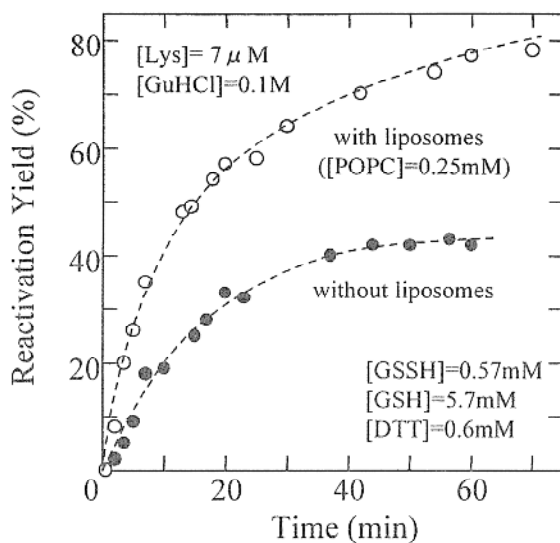


図5 リポソーム共存下における変性/還元 lysozyme のリフォールディング.

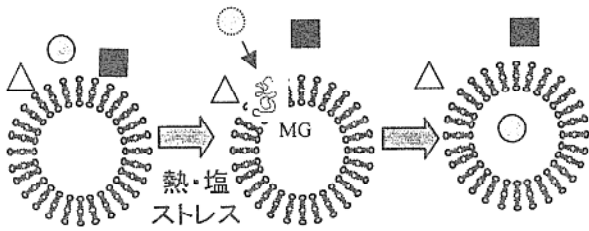


図6 リポソームのストレス誘導型選択的膜透過機能を利用したタンパク質の分離・回収 (MG: molten globule 状態).

所的疎水性をパラメータとしたモデル解析も試みられている<sup>14)</sup>。タンパク質が膜透過可能な条件は個々のタンパク質の性質により異なるが、膜透過条件は、タンパク質のストレス条件下における局所的疎水性変化から設定することが可能である。熱や塩濃度などのストレス負荷を複合化、制御すれば、図6のように特定タンパク質を選択的にリポソーム内に取り込み、他のタンパク質から分離して回収することも可能である<sup>15)</sup>。

#### 2.4 リポソームのストレス応答機能の複合利用と ILC によるタンパク質のリフォールディング・分離プロセスの構築

リポソームの示すストレス応答機能を複合的に利用し、さらに ILC にこれらの機能を組み込むことにより、インクルージョンボディからのタンパク質のリフォールディング・分離を簡便に行うシンプルプロセスの構築が期待できる。人工シャペロンや選択的膜透過機能はそれぞれ ILC に組み込まれ有効に機能する。例えば、変性状態からの炭酸脱水酵素、および変性・還元状態からのリゾチームのリフォールディングを、ILC カラムを通すことにより試みたところ、いずれも通常の希釈法に比べ極めて高い活性収率が得られた<sup>7)</sup>。特に、シャペロン機能を制御し、ジスルフィド結合の導入法を工夫することにより、従来法と比較して、収率の改善以外に、操作時間が大きく改善されることもわかっている<sup>10)</sup>。また、選択的分離機能についても、熱、塩およびそれら複合ストレスの負荷により、混合タンパク質系の相互分離機能を向上できることが確認されている。

ストレス条件の制御、複合化によって、人工

シャペロン機能、選択的膜透過機能を協同的に発現させることができれば、リフォールディング、ジスルフィド結合の導入、多量体会合構造の形成、夾雑タンパク質との相互分離を同時に、短時間で効率よく達成できるプロセスの構築が大いに期待できる。

### 3. おわりに

医薬品など、高度な精製が求められるタンパク質を ILC を利用して製造する場合には、脂質膜単独の機能には限界があるため、脂質膜の高機能化が不可欠である。生体系では、脂質膜単独でなく、膜タンパク質や分子シャペロンなどの生体分子が協同的、自己組織的に環境ストレスに応答し、機能を発現している。リポソームのもつシャペロン機能や選択的膜透過機能を向上させるためには、このような生体系の複合的なストレス応答機能の模倣、およびポリマーや界面活性剤など、人工の機能性分子による脂質膜の高機能(インテリジェントリポソーム)化が有効であろう。

また、ILC におけるストレス負荷条件の最適化を効率よく行うためには、オンラインセンシング技術、就中タンパク質と脂質膜の動的な相互作用を捉えられる技術の開発が必要である。バイオセンシング技術は環境モニタリングなどの観点から近年注目を集めているが、当研究室で開発を進めている、誘電計測を利用するストレスセンサーは、生細胞、リポソームなど、脂質膜の状態をオンラインで定量的に把握することができ<sup>16)</sup>、リポソームクロマトグラフィーとの複合化による、タンパク質リフォールディング、膜透過過程、さらには環境ホルモン等の環境汚染物質のオンラインモニタリングが期待される。

### 参考文献

- 1) Walde, P. and Marzetta, B. Bilayer permeability-based substrate selectivity of an enzyme in liposomes. *Biotechnol. Bioeng.*, 57, 216-219 (1998)
- 2) Miyake, J. and Hara, M. Molecular handling of photosynthetic proteins for

- molecular assembly construction. *Adv. Biophys.*, 34, 109-126 (1997)
- 3) Wolfgang, G. and Heiduschka, P. Interface analysis in biosensor design. *Biosensor and Bioelectronics*, 10, 853-883 (1995)
  - 4) Kuboi, R., Yano, K., Tanaka, H. and Komasa, I. Evaluation of surface properties and partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. *Solv. Extr. Dev. Jpn.*, 1, 42-52 (1994)
  - 5) Lundqvist, A. and Lundahl, P. Chromatography on cells and biomolecular assemblies. *J. Chromatogr. B*, 699, 209-22 (1997)
  - 6) Yang, Q., Liu, X.-Y., Ajiki, S., Hara, M., Lundahl, P. and Miyake, J. Avidin-biotin immobilization of unilamellar liposomes in gel beads for chromatographic analysis of drug-membrane partitioning. *J. Chromatogr. B*, 707, 131-141 (1998)
  - 7) Yoshimoto, M., Kuboi, R., Yang, Q. and Miyake, J. Immobilized liposome chromatography for study of protein-membrane interactions and refolding of denatured bovine carbonic anhydrase. *J. Chromatogr. B*, 712, 59-71 (1998)
  - 8) Kuboi, R., Yoshimoto, M., Walde, P. and Luisi, P. L. Refolding of carbonic anhydrase assisted by 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. *Biotechnol. Prog.*, 13, 828-836 (1997)
  - 9) Yamahara, K., Ota, H. and Kuboi, R. Evaluation and clarification of stress-responsive behaviors of proteins. *J. Chem. Eng. Jpn.*, in press (1998).
  - 10) Yoshimoto, M. and Kuboi, R. Oxidative refolding of denatured/reduced lysozyme utilizing chaperone-like functions of liposomes and immobilized liposome chromatography. submitted.
  - 11) Mach, H. and Middaugh, C. R. Interaction of partially structured states of acidic fibroblast growth factor with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 34, 9913-9920 (1995)
  - 12) Maezawa, S., Yoshimura, T., Hong, K., Duzgun, N. and Papahadjopoulos, D. Mechanism of protein-induced membrane fusion: fusion of phospholipid vesicles by clathrin associated with its membrane binding and conformational change. *Biochemistry*, 28, 1422-1428 (1989)
  - 13) 久保井亮一, 駒沢勲. 水性二相分配法による分子シャペロンの特性・機能の評価とタンパク質のプロセスの構築. 酵素工学ニュース, 37, 21-25(酵素工学研究会, 1997)
  - 14) Umakoshi, H., Yoshimoto, M., Shimanouchi, T., Kuboi, R. and Komasa, I. Model system for heat induced translocation of cytoplasmic beta-galactosidase across phospholipid bilayer membrane. *Biotechnol. Prog.*, 14, 218-226 (1998)
  - 15) Umakoshi, H., Shimanouchi, T. and Kuboi, R. Selective separation process of proteins based on the heat stress-induced translocation across phospholipid membranes. *J. Chromatogr. B*, 711, 111-116 (1998)
  - 16) Morita, S., Miki, M., Umakoshi, H. and Kuboi, R. Stress-responsive sensor by using dielectric measurements for vesicles. *Proc. of Int'l Conf. on Reactivity in Organized Microstructures*, in press (1998)