

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23760718

研究課題名(和文) タンパク質連続リフォールディング法におけるインターフェースとしての機能膜の開発

研究課題名(英文) Development of Interfacial Functional Membrane for Continuous Protein Refolding

研究代表者

大橋 秀伯(Ohashi, Hidenori)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：00541179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：高い基質特異性・反応性を持つタンパク質は、抗体製剤・バイオリアクタなど幅広い応用用途を持つ。タンパク質は現在大腸菌による大量発現が可能であり、そのうち約4割はアミノ酸配列を正しく折り畳みリフォールディング過程を経て生化学的活性が回復する。

今後の大きな拡大も見込まれるタンパク質市場を考えると、大量生産を可能とする連続リフォールディング技術の今後の発展が予想される。本研究では、連続法に特徴的なタンパク質とリフォールディング剤の接触インターフェースに対し、高分子機能膜の積極的な活用を提案し、プラズマグラフト重合を用いた機能膜作成法の開発と、リフォールディング介助に必要な膜性能の探求を行った。

研究成果の概要(英文)：Protein has wide application area due to its high substrate specificity and reactivity. The protein often must be refolded to regain its activity after the expression in E. coli. For the mass production of the protein, continuous protein folding method will be focused in the near future. To positively utilize the interface between unfolded protein and refolding media, which is specific for the continuous method, the development and the usage of functional polymeric membranes that can help protein refolding in the interface has been proposed for the first time. In the present study, specifically, the method how to fabricate such a membrane via plasma graft polymerization methodology is proposed and the membrane performance that is required for the protein refolding has been explored.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・加工物性・移動操作・単位操作

キーワード：タンパク質 リフォールディング 機能性高分子膜 インターフェース プラズマグラフト重合 低温パーオキシド法

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は人工物では実現の難しい基質特異性・高い反応性を持ち、抗体製剤・機能性食品・バイオリアクタなどの幅広い応用用途を持つ。アミノ酸配列としてのタンパク質は、現在大腸菌による大量発現が可能となっている。しかしながら、得られるのは生化学的に不活性な不溶体であり、全体の約4割のタンパク質はアミノ酸配列を3次元に正しく折り畳むリフォールディングの過程を経て初めて、生化学的活性が回復する。

現在、工業的には塩酸グアニジンなどで可溶化した変性タンパク質を大量のバッファーに加えるバッチ式でリフォールディングが行われている。既に現在でも国内で数千億円規模であり今後の大きな拡大も見込まれるタンパク質市場を考えると、大量生産を可能とする連続リフォールディング技術は将来的に大きな需要が見込まれる。

2. 研究の目的

しかしながら、連続リフォールディング技術に関する研究はまだ十分に進んでいない。特に、変性タンパク質溶液とバッファーが接触する部分は連続リフォールディング法に特徴的なインターフェースであるにもかかわらず、その研究はほとんど行われて来ない。本研究では初めて、このインターフェースの積極的な活用として、機能性高分子膜を用いることを提案した。特に、種々の機能膜を作成する手法の開発及び、リフォールディング介助に必要な膜性能の探求を行った。

3. 研究の方法

機能膜作成手法の開発：

リフォールディングを介助・促進する機能膜として、数百ナノメートルの無数の細孔を持つ多孔質基材の細孔表面に、機能性リニアポリマーをグラフトした膜の検討を行った。この架橋点の無いこのデザインであれば、高分子網目へのタンパク質が大幅に抑制される。

数あるグラフト重合法の中でも、プラズマグラフト重合は、ポリエチレン等の不活性な担体に、容易に且つ経済的にグラフト重合を行える優れた手法ではある一方で、重合できるモノマーが限られているというモノマー依存性が既存の問題として存在しており、リフォールディングのための機能性ポリマーのグラフトが困難であった。本研究においては、この問題を解決するために、モノマー溶液に様々な添加剤を加え、それらが種々のモノマーのプラズマグラフト重合の可否に与える影響の評価を行った。

リフォールディング介助に必要な膜性能：
様々な機能性多孔膜を介して、変性タンパ

ク溶液をリフォールディングバッファー中に導入したときの、リフォールディングしたタンパク質の割合、活性、リフォールディング後のタンパク質の構造に関してそれぞれ評価を行った。この際、変性タンパク質の注入速度などを変化させることで、膜内のリフォールディングバッファー濃度分布の制御を行い、その効果についても評価を行った。膜内の濃度分布は化学工学シミュレーションを用いて計算した。

4. 研究成果

機能膜作成手法の開発：

プラズマグラフト重合時のモノマー溶液にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えることで、既存の手法では重合の難しかった強いイオン性のモノマー acrylamide methylpropane sulfonic acid (AMPS) を細孔内に均一にグラフト重合することに成功した。これは、疎水性のポリエチレン多孔質基材細孔中への、モノマー水溶液の浸透を SDS が介助するためであることを見出した。また、プラズマグラフト重合の反応開始基前駆体と考えられているパーオキサイド基からの開始反応に pH が関わっていることも見出している。

さらにこの方法を応用することで、他の強いイオン性モノマーである vinyl benzyl trimethyl ammonium chloride (VBTAC) や methacrylamido propyl trimethylammonium chloride (MAPTAC) をはじめとした様々なモノマーのグラフト重合に成功した。以上の結果により、リフォールディングを介助する種々の機能性ポリマーをグラフト固定化することが可能になった。

リフォールディング介助に必要な膜性能：

リフォールディングを介助するポリマーの一種であるポリイソプロピルアクリルアミドをグラフトした機能膜において、リフォールディング効率が向上することが示され、機能性リニアポリマーをグラフトした膜がリフォールディング促進膜としてインターフェースの役割を果たすことを見出した。

また、変性タンパク質の膜への注入速度がリフォールディング効率に大きな影響を与えることが明らかにした。化学工学シミュレーションによって膜内リフォールディングバッファーの濃度分布を計算したところ、十分な注入速度を保持できない時には、注入側にまでリフォールディングバッファーが浸潤してしまい、リフォールディング効率が低下してしまうことがわかった。これに対し、逆に注入速度が速すぎると、タンパク質が膜細孔内でリフォールディングする滞留時間を稼げないことがわかった。

すなわち、インターフェースとしての機能性膜に求められる性能としてリフォールディングを介助するグラフトポリマーの設計

に加え、膜内のタンパク質滞留時間を稼ぐ設計（タンパク質の膜内の拡散性制御・厚膜化など）が必要となることがわかった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計9件)

1. Hidenori Ohashi, Sae Ebina, and Takeo Yamaguchi, "Logistic Gate-Like Permeable Property of Gating Membrane with Ion-Recognition Polyampholyte", *Polymer*, in press (2014), 査読有.
2. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, and Takeo Yamaguchi, "Plasma-Induced Graft Polymerization Inside Pores of Porous Substrates Assisted by an Infiltration Agent in Acidic Conditions", *Plasma Processes and Polymers*, 11(4) 306-314 (2014), 査読有.
3. Hidenori Ohashi and Takeo Yamaguchi, "A General Diffusion Model for Polymeric Systems based on Microscopic Molecular Collisions and Random Walk Movement", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(29), 9940-9945 (2013), 査読有.
4. Hidenori Ohashi, Sae Ebina, and Takeo Yamaguchi, "Fabrication of Functional Membrane with Activated Ester via Plasma-Induced Graft Polymerization", *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 26(4), 503-506 (2013), 査読有.
5. Hidenori Ohashi, Tomoaki Abe, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, "The Influence of Spacer Length between Actuator and Sensor on their Mutual Communications in Poly(*N*-Isopropylacrylamide-co- β -Cyclodextrin), an Autonomous Coordinative Shrinking/Swelling Polymer", *Macromolecules*, 45(24), 9742-9750 (2012), 査読有.
6. Hidenori Ohashi, Xueqin Chi, Toshio Shimada, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, "Fabrication of Precursor Membrane with Reactive Groups via Plasma-Induced Graft Polymerization", *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 25(4), 555-557 (2012), 査読有.
7. Hidenori Kuroki, Taichi Ito, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, "Biomolecule-Recognition Gating Membrane Using Biomolecular Crosslinking and Polymer Phase Transition", *Analytical Chemistry*, 83(24), 9226-9229 (2011), 査読有.

8. Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, "Physical Reexamination of Parameters on a Molecular Collisions-based Diffusion Model for Diffusivity Prediction in Polymers", *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(51), 15181-15187 (2011), 査読有.

9. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, "Grafting of Polyelectrolyte on Porous Substrate by Plasma-induced Polymerization", *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 24 (4), 471-473 (2011), 査読有.

〔学会発表〕(計21件)

1. Xueqin Chi・Hidenori Ohashi・Takanori Tamaki・Takeo Yamaguchi、Preparation of linear polyelectrolyte chains grafted porous membranes by plasma-initiated graft polymerization、日本膜学会第33年会、産業技術総合研究所臨海副都心センター別館、2011年5月12日～13日.
2. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, Grafting of Polyelectrolyte on Porous Substrate by Plasma-induced Polymerization, The 28th International Conference of Photopolymer Science and Technology Materials & Processes for Advanced Microlithography and Nanotechnology, Chiba, JAPAN, 21-24th June, 2011.
3. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi、A New Technique for Plasma-Induced Graft Polymerization of Heat-Labile Monomers、第24回プラズマ材料科学シンポジウム (SPSM-24)、大阪大学 銀杏会館、2011年7月19日～20日.
4. Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, Microscopic Free Volume Theory for Molecular Diffusivity Prediction in Polymeric Membrane Systems: Application and Further Extension, International Congress on Membranes and Membrane Processes 2011 (ICOM2011), Amsterdam, the NETHERLANDS, 23-29th July, 2011.
5. 大橋 秀伯・岩元 望・田巻 孝敬・山口 猛央、ミクロな分子衝突に基づいた高分子中の分子拡散性予測理論：パラメータシステムの構築及び水素結合系への拡張、膜シンポジウム2011、健康文化村カルチャーリゾートフェストーネ、沖縄県、2011年11月18日～19日.

6. 谷川 裕司・大橋 秀伯・田巻 孝敬・山口 猛央、膜細孔を利用したタンパク質のリフォーリング、化学工学会第 77 年会、工学院大学、2012 年 3 月 15 日～17 日。
 7. 池 雪琴・大橋 秀伯・田巻 孝敬・山口 猛央、低温パーオキサイド法による多孔質基材へのプラズマグラフト重合、化学工学会第 77 年会、工学院大学、2012 年 3 月 15 日～17 日。
 8. Hidenori Ohashi, Chi Xueqin, Toshio Shimada, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, Fabrication of Precursor Membrane with Reactive Groups via Plasma-Induced Graft Polymerization, The 29th International Conference of Photopolymer Science and Technology Materials & Processes for Advanced Microlithography and Nanotechnology, Chiba, JAPAN, 26-29th June, 2012.
 9. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, A Low Temperature Peroxide Method of Plasma-Induced Graft Polymerization for Porous Membranes, The 7th Conference of Aseanian Membrane Society (AMS7), Haeundae Grand Hotel, Busan, KOREA, 4-6th July, 2012.
 10. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, A Low Temperature Peroxide Method of Plasma-Induced Graft Polymerization for Porous Membranes, XXIX EMS Summer School on Membranes, Nancy, FRANCE, 7-10th July, 2012.
 11. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, Peroxide Method of Plasma-Induced Graft Polymerization Facilitated by SDS for Fabricating Functional Materials, The First International Education Forum on Environment and Energy Science, Waikoloa, Hawaii, USA, 14-18th December, 2012.
 12. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, A Low Temperature Peroxide Method of Plasma Induced Graft Polymerization for Porous Membranes, 日本膜学会第 34 年会、早稲田大学、2012 年 5 月 8 日～9 日。
 13. 池 雪琴・大橋 秀伯・田巻 孝敬・山口 猛央、機能性高分子材料作製のためのプラズマグラフト重合法：低温パーオキサイド法、化学工学会 第 44 回秋季大会、東北大学、2012 年 9 月 19 日～21 日。
 14. 大橋 秀伯・池 雪琴・田巻 孝敬・山口 猛央、プラズマグラフト重合法におけるドデシル硫酸ナトリウムの重合促進効果、膜シンポジウム 2012、神戸大学、2012 年 11 月 6 日～7 日。
 15. Xueqin Chi・Hidenori Ohashi・Takanori Tamaki・Takeo Yamaguchi, Acceleration of Plasma-Induced Graft Polymerization for Porous Substrate via Sodium Dodecyl Sulfate, 化学工学会第 78 年会、大阪大学、2013 年 03 月 17 日～19 日。
 16. Hidenori Ohashi, Sae Ebina, Takeo Yamaguchi, Fabrication of Functional Membrane with Activated Ester via Plasma-Induced Graft Polymerization, The 30th International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-30), Chiba, JAPAN, 25-28th June, 2013.
 17. Hidenori Ohashi and Takeo Yamaguchi, Shell-Like Free Volume Theory for Molecular Diffusivity Prediction in Polymeric Membrane Systems, The 8th Conference of Aseanian Membrane Society (AMS8), Xi'an, CHINA, 16-19th July, 2013.
 18. 武井 俊樹・大橋 秀伯・山口 猛央、自律吸脱着ポリマーをグラフト固定した機能膜の開発、化学工学会 第 45 回秋季大会、岡山大学、2013 年 9 月 16 日～18 日。
 19. 天宮 清一・大橋 秀伯・山口 猛央、分子認識イオンゲート膜におけるイオン浸透圧モデル、化学工学会 第 45 回秋季大会、岡山大学、2013 年 9 月 16 日～18 日。
 20. 黒木 秀記・大橋 秀伯、高分子膜中の分子透過機構：溶解拡散機構、最近の化学工学講習会 63 「ここまできた膜分離プロセス～基礎から応用」化学工学会関東支部、東京理科大学、2014 年 1 月 21 日～22 日。
 21. 武井 俊樹・大橋 秀伯・黒木 秀記・宮西 将史・山口 猛央、自律膨潤収縮ポリマーの合成とその相転移挙動特性、化学工学会第 79 年会、岐阜大学、2014 年 3 月 18 日～20 日。
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 大橋 秀伯・黒木 秀記、高分子膜における分子透過機構(6 章)、最近の化学工学 63 「ここまできた膜分離プロセス - 基礎から応用 - 」, 47-61 (2014).
 2. 大橋 秀伯・山口 猛央、ガスバリア膜・蒸

気透過膜の設計 - 高分子中での分子拡散理論より -、膜、36(2), 71-78 (2011).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大橋 秀伯 (Hidenori Ohashi)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：00541179