

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19009

研究課題名（和文）カーボンナノチューブを活用したタンパク質の高効率リフォールディング

研究課題名（英文）Highly efficient refolding of proteins using carbon nanotubes

研究代表者

平野 篤（Hirano, Atsushi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：90613547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質のリフォールディングの収率をカーボンナノチューブを用いることで向上させ、これまで開発段階でドロップ・アウトしていた数多くのタンパク質医薬品候補を再び臨床研究さらには市場に呼び戻すことを目的とした。本研究では、CNTの原材料に由来する微量の鉄イオンがCNTとタンパク質の酸化還元反応を促進するという現象を発見した。これにより、CNTを用いたタンパク質のリフォールディングにおける微量金属イオンの制御の重要性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カーボンナノチューブを用いてタンパク質をリフォールディングするには、カーボンナノチューブとタンパク質の物理的・化学的な相互作用の理解が必須である。今回、化学的な相互作用の一つである酸化還元反応において、共存する微量の鉄イオンが反応速度に大きな影響を与えることを明らかにした。本結果は、タンパク質のリフォールディング反応における微量金属イオンの濃度制御の必要性を示すものであり、リフォールディングの技術開発において重要な知見を与えた。

研究成果の概要（英文）：In this study we aimed to improve the yield of protein refolding by using carbon nanotubes, and to bring back numerous protein drug candidates, which had been dropped out in the development stage, to clinical research and then to the market. We found that a small amount of iron ions derived from CNT raw materials promotes the redox reaction between CNTs and proteins. This finding underscores the importance of controlling trace metal ions in protein refolding using CNT.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：タンパク質 カーボンナノチューブ リフォールディング 酸化還元

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質医薬品の世界市場は急速に成長しており、現在、医薬品の売上上位の多くがタンパク質医薬品である。しかし、臨床試験中のタンパク質医薬品の多くが生産時にリフォールディングを必要としており、さらに言えば、リフォールディング不能により臨床研究に上らずドロップ・アウトする候補医薬品も多数存在する。この状況において、リフォールディングの高収率化が喫緊の課題であり、これらを打開すれば、難病の治療、薬価の引き下げなど、多くの社会問題を抱えた製剤開発に変革をもたらすことができる。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質のリフォールディングの収率を、CNT を用いることで向上させ、これまで開発段階でドロップ・アウトしていた数多くのタンパク質医薬品候補を再び臨床研究さらには市場に呼び戻すことを目的とする。そこで、CNT とタンパク質の間の物理的・化学的な相互作用を詳細に理解し、厳密に制御することを目指す。本研究では、特に、タンパク質のシステイン(Cys)残基が関与する酸化還元反応の解明について重点的に取り組んだ。

3. 研究の方法

CNT とタンパク質 (あるいは Cys) の酸化還元反応の観察には、主としてポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)と赤外光吸収スペクトル測定を利用した。特に、SDS-PAGE はタンパク質分子内のフリーの (つまりスルフヒドリル基をもつ) Cys 残基数の定量に利用できる。したがって、酸化した Cys 残基数をフリーの Cys 残基数の残存量から定量することができる。一方、赤外光吸収スペクトル測定はタンパク質 (あるいは Cys) から CNT への電子移動の観測に利用できる。一般的に、CNT の赤外光吸収スペクトルの強度はタンパク質から CNT に電子が受け渡されることによって増加するため、赤外光吸収スペクトルの強度を経時的に測定することで、酸化還元反応の進行度を把握することができる。本研究では、これらの手法によって、CNT とタンパク質 (あるいは Cys) の酸化還元反応の原理を解明した。なお、CNT 試料由来の微量の金属イオンの影響を調べるために、金属イオンの補足剤 (キレート剤) であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を使用した。

4. 研究成果

本研究では、CNT の原材料に由来する微量の鉄イオンが CNT とタンパク質の酸化還元反応 (CNT によるタンパク質の Cys 残基のジスルフィド結合形成) を促進するという現象を発見した。一般的に、CNT は金属触媒を利用して合成されるため、原材料には金属が含有している。精製後にも、微量の金属イオンが残留する。今回、このような微量金属イオンの影響を調査したことで、CNT を用いたタンパク質のリフォールディングにおける微量金属イオンの制御の重要性が明らかになった。

図 1 に示すように、還元型のリゾチームを作製し (図 1 a), それを CNT と反応させ、最後に未反応の Cys 残基を PEG 化させることで (図 1 b,c), 未反応の Cys 残基の割合を分子量の違いを利用して半定量的に割り出した (図 1 d)。その際、金属イオンのキレート剤 (EDTA) を共存させることで、共存する微量金属イオンの影響を調べた。実験の結果、キレート剤存在下ではタンパク質の Cys 残基の多くが残留することが明らかになった。この結果は、微量金属イオンが CNT とタンパク質の酸化還元反応を促進させる働きをもつことを示している。

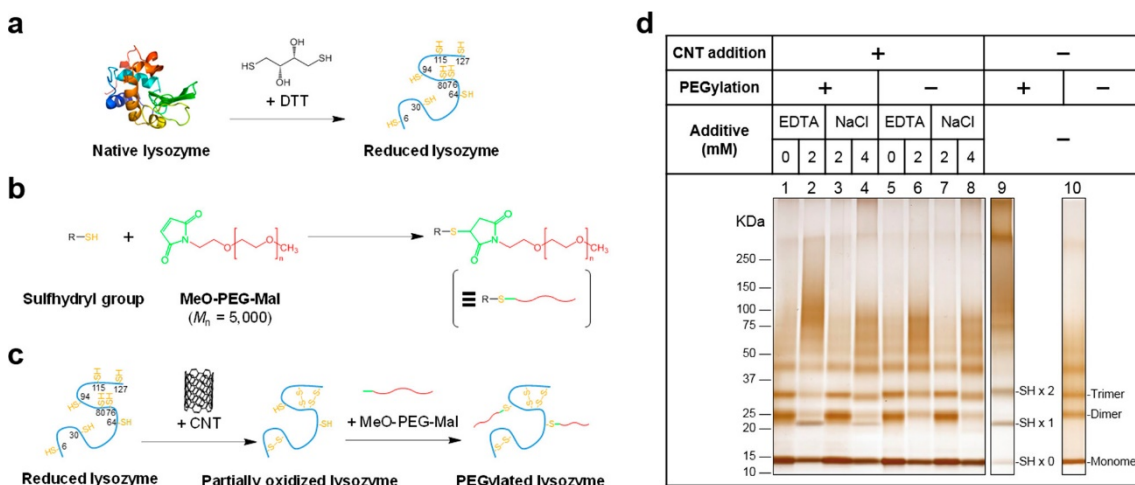


図 1. CNT と還元型リゾチームの酸化還元反応. (a) 還元剤であるジチオスレイトール (DTT) を用いたリゾチームの還元反応の模式図. (b) Cys 残基のスルフヒドリル基の PEG 化反応の模式図. (c) CNT によるリゾチームの酸化反応とその後の PEG 化反応の模式図. (d) 非還元条件下での SDS-PAGE. PEG 化を利用することで、リゾチーム分子内のフリーの Cys 残基数を分子量の違いとして検出。PEG 化を行わない還元型リゾチームは単量体と多量体による複数のバンドを示す (レーン 10)。

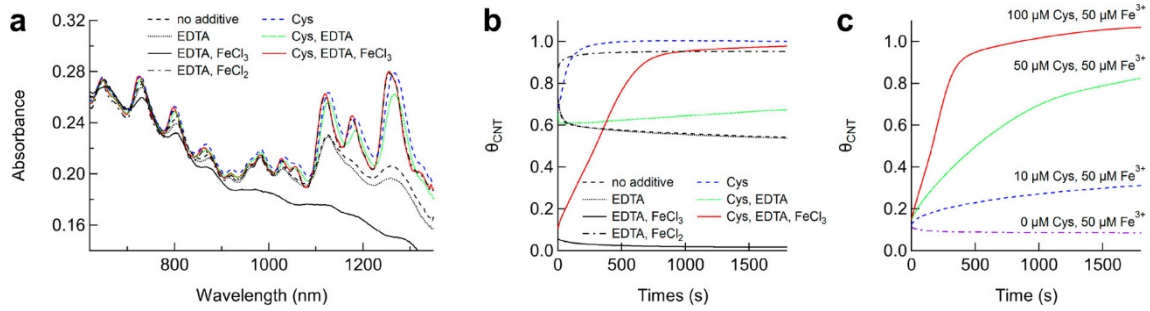


図 2. CNT と Cys の酸化還元反応. (a) 各種添加剤と混合した 1800 秒後の CNT の赤外光吸収スペクトル. 各添加剤の初濃度—100 μM Cys, 50 μM FeCl_3 , 50 μM FeCl_2 , 10 μM EDTA. (b) 還元型 CNT の存在分率 (θ_{CNT}) の経時変化 ($\theta_{\text{CNT}} = [\text{CNT}]/([\text{CNT}] + [\text{CNT}^+])$). (c) 50 μM Fe^{3+} の条件での θ_{CNT} の経時変化の Cys 濃度依存性.

図 2 a には、界面活性剤で分散させた CNT の溶液に、各種添加剤 (Cys, EDTA, 鉄イオン (Fe^{3+} と Fe^{2+})) を加えた際の 1800 秒後の赤外光吸収スペクトルを示す. 無添加 (no additive) に比べ、Cys の添加によって赤外光吸収スペクトルの強度が増加することが明らかになった. これは Cys による CNT の還元を示している. しかし、Cys と EDTA を同時に添加した場合、赤外光吸収スペクトルの増加量は相対的に小さかった. この結果は、CNT の試料に残存する鉄イオンが反応に関与することを示唆している. 一方で、Cys と EDTA と FeCl_3 の 3 種の添加剤を加えた際には、赤外光吸収スペクトルの強度は Cys のみの場合と同程度まで増加した. 図 2 b には、1250 nm 付近のピークの強度から算出した還元型 CNT の存在分率 (θ_{CNT}) の経時変化を示す. 概ね、図 2 a から予想されるような変化を示したが、注目すべきは、Cys と EDTA と FeCl_3 の 3 種の添加剤を加えた際の結果である. これらの添加剤を加えた条件では、 θ_{CNT} の値は極めて短時間で 0.1 付近まで低下し、その後、約 1000 秒までに 0.9 付近へ急増した. この結果は、反応初期において、 Fe^{3+} は CNT を速やかに酸化させるが、その一部は Cys を酸化させることで Fe^{2+} へと変化し、その後、CNT を還元させたことを示唆している. 図 2 c に示した θ_{CNT} 値の増加の Cys 濃度依存性は、このような鉄イオンが媒介する CNT と Cys の酸化還元反応の妥当性を支持している.

そこで、図 3 a に示すような反応モデルを提案した. このモデルでは、CNT と Cys の酸化還元反応において、直接的な反応と鉄イオンが媒介する間接的な反応を含んでいる. このモデルをもとに数値シミュレーションを行ったところ、図 2 b,c に示した実験結果を再現するデータが得られた (図 3 b,c). 加えて、各成分の濃度の経時変化を明らかにしたほか、反応における鉄イオン濃度や速度定数の影響なども明らかにした (図 3 d-f). 以上の結果から、タンパク質のリフォールディングには、CNT だけでなく、CNT 原材料に含まれている微量の金属イオンの影響も無視できないことが明確になった. これらは CNT を用いたタンパク質のリフォールディングを精密に制御するための有用な知見となる. 本研究では、タンパク質の分光分析等に使用する溶媒条件の探索も行い、いくつかの条件を見出した. 今後、タンパク質のリフォールディングを高効率に行うためには、このような分析における溶媒条件の探索のほか、CNT に対するタンパク質の非特異的な吸着を十分に抑制する添加剤の検討などが必要と考えられる.

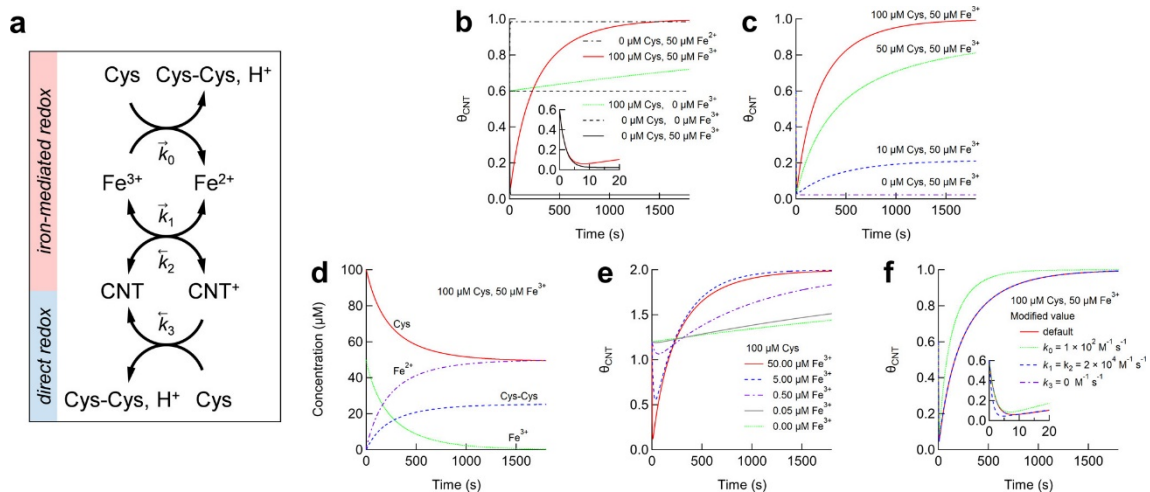


図 3. CNT と Cys の酸化還元反応の数値シミュレーション. (a) 酸化還元反応のモデル— $k_0 = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_1 = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_3 = 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (b) θ_{CNT} の経時変化. ただし、 θ_{CNT} の初期値は 0.6. (c) 50 μM Fe^{3+} の条件での θ_{CNT} の経時変化の Cys 濃度依存性. (d) 100 μM Cys と 50 μM Fe^{3+} の条件での各成分の濃度の経時変化. (e) 100 μM Cys の条件での θ_{CNT} の経時変化の Fe^{3+} 濃度依存性. (f) 100 μM Cys と 50 μM Fe^{3+} の条件での θ_{CNT} の経時変化の速度定数依存性.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirano Atsushi, Nagatoishi Satoru, Wada Momoyo, Tsumoto Kouhei, Maluf Karl N., Arakawa Tsutomu	4. 巻 109
2. 論文標題 Technical Capabilities and Limitations of Optical Spectroscopy and Calorimetry Using Water-Miscible Solvents: The Case of Dimethyl Sulfoxide, Acetonitrile, and 1,4-Dioxane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 524 - 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2019.10.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirano Atsushi, Wada Momoyo, Tanaka Takeshi, Kataura Hiromichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Oxidative Stress of Carbon Nanotubes on Proteins Is Mediated by Metals Originating from the Catalyst Remains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 1805 - 1816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.8b07936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野 篤、和田 百代、田中 丈士、片浦 弘道
2. 発表標題 カーボンナノチューブによるタンパク質の酸化反応における触媒由来金属の効果
3. 学会等名 第55回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン 総合シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亀田 倫史 (Kameda Tomoshi) (40415774)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員 (82626)	