

令和元年5月20日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14472

研究課題名(和文) 超臨界二酸化炭素を用いたタンパク質の新規固定化法

研究課題名(英文) A new method for immobilizing proteins on synthetic resins using supercritical carbon dioxide

研究代表者

荻野 博康 (OGINO, Hiroyasu)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80233443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：種々の高分子化合物から製造されるプラスチックは安価で耐久性が高く、成形が容易であることから、様々な製品の材料として用いられている。一方、プラスチックは耐久性が高いため、プラスチック表面に耐久性の低いタンパク質を強固に固定化することが困難である。本研究では、超臨界二酸化炭素を用い、プラスチックを膨張、タンパク質や酵素の溶解性を向上させ、プラスチック表面にタンパク質を強固に固定化する新規手法を検討した。また、ペプチドタグを利用し、方向性を制御したタンパク質の固定化を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法は、粒子、フィルム、あるいは微細管の内表面などあらゆる形状のプラスチック表面にタンパク質や酵素を固定化でき、プラスチックの表面改質や触媒機能付与が可能であるとともに、安価なバイオセンサーの作製も可能である。

研究成果の概要(英文)：Synthetic resins produced from various polymer compounds are used as materials for various products because they are inexpensive, highly durable, and easy to mold. On the other hand, it is difficult to firmly immobilize low-durability proteins on the surface of synthetic resins, because synthetic resins are highly durable. In this research, a new method for immobilizing proteins on the plastic surface was investigated using supercritical carbon dioxide which expands synthetic resins and improves the solubility of proteins and enzymes. In addition, the immobilization of directionally controlled proteins using peptide tags was also investigated.

研究分野：生物反応工学

キーワード：超臨界 二酸化炭素 タンパク質 プラスチック 固定化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

種々の高分子化合物から製造されるプラスチックは安価で耐久性が高く、成型が容易であることから、様々な製品の材料として用いられている。疎水性が高いプラスチック表面にタンパク質あるいは酵素を固定化すると、プラスチックの表面改質や触媒機能を付加すること（固定化酵素の作製）が可能となるが、プラスチックの耐久性が高いため、熱や薬品によってプラスチック表面を変性、軟化し、熱に弱いタンパク質を固定化することは容易ではない。

常温で超臨界に達する超臨界二酸化炭素は安価で環境負荷が低い超臨界流体であり、超臨界二酸化炭素中ではプラスチックが可逆的に変性し、低分子物質の浸透性が向上する。また、超臨界二酸化炭素中では難水溶性の基質の酵素反応場として利用でき、酵素（タンパク質）が変性しないことが見出されている。

一方、タンパク質のN末端あるいはC末端にプラスチックに吸着しやすいペプチドタグを付与し、プラスチック表面に吸着させることが可能となっており、プラスチックの表面改質や固定化酵素が作成されている。

2. 研究の目的

本研究では超臨界二酸化炭素中でプラスチックにタンパク質を浸透させ、常圧に戻すことによりプラスチックへのタンパク質の固定化を検討する。また、有機溶媒耐性酵素である PST-01 プロテアーゼのC末端にペプチドタグを付与し、プラスチックへの固定化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 使用したプラスミドおよび宿主細胞

Pseudomonas aeruginosa 由来の PST-01 プロテアーゼ遺伝子を有するプラスミド pPC1 を使用した。また、宿主細胞としては *Escherichia coli* JM109 を使用した。

(2) ペプチドタグを付与した PST-01 プロテアーゼの作成

PST-01 プロテアーゼ遺伝子を含むプラスミドを鋳型とし、PS と親和性が高いペプチドタグ配列 (RAFIASRRIKRP) 3) およびリンカー配列 (GGGSGGGG) に相当する塩基を付加した変異プライマー存在下で DNA ポリメラーゼの伸長反応を繰り返した後、鋳型を *Dpn* I で消化し、宿主細胞を形質転換することにより、ペプチドタグを付与した PST-01-LPS19 プロテアーゼを発現するプラスミドを構築した。

(3) 酵素の調整

野生型およびペプチドタグを付与した PST-01 プロテアーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドで大腸菌 JM109 株を形質転換し、液体培養で取得した細胞を超音波により破砕した後、上清を 30°C で 2 時間保温することにより、活性を有する野生型およびペプチドタグを付与した PST-01 プロテアーゼを得た。さらに、Butyl-toyopearl 650M を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーにより精製した。

(4) 使用プラスチック、タンパク質

厚さ 0.3 mm のポリエチレン (PE)、ポリプロピレン (PP)、ポリ塩化ビニル (PVC)、および厚さ 0.5 mm のポリウレタンシート (PU) を直径 6 mm に切り出したプラスチック片と、平均分子量 19 kDa のポリスチレンペレット (PS) を使用した。また、タンパク質としては、分子量約 68 kDa のウシ血清アルブミン (BSA)、分子量約 14 kDa のリゾチーム (LZM)、および分子量約 33 kDa の PST-01 プロテアーゼを使用した。

(5) 加圧した二酸化炭素を用いた固定化

加圧した二酸化炭素は Fig. 1 に示すように二酸化炭素を冷却、加圧することにより作成し、耐圧容器に導いた。プラスチック片 10 枚を 100 μ g/ml のタンパク質の水溶液に浸したガラス製バイアル瓶を耐圧容器に入れ、所定の温度、圧力で保温した。所定の時間保温した後、プラスチック片を純水、1 M 塩化ナトリウム水溶液、10% (v/v) 1-プロパノール水溶液で順次、振とう洗浄した。保温後のタンパク質溶液、洗浄液のタンパク質濃度を Lowry 法で測定し、保温前のタンパク質濃度との差からプラスチックに固定化したタンパク質量を算出した。

(6) タンパク質の構造解析

1 mg/ml のタンパク質水溶液をガラス製バイアル瓶に入れ、超臨界二酸化炭素中で 24 時間保温した。円二色性分散計を用い、保温前後のタンパク質溶液の CD スペクトルを測定することにより、超臨界二酸化炭素中でのタンパク質の構造変化を調べた。

(7) プラスチックの表面分析

フーリエ変換赤外分光光度計を用

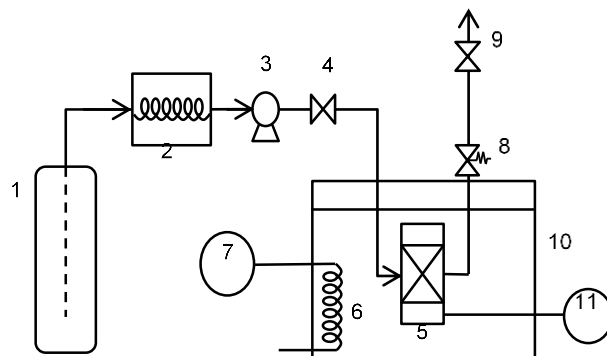


Fig. 1 Schematic diagram of reactor
CO₂ cylinder (1), cooler (2), pump (3), valves (4) and (9), vial (5), heater (6), temperature indicator and controller (7), safety valve (8), water bath (10), and pressure indicator (11) were used.

い、BSA 共存下超臨界二酸化炭素中で保温したプラスチック片の IR スペクトルを ATR 法で測定することによりプラスチックの表面を分析した。(8) ペプチドタグを付与した酵素のプラスチックへの吸着操作

100 $\mu\text{g/ml}$ の酵素溶液に浸した PS 片 0.18 g をガラス製バイアル瓶に入れ、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1,200 rpm で 2 時間振とうした。振とう後の酵素溶液のタンパク質濃度を Lowry 法で測定し、振とう前のタンパク質濃度との差から PS に吸着したタンパク質量を算出した。

4. 研究成果

(1) 超臨界二酸化炭素によるタンパク質の変性

1 mg/ml の BSA 水溶液を超臨界二酸化炭素中で 24 時間保温した場合の BSA 溶液の CD スペクトルを測定した。40 $^{\circ}\text{C}$ 、8 MPa で 24 時間保温する前と後の CD スペクトルを Fig. 2 に示す。また、常圧、95 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間保温することで変性した BSA の CD スペクトルを Fig. 2 に併記した。常圧、95 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間保温することで BSA 溶液の CD スペクトルは著しく変化した。一方、40 $^{\circ}\text{C}$ 、8 MPa で 24 時間保温しても BSA の CD スペクトルは変化せず、BSA は超臨界二酸化炭素中で変性しないと考えられる。また、LZM、PST-01 プロテアーゼ、および PST-01-LPS19 プロテアーゼについても同様の実験を行ったところ、LZM 溶液の CD スペクトルは変化しなかったが、PST-01 プロテアーゼおよび PST-01-LPS19 プロテアーゼ溶液の CD スペクトルは変化した。このことから、40 $^{\circ}\text{C}$ 、8 MPa の超臨界二酸化炭素中で保温しても BSA や LZM は変性せず、PST-01 プロテアーゼおよび PST-01-LPS19 プロテアーゼは変性することがわかった。PST-01 プロテアーゼはペプチド結合を加水分解する酵素であり、超臨界二酸化炭素中で保温した際に自己分解したと考えられる。

(2) 固定化量に及ぼす保温時間の影響

100 $\mu\text{g/ml}$ BSA 水溶液 150 μl に直径 6 mm の PP 片 10 枚を浸し、40 $^{\circ}\text{C}$ 、8 MPa の超臨界二酸化炭素中で種々の時間保温した結果を Fig. 3 に示す。10 分から 1 時間までは保温時間が長くなるほど固定化量が増加したが、1 時間保温した場合の固定化量 6.16 μg は 24 時間保温した場合の固定化量 6.01 μg と同程度であり、1 時間以上保温することで十分な固定化量が得られることがわかった。

(3) 固定化に及ぼす添加剤の影響

1 M 塩化ナトリウムまたは 10% (v/v) 1-プロパノールを含む 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA 水溶液 150 μl に直径 6 mm の PP 片 10 枚を浸し、40 $^{\circ}\text{C}$ 、8 MPa の超臨界二酸化炭素中で 1 時間保温した後の BSA の固定化量を測定した結果を Table 1 に示す。1 M 塩化ナトリウムを含む BSA 溶液を用いた場合では固定化量は約 0.64 μg 増加したが、10% (v/v) 1-プロパノールを含む BSA 溶液を用いた場合では固定化量が約 2.8 μg 減少した。

(4) 種々のタンパク質の固定化

100 $\mu\text{g/ml}$ の種々のタンパク質を含む 1 M 塩化ナトリウム水溶液 150 μl に直径 6 mm の種々のプラスチック片 10 枚を浸し、40 $^{\circ}\text{C}$ 、8 MPa の超臨界二酸化炭素中で 1 時間保温した後のプラスチックへのタンパク質の固定化量を測定した。PP、PE、PU、および PVC への BSA および LZM の固定化量を Fig. 4 に示す。BSA は PP に比較的多く固定化され、LZM は PE に比較的多く固定化された。

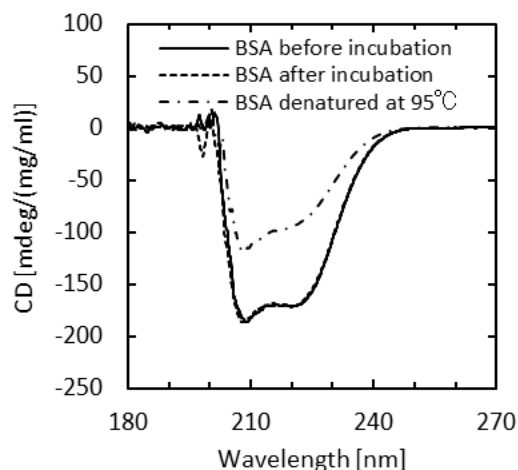


Fig. 2 CD spectra of BSA before and after incubation in ScCO₂ at 40 $^{\circ}\text{C}$ and 8 MPa for 24 hours, and denatured BSA at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min

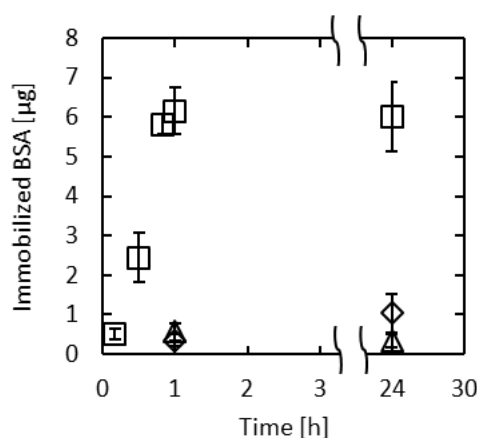


Fig. 3 Effect of incubation period on amount of BSA immobilized to PP at 30 $^{\circ}\text{C}$ (◇), 40 $^{\circ}\text{C}$ (□), 50 $^{\circ}\text{C}$ (△) and 8 MPa

Table 1 Amount of BSA immobilized on PP with and without additives under ScCO₂

Additive	Immobilized BSA [μg]
None	6.16 \pm 0.60
1 M NaCl	6.80 \pm 0.11
10% 1-PrOH	3.38 \pm 0.36

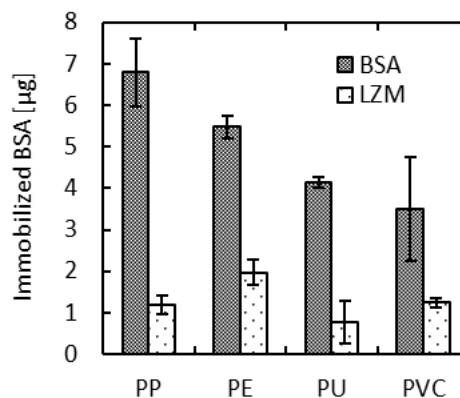


Fig. 4 Amount of various proteins immobilized on synthetic resins under ScCO₂

(5) プラスチック表面の分析

BSA を含まない 1 M 塩化ナトリウム水溶液および 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA を含む 1 M 塩化ナトリウム水溶液 150 μl に直径 6 mm の PP 片 10 枚を浸し、40 $^{\circ}\text{C}$ 、8 MPa の超臨界二酸化炭素中で 1 時間保温し、純水、1 M 塩化ナトリウム水溶液、および 10% (v/v) 1-プロパノール水溶液で洗浄した後の PP 片表面の IR スペクトルを Fig. 5 に示す。また、BSA の粉末を 40 $^{\circ}\text{C}$ 、8 MPa の超臨界二酸化炭素中で 1 時間保温した固体の IR スペクトルも併記した。超臨界二酸化炭素中で保温した粉末の BSA のスペクトルには、3300 cm^{-1} 付近 (①) と 1650 cm^{-1} 付近 (②) にそれぞれ N-H 伸縮振動由来のピークとペプチド結合由来のピークが確認された。これらのピークは BSA を含まない溶液を用いて超臨界二酸化炭素中で保温した PP 表面のスペクトルには見られなかったが、BSA を含む溶液とともに超臨界二酸化炭素中で保温した PP 表面のスペクトルには観測されたことから、BSA を含む塩化ナトリウム水溶液とともに PP を超臨界二酸化炭素中で保温することにより、PP に BSA が固定化されていることが確認された。(6) ペプチドタグを付与した PST-01 プロテアーゼの PS への吸着

100 $\mu\text{g/ml}$ の PST-01-LPS19 プロテアーゼ溶液に浸した PS をガラス製バイアル瓶に入れ、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1,200 rpm で 2 時間振とうした。振とう前後の酵素溶液中のタンパク質濃度差から算出した、PST-01-LPS19 プロテアーゼの PS への吸着量を Fig. 6 に示す。また Fig. 6 には、PP 片または PE 片への PST-01-LPS19 プロテアーゼの吸着量も併記した。PST-01-LPS19 プロテアーゼは PP や PE には吸着せず、PS には特異的に吸着していることがわかった。また、PS に対する野生型 PST-01 プロテアーゼの吸着量は、PST-01-LPS19 プロテアーゼの PS に対する吸着量よりも小さいことから、PST-01-LPS19 プロテアーゼのペプチドタグが PS への吸着量を向上させたと考えられる。

4. 結語

超臨界二酸化炭素中でプラスチックにタンパク質を浸透させ、常圧に戻すことによりプラスチック表面へのタンパク質の固定化を試みた結果、以下のことがわかった。

PP を BSA 水溶液に浸し、超臨界二酸化炭素中で保温すると、保持時間が 1 時間までは時間とともに BSA の固定化量が増加するが、1 時間で固定化量は定常に達し、24 時間保温した際の BSA の固定化量と同程度の値を示した。

LZM を用いてプラスチックへの固定化を試みたところ、BSA の固定化量には及ばないものの、実験に用いた全てのプラスチックに固定化されたと考えられ、その中でも PE に比較的多く固定化された。

また、PST-01 プロテアーゼの C 末端に、PS と親和性が高いペプチドタグを導入した、PST-01-LPS19 プロテアーゼを作製した。PST-01-LPS19 プロテアーゼは PS に対して特異的な吸着を示し、ペプチドタグと PS の相互作用により PST-01-LPS19 プロテアーゼを PS 表面に吸着させることができた。

5. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：安田 昌弘

ローマ字氏名：YASUDA, Masahiro

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：工学研究科

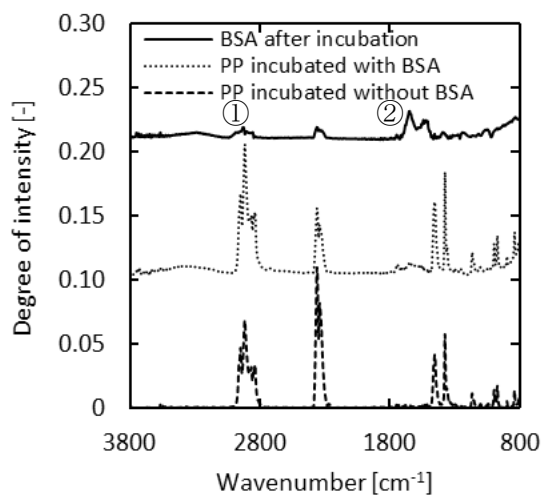


Fig. 5 FT-IR spectra of PP incubated with and without BSA solution under ScCO₂

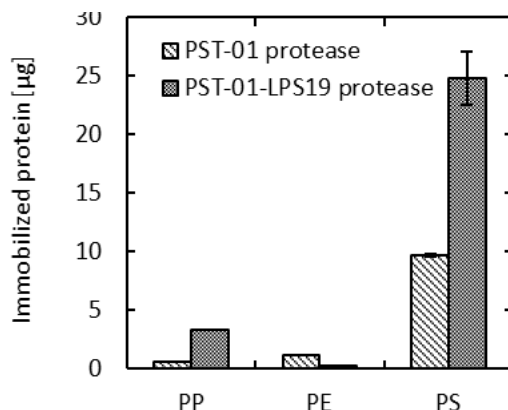


Fig. 6 Amount of adsorped protein to various synthetic resins at 4 $^{\circ}\text{C}$ and atmospheric air pressure

職名：教授

研究者番号（8桁）：40264808

研究分担者氏名：山田 亮祐

ローマ字氏名：YAMADA, Ryosuke

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：工学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40608626

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。