様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　１２　日現在

機関番号：　８２６２６
研究種目：　若手研究(A)
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６７０８０２１

研究課題名（和文）カーボンナノチューブを用いた蛋白質の光クロマトグラフィ

研究課題名（英文）Light-assisted liquid chromatography 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・ナノ材料研究部門・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）　　18,400,000円

研究成果の概要（和文）：当該研究ではカーボンナノチューブをリガンドとするカラム（カーボンナノチューブカラム）を作製し、光照射によって蛋白質を分離する新規技術開発に取り組んだ。カーボンナノチューブカラムには芳香族アミノ酸、とりわけトリプトファンを保持する性質があり、また、システインを酸化させてジスルフィド結合を形成する作用があることが明らかになった。したがって、蛋白質を精密に分離するためには、芳香族アミノ酸残基を介した蛋白質の過剰な非特異的吸着を抑制するとともに、システイン残基の酸化を抑制することが必須であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A liquid chromatography column using carbon nanotubes as ligands was fabricated for realizing light-assisted liquid chromatography for protein separation. It was found that the carbon nanotubes immobilized in the column interact with aromatic amino acids, especially with tryptophan, and that they oxidize cysteine, resulting in disulfide formation. Thus, prevention of excess protein adsorption onto the carbon nanotubes and suppression of cysteine oxidation are necessary for fine control of the protein separation in this system.

研究分野：　蛋白質科学

キーワード：　ナノチューブ　蛋白質

１．研究開始当初の背景

蛋白質を利用したバイオ医薬品は、ターゲットに対する高い特異性をもち、かつ副作用が少ないため、従来の低分子の医薬品に代わる高い効能が期待されている。しかしその一方で、バイオ医薬品は溶液中で不安定であり、凝集や変性を引き起こしやすいため、抗原性などの問題が懸念されている。バイオ医薬品をいかに安定に精製するかが産業応用上の課題である。

現在、蛋白質の基本的な精製はアフィニティクロマトグラフィやイオンクロマトグラフィなどによって行われているが、多くの場合、カラムからの蛋白質の溶出には溶液の置換が不可欠である。この溶液環境変化によるストレスが上述の蛋白質の変性・凝集といった深刻な問題の一因となっている。最近ではカラム担体に複数の結合モード（イオン交換・疎水性相互作用など）を導入した方法が開発され、一定の改善効果も報告されてはいるが、これらの分離法であっても、リガンドと蛋白質の親和性の制御は基本的に溶液条件（pH、温度、溶質濃度）の変化に頼らざるをえないため、溶液環境変化によるストレスの問題を解決できてはいない。

２．研究の目的

これらの問題を抜本的に解決するための手段として申請者は、溶液環境を変えること無く、リガンド/蛋白質間の吸着力をカラム外部から局所的に変化させるアプローチを着想した。それは光に応答するカーボンナノチューブをカラムのリガンドに使用し、カラムへの「光照射」によって蛋白質の溶出制御を行うという技術である。これによって溶液環境を一切変化させることなく、蛋白質を精製することが可能になる。本技術の原理は、可視光がカーボンナノチューブの状態を変化させるが、蛋白質（の多く）には作用しないという普遍的な性質に基づいている。

３．研究の方法

カラム担体のアミノ基を介してカーボンナノチューブを固定化させることでカーボンナノチューブをリガンドとするカラム（カーボンナノチューブカラム）を作製した。カーボンナノチューブカラムの物性を詳細に調べるために、蛋白質の構成要素であるアミノ酸をカーボンナノチューブカラムに流し、溶出時間を測定した。また、カーボンナノチューブへの蛋白質の過剰な非特異的吸着を抑制するために、吸着抑制添加剤の探索を行った。吸着抑制力の評価軸には、各種添加剤存在下でのバッチ吸着による未吸着蛋白質量の測定値を利用した。カーボンナノチューブとの酸化還元反応の同定には吸収スペクトル測定や質量分析などを利用した。さらに、カーボンナノチューブと蛋白質のシステイン残基の酸化還元反応を実証するために、還元変性リゾチームを用いたカーボンナノチューブの吸収スペクトル測定を行った。

４．研究成果

（１）カーボンナノチューブカラムを用いたアミノ酸の溶出実験から、芳香族アミノ酸、とりわけトリプトファンがカーボンナノチューブに対する強い親和性を有することが明らかになった（図１）。カーボンナノチューブに対する芳香族アミノ酸の親和性は Trp > Tyr > Phe の順番であり、量子化学計算などの報告と一致する結果が得られた。また、分子動力学計算から、カーボンナノチューブの曲率が小さいほど（直径が大きいほど）、カーボンナノチューブに対する芳香族アミノ酸の親和性が大きくなるという結果が得られた。本知見から、カーボンナノチューブの直径を揃えることがカーボンナノチューブカラムによる蛋白質の精密分離に欠かせないことが示唆された。

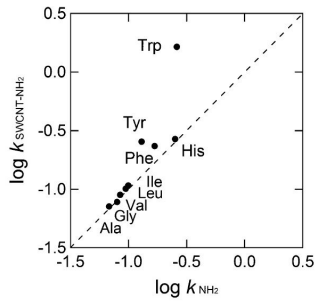

図１．カーボンナノチューブカラム(SWCNT-NH2)とカーボンナノチューブ非固定化カラム(NH2)からの各種アミノ酸の溶出時間の関係。数値が大きいほど溶出時間が長いことを意味する。

（２）以上から蛋白質は芳香族アミノ酸残基を介してカーボンナノチューブに吸着することが明らかになった。カーボンナノチューブカラムを使用して蛋白質を分離するには、このような蛋白質の過剰な非特異的吸着をある程度抑制する必要があるため、吸着を抑制する添加剤の探索を行った。各種アミノ酸や塩や蛋白質変性剤などを比較した結果、蛋

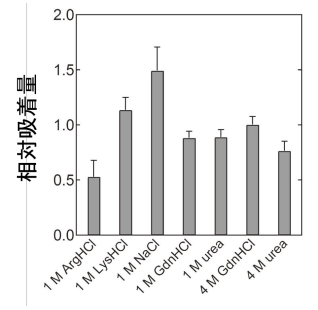

図２．各種添加剤存在下でのカーボンナノチューブに対するニワトリ卵白リゾチームの吸着量の相対値。

白質凝集抑制剤としても知られているアミノ酸であるアルギニンが有効であることが明らかになった（図２）。さらに、アルギニンは非特異的な吸着を抑制するだけでなく、蛋白質の活性も維持させることもわかり、カーボンナノチューブカラムで蛋白質を分離する際の展開溶媒の溶質として有用であることが示唆された。

（３）上記１の実験を進めている過程で、チオール基をもつアミノ酸であるシステインとカーボンナノチューブが酸化還元反応を引き起こすことが明らかになった。これは当初予期しない結果であり、この反応の詳細な機構解明がカーボンナノチューブカラムによる蛋白質の分離を実現させる上で必要不可欠であると考えた。システインは酸化するとジスルフィド結合を形成し、シスチンに変わることが一般に知られている。したがって、システインはカーボンナノチューブとの酸化還元反応によってシスチンに化学変化することが予想された。実際に、システインからの生成物の吸収スペクトルにおいてシスチン由来のピークが観察され、さらに質量分析からシスチンが生成されていることが明らかになった（図３）。

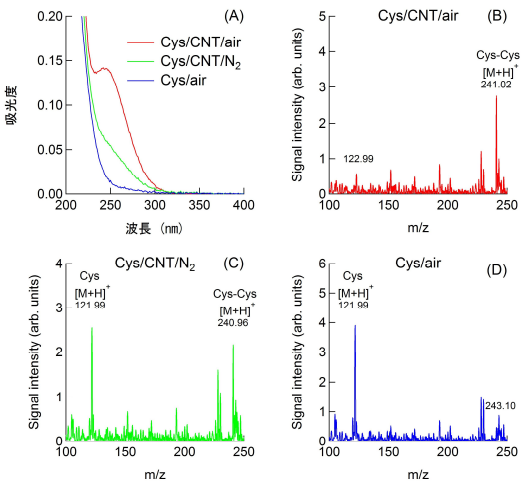

図３．カーボンナノチューブとの酸化還元反応によるシステインからの生成物の吸収スペクトルと質量スペクトル。(A)大気中(Cys/CNT/air)または窒素雰囲気下(Cys/CNT/N_2)で得られた生成物の吸収スペクトルおよびカーボンナノチューブ非存在下で得られた生成物の吸収スペクトル(Cys/air)。(B) Cys/CNT/air に対する質量スペクトル。(C) Cys/CNT/N_2 に対する質量スペクトル。(D) Cys/air に対する吸収スペクトル。

（４）カーボンナノチューブによるチオールの酸化の一般性を確認するために、ジチオスレイトール（DTT）とグルタチオン（GSH）を用いた比較実験を行った。その結果、いずれのチオール化合物においてもジスルフィド結合の形成が確認された。反応収率は Cys > DTT > GSH であった（図４）。グルタチオンの構造にはシステインが含まれているにもかかわらず、システインより反応性が低下することから、蛋白質のシステイン残基もシステインより反応性が低いことが予想される。

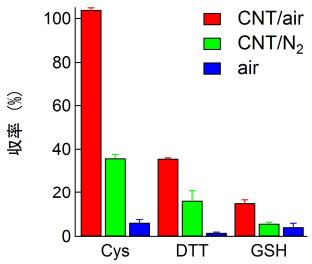

図４．カーボンナノチューブとの酸化還元反応におけるシステイン、ジチオスレイトール（DTT)、グルタチオン（GSH）の反応収率。

（５）上記３，４によって明らかになったカーボンナノチューブとチオールの酸化還元反応が蛋白質のシステイン残基でも起こることを、ニワトリ卵白リゾチームをモデルに用いて実証した。還元変性リゾチームをカーボンナノチューブ分散液に添加した結果、吸収スペクトルの回復が観察され、カーボンナノチューブの還元が確認された（図５）。一方で、ネイティブリゾチームの場合には回復が見られなかったことから、還元変性リゾチームがもつフリーのシステイン残基がカーボンナノチューブと酸化還元反応を起こすことが明らかになった。

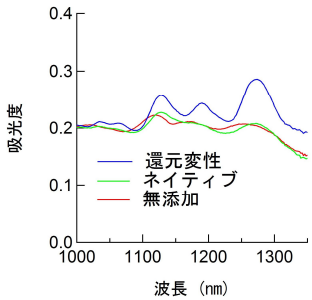

図５．還元変性リゾチームまたはネイティブリゾチームの添加によるカーボンナノチューブの吸収スペクトル変化。

（６）本研究によって得られたカーボンナノチューブと蛋白質あるいはアミノ酸残基との相互作用の知見は、カーボンナノチューブカラムを用いた蛋白質の分離に有用であり、蛋白質の分離技術の更なる発展に貢献するものである。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計４件）

① Atsushi Hirano, Tomoshi Kameda, Shun Sakuraba, Momoyo Wada, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura. Disulfide Bond Formation of Thiols by Carbon Nanotubes. Nanoscale 9, 5389-5393 (2017).
DOI: 10.1039/C7NR01001J

② Kazuki Iwashita, Kentaro Shiraki, Rieko Ishii, Takeshi Tanaka, Atsushi Hirano. Arginine Suppresses the Adsorption of Lysozyme onto Single-Wall Carbon Nanotubes. Chem. Lett. 45, 952-954 (2016).
DOI: 10.1246/cl.160390

③ Atsushi Hirano, Tomoshi Kameda, Yohei Yomogida, Momoyo Wada, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura. Origin of the Surfactant-Dependent Redox Chemistry of Single-Wall Carbon Nanotubes. ChemNanoMat 2, 911-920 (2016).
DOI: 10.1002/cnma.201600190

④ Kazuki Iwashita, Kentaro Shiraki, Rieko Ishii, Takeshi Tanaka, Atsushi Hirano. Liquid chromatographic analysis of the interaction between amino acids and aromatic surfaces using single-wall carbon nanotubes. Langmuir 31(32), 8923-8929 (2015).
DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02500

〔学会発表〕（計４件）

① 平野　篤、岩下　和輝、白木　賢太郎、桜庭　俊、亀田　倫史、石井　梨恵子、田中　丈士、カーボンナノチューブと芳香族アミノ酸の相互作用／Interactions between carbon nanotubes and aromatic amino acids、第 51 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、2016 年 9 月 8 日、北海道立道民活動センターかでる 2・7（北海道・札幌）

② 平野　篤、岩下　和輝、白木　賢太郎、桜庭　俊、亀田　倫史、石井　梨恵子、田中　丈士、水溶液中におけるカーボンナノチューブとアミノ酸の相互作用、第 5 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2016 年 9 月 6 日、北海道立道民活動センター かでる 2・7（北海道・札幌）

③ 平野　篤、岩下　和輝、白木　賢太郎、石井　梨恵子、田中　丈士、Inhibition of protein adsorption onto carbon nanotubes by arginine／アルギニンによるカーボンナノチューブへのタンパク質吸着の抑制、第 16 回日本蛋白質科学会、2016 年 6 月 9 日、福岡国際会議場（福岡県・福岡）

④ 平野　篤、和田　百代、田中　丈士、片浦　弘道、単層カーボンナノチューブによるチオールのジスルフィド結合形成／Disulfide bond formation of thiols using single-wall carbon nanotubes、第 50 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、2016 年 2 月 22 日、東京大学　伊藤国際学術研究センター（東京都・文京区）

〔産業財産権〕

○出願状況（計１件）

名称：カーボンナノチューブを用いたジスルフィド結合形成反応
発明者：平野　篤、田中　丈士、片浦　弘道
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願 2016-029888 号
出願年月日：平成２８年２月１９日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
https://staff.aist.go.jp/hirano-a/index.html

６．研究組織

(1)研究代表者
平野　篤（HIRANO, Atsushi）
（国研）産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・主任研究員
研究者番号：９０６１３５４７