

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670009

研究課題名(和文) ナノ構造体を利用した構造を保持した状態でのタンパク質の分離分析法の開発

研究課題名(英文) Development of a separation method of innate protein using nanostructure

研究代表者

加藤 大 (Kato, Masaru)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30332943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質を始めとしたナノメートルサイズの物質は、構造や状態の微細な違いで物性や作用が異なる。そこで本研究は、分離場をナノマテリアルの分離に適合するように精密に設計し、その評価を行った。本研究で、微量な送液が可能なHPLCシステムを構築し、さらに表面状態や大きさによるナノマテリアルの分離に成功した。

研究成果の概要(英文)：Because property of nanomaterial, such as protein, nanoparticle, and nanotube, changes by small structure difference of nanomaterial, we developed a method for separation of nanomaterials in this study. We succeeded in the separation of nanomaterials based on their size and surface.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノマテリアル 分離科学 タンパク質 ナノ粒子 HPLC 電気泳動

1. 研究開始当初の背景

近年、急速にナノテクノロジーが進展し、微細加工技術などを用いたトップダウン法、もしくは物質の自己組織化反応などを利用したボトムアップ法によってナノスケールの構造体(ナノ構造体)の調製が可能になっている。これまで我々は、規則的なナノ構造体を調製し、その規則性を利用した生体分子の高効率な分離を試みてきた。これらの分離基材の特徴は、設計された nm サイズの空間が物質の分離に有効に働く点にある。そこで本研究では、これらのナノ構造体をタンパク質等のナノメートルサイズの物質の分離に適用するように再設計・作製し、ナノマテリアルの分離に利用する。

2. 研究の目的

本研究では、構造を維持した状態でタンパク質の分離分析が可能な新しい手法を開発する。具体的には、カラム内にタンパク質を分離するための、ナノメートルサイズの構造体を調製し、その作用によって構造を維持した状態でタンパク質の分離を達成する。開発した手法を用いることで、機能している場所でのタンパク質の構造を知ることができ、基礎研究から、タンパク質製剤の品質管理まで、様々な分野での応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) 微量流量 HPLC システムの構築

内径 25 μm のフューズドシリカキャピラリーをカラムに用い、移動相を流速 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液する HPLC システムを構築し、その性能を評価した。

(2) 電気泳動によるナノ粒子の分離

有機物質より構成されるナノマテリアルとしてポリエチレングリコール(PEG)ナノ粒子、無機物質より構成されるナノマテリアルとしてシリカナノ粒子を選択し、それぞれの泳動挙動をキャピラリー電気泳動で評価した。

(3) クロマトグラフィーによるナノ粒子の分離

大きさや内包物質などの異なるシリカナノ粒子の溶出挙動をモノリス型カラムを用いた HPLC で評価した。

4. 研究成果

(1) 微量流量 HPLC システムの構築

ナノ構造体を利用した分離を実現するためにまず始めに微量の分離場の評価が可能な HPLC システムの構築を行った。微量な 50nL の試料(チオウレア)をオートサンプラーで注入した結果、3分と5分に2本のピークが

検出された。2本のピークのどちらのピークがチオウレア由来であるかを確認するために、3種類の異なった濃度(0.1, 1.0, 10 mg/mL)のチオウレアを分析した。その結果、いずれの濃度の試料でも両方のピークが共に増加した。3分と5分のピークの面積(高さ)の比は、後ろのピークの方が増加の割合が僅かに大きかった。したがって2つのピークは共に試料由来であると考えられる。2本のピークに分かれて検出されるのが、試料に用いたチオウレ特有の物性に由来しているかを調べるために、異なった物質の分析も試みた。サンプルに低分子化合物として Phe を、タンパク質としてトリプシンインヒビターとヘモグロビンを用いた。Phe, トリプシンインヒビター、ヘモグロビンを用いた結果、これらの試料でも同様な2本のピークが検出された。そして検出された2本のピークの溶出時間は、全ての試料で同じであった。したがって2本のピークが検出されるのは、チオウレア特有の現象ではなく、多くの物質に共通に見られる現象であった。

物性の異なった4つの化合物について、1つの物質を注入すると2本のピークが検出され、各ピークの溶出時間も等しいことから、これは物質の物性には依存せず、システムに由来すると考えられる。そこで、まず始めにオートサンプラーを原因として疑い、オートサンプラーをマニュアルインジェクターに変更し、再び、チオウレアの分析を行った。その結果、一本のピークとして検出された。したがってピークが2本に分かれる原因は、オートサンプラーにあると考えた。

オートサンプラーを用いて分析した際に、2本のピークが検出される原因を調べるために、注入量を変化させた時のピーク形状を比較した。注入量を変化させても2本のピークの保持時間は変わらなかった。一方、ピーク面積に関しては、後ろのピークは注入量の減少に伴い、ピーク面積が増加し、反対に注入量の増加に伴って後ろのピーク面積は減少し、注入量が 0.5 μL 以上になると前のピークのみが検出された。つまり後ろのピークは、試料の注入量が少ないほど検出され易かった。

オートサンプラーで少量の試料を注入した際に2本のピークが検出されるのは、オートサンプラーの注入機構に起因していると考えた。オートサンプラーでは試料をまず一定量吸引し、その後、6方バルブが回転し、指定した注入量の試料がループに導入される。例えば、ループが長さ 10cm で容量が 5 μL の時に、100nL の試料を注入すると、僅か 2mm の試料プラグしかループ側に吸引されない。吸引体積が微量であると、試料ゾーンが十分に移動しないまま、再び六方バルブが回転することになる。その結果、ループ内の両端のそれぞれに試料プラグが存在する状態になる。ループの両端に存在する試料バンドは、分かれた状態でカラムへと導入されるため、

それぞれが前のピークと後ろのピークとして検出される。試料量が少ないほど、後ろのピークの割合が増加する原因は、注入量が少ないほどシリンジによって吸引される体積が減少し、試料を十分に吸引できず、残存する可能性が高くなるためと考えられる。逆に、注入量が増加すると、大量の溶液が吸引されるため、試料が残存することがなくなり、1本のピークとして検出される。一方、マニュアルインジェクターの場合には、規定量の試料しかループに注入しないため、このような現象は生じない。このように考えると、オートサンプラーで少量の試料を注入すると物質の種類に寄らず、いろいろな物質で2本のピークが検出される理由が説明できる。したがってオートサンプラーで微量な試料を注入するときは、試料が正確に注入されているかの確認が重要である。

(2) 電気泳動によるナノ粒子の分離

ナノマテリアルとして有機物質としてポリエチレングリコール(PEG)ナノ粒子、無機物質としてシリカナノ粒子に注目し、電気泳動による泳動挙動を比較した。まず始めに泳動液のGly濃度を変化させることで、泳動液のイオン強度がナノ粒子の泳動に与える影響について調べた。泳動液中のGly濃度を5-500mMの範囲で変化させた結果、両者のナノ粒子はGly濃度の上昇に伴い、泳動時間はわずかに早くなり、最終的にPEGナノ粒子は13分程度に、シリカナノ粒子は4分程度で泳動された。シリカナノ粒子の泳動時間は、EOFの指標であるチオウレアの泳動時間より僅かに遅い時間であったのに対し、PEGナノ粒子はチオウレアより、かなり遅い時間に泳動された。今回の実験では、inlet側を陽極にし、EOFより遅い物質は、電気泳動移動度によって陽極側に移動するため、泳動時間の遅いナノ粒子ほど、電気泳動移動度が速くなる。つまり2つのナノ粒子は共にEOFより遅く泳動されているので負電荷を帯びており、PEGナノ粒子の方がシリカナノ粒子よりも電気泳動移動度が大きいことが判明した。Gly濃度の増加に伴い、ナノ粒子の電気二重層が薄くなり、最終的には電気二重層の厚さが無視できるようになると、ナノ粒子の泳動時間は、EOFとほぼ同じ時間になる。つまり今回のシリカナノ粒子のような挙動を示す。一方で、泳動液中のGly濃度が上昇しても、EOFとは大きく異なる約13分に泳動されたPEGナノ粒子は、イオン強度が高くて電気二重層が形成されており、そして二重層部分の電荷の効果によって大きな電気泳動移動度を維持していると考えられる。Gly濃度の高い溶液中でも、PEGナノ粒子表面に電気二重層が形成される理由は、本PEGナノ粒子は沢山の水を含んだPEG鎖で形成され、このPEG鎖部分に電気二重層が形成されているためと予想している。

次に泳動液に添加したSDSが2つのナノ粒子の泳動に与える影響について調べるために、SDS濃度を0-40mMの範囲で変化させ、泳動時間の比較を行った。PEGナノ粒子はSDSを無添加の条件では13分程度で泳動され、CMC濃度(6mM)付近から、急激に泳動時間が増加し、15mM以上の濃度では1時間以内にピークが検出されなくなった。一方、シリカナノ粒子ではSDSが0mMの時は、4.5分程度に溶出し、SDSの添加によって泳動時間が7分と少し遅くなるが、SDS濃度を変化させても、泳動時間は少ししか増加しなかった。2つのナノ粒子を比較すると、PEGナノ粒子の方がシリカナノ粒子より電気泳動移動度が早く、また添加したSDSの影響を受け易いことが分かった。PEGナノ粒子の方が、泳動速度が速く、SDSの影響を受け易い理由は、PEGナノ粒子には、表面に電気二重層を形成している空間が存在するためSDSミセルを取り込むことができるが、シリカナノ粒子にはそのような空間が存在しないためナノ粒子内部にミセルを取り込むことができない。その結果、内部に沢山のSDSを取り込むことのできるPEGナノ粒子の方が、電気泳動移動度が早く、またその影響を受け易いと考えられる。

次に粒子径がナノ粒子の泳動時間に与える影響を調べた。PEGナノ粒子に関しては3種類、シリカナノ粒子に関しては4種類の粒子径の異なったナノ粒子をそれぞれ調製し、その泳動時間を比較した。PEGナノ粒子では粒子径が小さいほど速度が速いのに対し、シリカナノ粒子では粒子径が大きいほど速度が速いという異なった結果が得られた。

最後に、内包物質の影響について調べた。内包するローダミンの濃度が異なったシリカ及びPEGナノ粒子を調製し、それぞれの泳動時間を調べた。ナノ粒子の調製時に添加することでナノ粒子内に内包された物質は、ナノ粒子内部のみならず、表面部分にも存在していると予想される。そのためナノ粒子の総電荷のみならず、表面電荷にも影響を及ぼしていると考えられる。シリカナノ粒子では、ローダミン濃度が高いナノ粒子ほど泳動時間が長くなった。つまり陽極(inlet側)への泳動速度が速くなった。これはローダミン濃度の増加に伴い、ナノ粒子に吸着するSDSの量が増加し、負電荷の量が増加したこと起因すると考えられる。

本研究によって、ナノ粒子の場合、表面状態、粒子径、硬さなどが泳動速度に影響を与えることが分かった。

(3) クロマトグラフィーによるナノ粒子の分離

次に、クロマトグラフィーによるナノマテリアルの分離を試みた。試料には、シリカナノ粒子を用いた。ナノ粒子は、ボイド体積以前に溶出するため、固定相との作用によって保持される化合物とは、溶出時間が大きく異

なることが分かった。ナノ粒子と低分子化合物が異なった時間に溶出することから、それぞれの物質が溶出する時間に適した分離条件を用いることで、良好な分離が達成すると考えた。つまり、最初にナノ粒子の分離に適するようにハイドロダイナミックな分離条件でナノ粒子を分離し、ナノ粒子が溶出した以降は、今度は低分子化合物の分離に適した条件で低分子化合物を分離することで、それぞれの物質の一斉分析が実現すると考えた。そこでまず始めにナノ粒子の分離条件の最適化を行った。

最初に、粒子径の異なった4種類のフルオレセイン内包ナノ粒子(20, 38, 80, 150 nm)を調製し、モノリスカラムで分析した。ハイドロダイナミックな条件で分離を行うために、移動相の流速を0.05ml/minとしたため、カラムの背圧は1.1Mpaとなり、非常に低圧であることから分析中にナノ粒子の変形や崩壊は起きづらいと考えられる。各ナノ粒子の溶出時間は、一番大きい150nmのナノ粒子が14.2分に溶出し、粒子径が小さくなるほど、保持時間が増加し、一番小さい20nmのナノ粒子が16.5分に溶出した。各ピークの溶出時間の再現性は、5%以下であった。DLSで測定した各ナノ粒子の平均粒子径の対数と溶出時間間に負の相関が見られた。今回用いたモノリスカラムの細孔径は18nmであり、試料に用いたナノ粒子と比較して小さいため、余分な相互作用が生じず、良い相関が得られたと考えられる。またナノ粒子と固定相との間の相互作用が無視でき、ナノ粒子はハイドロダイナミックな効果のみで分離されていると考えられる。したがってHPLCの溶出時間から、ナノ粒子の粒子径を求めることが可能だと考えられる。

次に内包物質が溶出に与える影響を調べた。本検討では内包物質として、ローダミンに加えた、実際にナノ粒子製剤に内包されているポリエーテル系抗生物質であるアムホテリシンと抗がん剤であるイリノテカンを選択し、それぞれを内包したシリカナノ粒子を調製し、その溶出挙動を調べた。ローダミン内包ナノ粒子、アムホテリシン内包ナノ粒子とイリノテカン内包ナノ粒子の粒子径は、それぞれ、24、24、28 nmであった。いずれの内包ナノ粒子も、内包されなかった低分子化合物と分離され、非常に早い時間(7分)に溶出した。つまり内包物質を変化させても、ナノ粒子の溶出時間はほとんど変化せず、ハイドロダイナミックな効果で溶出していると考えられる。つまり内包物質は、ナノ粒子の溶出時間にあまり影響を与えないと考えられる。したがって本分析法は、ナノ粒子の迅速な分析に利用できることが示唆された。

次にナノ粒子のピーク強度の線形成について調べた。調製したナノ粒子を異なった希釈率で希釈した時のピーク強度の変化を調べた。検出には、内包薬物に特徴的な波長であるアムホテリシンではUV410nmをイリノテ

カンは蛍光(励起波長365 nm、蛍光波長440 nm)を用いた。これらの波長は、シリカナノ粒子自身による妨害は見られなかった。ナノ粒子のピークは、試料の希釈率に応じて変化した。つまり内包薬物の量に応じて、ピーク強度が変化した。ピーク強度と内包薬物量との間には良好な線形性($R^2=0.985$, 0.999)が見られた。蛍光で検出されるイリノテカンの方が、UVで検出しているアムホテリシンより定量範囲が広がった。これはピークの形状がブロードであるため、蛍光と比較して感度の悪いUVで検出しているアムホテリシンは低濃度での検出が難しいことに起因していると考えられる。

今度は、粒子径と内包量の関係を調べた。粒子径の異なったナノ粒子(20, 30, 40, 60 nm)は、反応時間や添加するTEOSの量を変化させ調製した。アムホテリシンの内包量は、粒子径の増加に伴い増加し、それに伴い遊離アムホテリシンの残存量は減少した。粒子径が20 nmから60 nmに3倍増加すると表面積は9倍に増加するが、内包薬物量は4.5倍程度増加した。ナノ粒子の成長に伴って、周囲に存在する遊離アムホテリシンがナノ粒子に内包されるため、内包量は表面積に比例して増加すると期待されたが、表面積の増加割合よりも内包量の増加割合は小さかった。これは薬物がナノ粒子に内包されることで、溶液中の遊離薬物量が減少し、粒子径が大きくなるほど、取り込み効率が減少したためと考えている。

我々は、ナノ粒子と低分子化合物の同時分析法を開発した。そこで本法を用いて、以下のナノ粒子の精製法の比較を行った。1)限外濾過、2)透析、3)超遠心(14200g)、4)超遠心(9100g)。回収率は、精製前後の各ピークの面積比より計算した。

ナノ粒子の回収率は、限外濾過がもっとも高く、続いて、透析、超遠心(強)、超遠心(弱)の順であった。本研究では、ナノ粒子の分離に適したモノリス構造を調製し、ナノ粒子の大きさや表面構造に基づいた迅速な分離法を開発した。

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 8件)

L. Ren, K. Ishihara, M. Kato "Elution of two separated peaks when injection small sample volume using autosampler" *Chromatography* 2014, **35**, 59-62.

DOI: 10.15583/jpchrom.2014.004

K. Takagi, S. Murayama, T. Sakai, M. Asai, T. Santa, M. Kato, "A computer simulation study of the network structure of a hydrogel prepared from a

tetra-armed star pre-polymer” *Soft Matter* 2014, **10**, 3553-3559.
DOI:10.1039/C3SM52908H

J. P. Quirino, M. Kato “Separation of cationic analytes by nonionic micellar electrokinetic chromatography using polyoxyethylene lauryl ether surfactants with different polyoxyethylene length” *J. Sep. Sci.* 2014, **37**, 2613-2617.
DOI: 10.1002/jssc.201400500

N. Itoh, A. Sano, T. Santa, M. Kato “Simultaneous analysis of nanoparticles and small molecules by high-performance liquid chromatography using a silica monolithic column” *Analyst*, 2014, **139**, 4453-4457.
DOI: 10.1039/C4AN00819G

M. Kato, M. Sasaki, Y. Ueyama, A. Koga, A. Sano, T. Higashi, T. Santa “Comparison of the migration behavior of nanoparticles based on polyethylene glycol and silica using micellar electrokinetic chromatography” *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**, 468-474.
DOI: 10.1002/jssc.201401086

N. Itoh, T. Santa, M. Kato “Rapid evaluation of the quantity of drugs encapsulated within nanoparticles by high-performance liquid chromatography in a monolithic silica column” *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 6429-6434.
DOI: 10.1007/s00216-015-8805-0

N. Itoh, T. Santa, M. Kato “Rapid and mild purification method for nanoparticles from a dispersed solution using a monolithic silica disk” *J. Chromatogr. A*, 2015, **1404**, 141-145.
DOI:10.1016/j.chroma.2015.05.047

N. Ito, E. Yamamoto, T. Santa, T. Funatsu, M. Kato “Effect of nanoparticle surface on the HPLC elution profile of liposomal nanoparticles” *Pharm. Res.* in press.
DOI 10.1007/s11095-016-1886-4

〔学会発表〕(計 52 件)

第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム “タンパク質内包ナノ粒子を用いた細胞の機能制御” (招待講演) 東京、2013 年 8 月

日本分析化学会第 64 年会 “モノリス型カラムによるナノメディシンの分離” (依頼講演) 福岡、2015 年 9 月

BK21Plus Symposium for Nanobio Materials and Advanced Analytical Techniques “Development of nanoparticles and their analytical method for medical application” (招待講演) 韓国、2016 年 1 月

日本薬学会第 135 年会 “ナノマテリアルの分離分析法の開発” (依頼講演) 横浜、2016 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/CNBI/kato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 大 (KATO, Masaru)
東京大学・大学院薬学系研究科・特任准教授

研究者番号：30332943