

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26810087

研究課題名(和文)蛋白質液体の作成法の確立とその物性に関する研究

研究課題名(英文) Establishment of the preparation method and study on the physical properties of liquid protein.

研究代表者

野島 達也 (Nojima, Tatsuya)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：40721858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は精緻な構造を持った機能性分子であり材料科学への広い応用が期待される。本研究では高タンパク質含有量(120-310mg/mL)の水と分離した液状材料を、タンパク質と陰イオン性および陽イオン性界面活性剤の単純な混合により開発した。この材料は、タンパク質と界面活性剤は静電相互作用により複合化し、その複合体が疎水相互作用によって会合するという階層的な構造を有する。界面活性剤の親水部が水を保持するためこの物質は内部に水を有しており、タンパク質は構造と機能を保っている。これらの優れた特性はタンパク質の構造機能性材料としての利用においてこの物質の優位性を示す。

研究成果の概要(英文)：The protein, as a precisely structured functional molecule, has broad potential in material science. However, a general and versatile method to materialize the protein has not yet been established.

In this study, high-protein content (120 - 310 mg/mL), water-immiscible liquid material was developed by simple mixing of an aqueous protein solution with a solution containing specific amounts of both anionic- and cationic surfactants. The material has a hierarchical structure whereby the protein and the ionic surfactants are electrostatically complexed and yields an ordered fluid through moderate hydrophobic interactions. The material contains water inside associated with the hydrophilic part of the surfactants and, importantly maintains the function of the native protein. These significant features of this material are advantageous for practical use of protein as structural and functional material.

研究分野：タンパク質科学、タンパク質材料

キーワード：タンパク質 タンパク質材料 ソフトマテリアル 界面活性剤 分子集合 液状物質 高タンパク質濃度 酵素触媒

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質はナノメートルスケールの精緻な立体構造と多様な機能を有する物質である。そのような優れた性質を持つタンパク質を素材とすることでこれまでにない特性を持つ新規物質の開発が期待される。

通常希薄な水溶液として扱われるタンパク質を目で見え・手で扱える実用的なマクロスケールの材料とするためには水中に分散するタンパク質を高度に集合させる必要がある。しかしながらそれを達成する汎用的で簡便な手段はなかった。

2009年イギリスのMannらのグループはタンパク質のアスパラギン酸とグルタミン酸残基の修飾によりカチオン化したタンパク質の溶液にPEG(ポリエチレングリコール)部位とアルキル鎖部位をもつ陰イオン性界面活性剤を混合し、凍結乾燥によって水分を除去した残渣(タンパク質と界面活性剤が結合したもの)が加熱により液体化することを報告し、これをタンパク質液体と名づけた(引用文献①)。タンパク質液体ではカチオン化タンパク質と陰イオン性界面活性剤は静電相互作用により化学量論的に複合化している。タンパク質液体は、まさしくタンパク質の集合により形成された新規機能性材料であり、そのマイクロスケールの物性は構成タンパク質のナノスケールの構造特性が反映される。

しかしながらタンパク質液体の作製には1週間以上の時間と煩雑な作業を必要とした。また、手法を適用できるタンパク質にも制限があった。特に問題点としてアスパラギン酸とグルタミン酸残基の化学修飾によるカチオン化の過程で多くのタンパク質が変性・凝集してしまうことを私たちは確認した。そこで我々はタンパク質へのダメージが少ないより簡便な作成方法を探索した。その結果、未修飾のタンパク質に対して陰イオン性と陽イオン性界面活性剤の両方を組み合わせることでタンパク質液体を調製できることを見出していた。

## 2. 研究の目的

私達が見出した陰イオン性と陽イオン性界面活性剤を組み合わせるという方法論を様々なタンパク質に応用し、タンパク質液体を作成することを目的とした。さらに作成したタンパク質集合材料の構造特性や物性と構成タンパク質の特性との関連性についての知見を得ることを目指した。また、研究の過程においてMannらの報告したタンパク質液体とは明確に異なるタンパク質集合材料である「タンパク質凝縮体」の開発にいたり、それがタンパク質液体よりも優れた性質を有していたため、その特性についても分析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

### ①タンパク質

本研究には以下のタンパク質を用いた。大腸菌を用いて組み換えタンパク質として調製：緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、Dpsタンパク質、オルニチントランスカルバミラーゼ、メーカーより購入：オボアルブミン、リゾチーム、グルコースオキシダーゼ、モノクローナル抗体(オマリズマブ)、ヒト血清ガンマグロブリン画分。すべて必要に応じて各種クロマトグラフィーにて精製した。

### ②界面活性剤

PEG部位とアルキル鎖部位をもつ市販の陰イオン製界面活性剤(Sigma-Aldrich, 463248, 463256)はアミノプロピルシリカゲルを用いて精製し実験に使用した。陽イオン性界面活性剤は陰イオン性界面活性剤と3-(ジメチルアミノ)-1-プロピルアミンを縮合させ合成し、アミノプロピルシリカゲルを用いて精製し実験に使用した。陰イオン及び陽イオン性界面活性剤は純水に溶解させ、水酸化カリウムあるいは塩酸を用いてpHを中性とした後、濃度を100mMに調整し利用した。

### (2) タンパク質-界面活性剤複合材料の作成

#### ①タンパク質液体の調製

タンパク質水溶液に対して陰イオン及び陽イオン性界面活性剤を様々な比率で添加した。添加量はタンパク質と界面活性剤の静電相互作用を阻害する塩などの電解質と過剰の界面活性剤を除くために、界面活性剤を添加した溶液を対して透析した。透析後の溶液を凍結乾燥し、得られた残渣を加熱し50-80度に加熱し性状の変化を観察した。

#### ②タンパク質凝縮体の調製

タンパク質水溶液に対して陰イオン及び陽イオン性界面活性剤を様々な量比で添加し、懸濁が発生した条件で遠心分離して液液相分離の発生を確認した。

### (3) 分析

タンパク質の構造状態を円偏光二色性スペクトル測定(JASCO社製, J820)にて確認した。構成成分の定量を以下に行った。タンパク質と界面活性剤の静電複合物を2mol/L NaCl水溶液に溶解した。タンパク質は溶解水溶液の280nmの吸光度を、予めBCA法にて定量した精製タンパク質の吸光度と比較することで定量した。溶解水溶液に当量のアセトニトリルを加え界面活性剤をアセトニトリルに抽出した。抽出した界面活性剤は1,2,4,5-テトラクロロ-3-ニトロベンゼンを内部標準物質として定量NMR測定を行い、陰イオン性と陽イオン性界面活性剤の両者に共通する末端メチル基および陽イオン性界面活性剤のみが有するアミドプロトンのシグナル比より定量した。水分含有量は熱重量変化測定にて100度までに失われた重量として求めた。構造解析としてX線小角散乱

(Rigak 社製、Nanoviewer)および金属含有タンパク質を用いた走査型透過電子顕微鏡観察（日立ハイテク社製、S-5500SEM）を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) タンパク質液体の調製

本研究開始当初より見出していた陽イオン性及び陰イオン性界面活性剤の混合によるタンパク質液体作成の条件検討を行った。二つの界面活性剤の比率を様々に変えてタンパク質溶液に添加し、透析により過剰の界面活性剤および電解質を除去した後凍結乾燥を行った。その結果、様々な条件（二種類の界面活性剤の初期比率）で液状物質が得られた。また、過剰の界面活性剤が透析により除去されていないことも得られた液状物質の重量より示唆された。これらの結果は、当初の手法では、タンパク質とイオン性界面活性剤の静電相互作用による化学量論的な複合化によってタンパク質液体を作成できないことを意味するため、手法の改善が必要であった。

##### (2) タンパク質凝縮体の開発、分析、応用

###### ①新規タンパク質集合現象の発見

上記タンパク質液体作成の過程において、一定条件条件下で、透析後に透析膜の中に水と分離した液状物質が発生していることを見出した（図1）。このとき水相に残ったタンパク質を定量した結果、液状物質のタンパク質含有量が非常に高いことが示唆された。そこでこの物質を、水中に分散するタンパク質の凝縮によって形成された物質という意味を込めて「タンパク質凝縮体」と名付けた。タンパク質凝縮体は生化学実験に用いられるピペットなどによる回収や取扱が可能だった。タンパク質科学において界面活性剤はタンパク質の水への分散性・溶解性の向上に用いられる。タンパク質凝縮体の形成は、界面活性剤によって誘起される新規タンパク質集合現象であるため、タンパク質液体よりも優れた新たなタンパク質材料開発につながる可能性があると考え、その研究を行った。



図1 透析膜中に発生した水と分離した液状物質

###### ②タンパク質凝縮体発生条件の体系的分析

初期塩濃度条件や加える二種類の界面活性剤の比率およびタンパク質に対する総量を様々に変更し観察を行った。その結果様々なタンパク質において、低塩濃度（10 mM 以下）

のタンパク質水溶液に一定量比で界面活性剤を加えると瞬時に水溶液が懸濁し、それを遠心分離するとタンパク質凝縮体が発生することを見出した（図2）。タンパク質凝縮体形成時におけるタンパク質の等電点と二種類の界面活性剤の比率を分析した。等電点7以上の塩基性タンパク質の場合、陰イオン性界面活性剤を陽イオン性界面活性剤よりも多く必要とし、等電点7以下の酸性タンパク質の場合その逆に要イオン性界面活性剤を多く必要とした。これらの結果から、タンパク質凝縮体の形成はタンパク質と界面活性剤との静電相互作用によるものと示唆された。

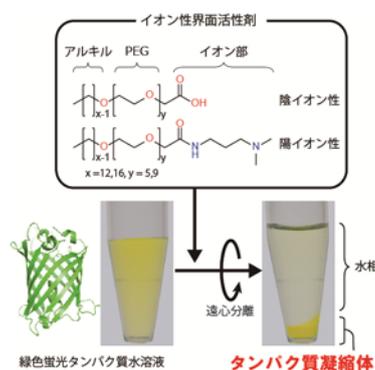


図2 確立したタンパク質凝縮体作成方法

###### ③タンパク質凝縮体の成分分析

タンパク質凝縮体のタンパク質含有量はタンパク質と界面活性剤の種類によって異なっていたが、その含有量は120-311 mg/mLといずれも非常に高かった。円偏光二色性スペクトル測定によりタンパク質は変性していないことが示された。タンパク質凝縮体は水と明確に分離した物質ではあるがその重量の約70%が水分だった。水分量は界面活性剤のPEG鎖長に関連していたことから、水和性高分子であるPEGにより水が保持されていることが示唆された。タンパク質一分子あたりの陽イオン及び陰イオン性界面活性剤の個数を求めた。すべてのタンパク質凝縮体において、タンパク質の総電荷数と界面活性剤の総電荷数とに正負逆転した関係があった。これよりタンパク質凝縮体中でタンパク質と界面活性剤が静電相互作用により複合化していることが強く示唆された。

###### ④タンパク質凝縮体の構造解析

タンパク質凝縮体内部でのタンパク質の集合構造を分析するためにX線小角散乱(SAXS)測定を行った（図3）。タンパク質立体構造に由来する散乱(形状因子)のみが観察される水溶液と異なりタンパク質凝縮体はタンパク質集合構造(構造因子)に由来する散乱ピークを示した。タンパク質凝縮体内部でタンパク質は一定の距離を保って配置されていることが示された。無機粒子内包タンパク質を用いて作成したタンパク質凝縮体の電子

顕微鏡観察においても一定間隔でのタンパク質集合が確認された。

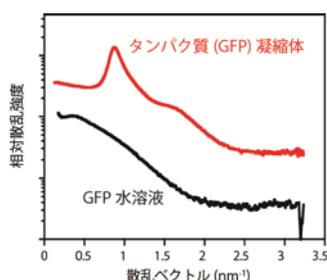


図3 タンパク質水溶液と凝縮体のSAXS測定

#### ⑤タンパク質凝縮体の構造モデル

静電相互作用による複合化の結果、タンパク質周囲には界面活性剤親水部の PEG が局在し、その外側にアルキル鎖が位置する。PEG はタンパク質の安定化などに有効な高分子であり、またそれが水を保持するため、タンパク質は水溶液中と変わらない水に囲まれた環境にある。個々のタンパク質-界面活性剤複合体がアルキル鎖同士の疎水相互作用で集合しタンパク質凝縮体を形成していると考えられる (図 4)。

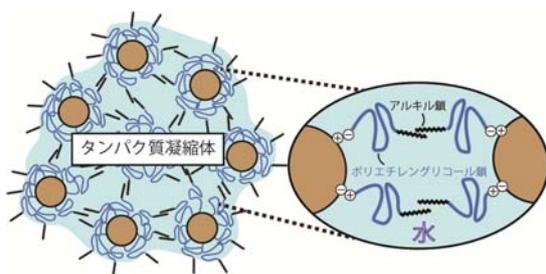


図4 タンパク質凝縮体の構造モデル

#### ⑥タンパク質凝縮体を用いた酵素活性ゲルの作製

タンパク質凝縮体は内部に水を保持しているため、水溶性化合物を内部に導入することができる。そこで水溶性の重合性ゲル化剤であるアクリルアミド/ビスアクリルアミドを導入したタンパク質凝縮体(タンパク質として酵素ダルグルコースオキシダーゼを使用)を調製した。紫外線照射によってゲル化剤を重合したところ、タンパク質凝縮体はゲル化した。このゲルを酵素の反応基質が含まれる溶液に浸漬すると酵素活性が確認された。タンパク質凝縮体を用いて酵素活性を示すゲルを作成することが可能であることが示された。

#### (3)タンパク質凝縮体形成の発見意義

本研究では、当初の目的であったタンパク質液体とは異なるタンパク質集合材料であるタンパク質凝縮体の開発に成功した。タンパク質液体の作成において最も時間を要す

る水分除去(凍結乾燥)工程が必要としなくなったことによって作成効率は格段に向上した。また界面活性剤の量比を最適化することで、過剰の界面活性剤を透析によって除去する必要もなくなった。開発した手法は様々なタンパク質に応用可能であり、タンパク質の新たな両方の開発につながる。タンパク質液体と異なり内部に水を含むため、水中と変わらないタンパク質機能(酵素活性など)を示すことが可能であるという優位性がある。

タンパク質溶液を 100 mg/mL まで濃縮することはタンパク質の応用利用に重要であるが、現在のタンパク質科学においても解決すべき課題である。開発した技術を新たなタンパク質濃縮技術としても応用可能である。

タンパク質のような複雑な形状のナノ粒子が水溶液中で瞬時に秩序構造を形成することは新たな発見であり、本研究はタンパク質科学分野のみならず広く分子科学の発展に寄与する。高いタンパク質含有量の内部秩序を有する液状物質物質であることから、新しいタンパク質の保存方法やバイオマテリアルの作成、抗体医薬品などのタンパク質製剤の開発など、幅広い応用可能性を持つ。

#### <引用文献>

① A. W. Perriman H. Cofen, R. W. Hughes, C. L. Barrie and S. Mann, Solvent-Free Protein Liquids and Liquid Crystals, Angewandte Chemie International Edition, 48, 2009, 6242-6246,

#### 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 2 件)

① Tatsuya Nojima, Tomokazu Iyoda, Water-Rich Fluid Material Containing Orderly Condensed Proteins, Angewandte Chemie International Edition, 査読有, 56, 2017, 1308-1312, DOI: 10.1002/anie.201609974

② Tatsuya Nojima, Seiya Suzuki, Tomokazu Iyoda, Atelocollagen-templated fabrication of tangled fibrous silica, Journal of Materials Chemistry B, 査読有, 4, 2016, 6640-6643, DOI: 10.1039/C6TB01770C

[学会発表] (計 18 件)

① 野島達也、彌田智一、高いタンパク質含有量の液状マテリアル「タンパク質凝縮体」の開発、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、2016年11月22日、福岡

② 野島達也、彌田智一、タンパク質とイオン性界面活性剤の複合化による秩序を有する液状物質の発生、第67回コロイドおよび界面化学討論会、2016年9月22日、旭川

- ③ 野島達也、彌田智一、液状タンパク質集積物質「タンパク質凝縮体」の開発と応用、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 8 日、金沢
- ④ 野島達也、Protein Condensate: development of integrated-protein liquid material、分子科学研究所研究会「超機能分子の創製：合成、計測、数値が織りなす社会実装分子の戦略的設計と開発」、2016 年 6 月 27 日、岡崎
- ⑤ 野島達也、彌田智一、液状タンパク質集積材料「タンパク質凝縮体」の開発、第 16 回タンパク質科学会年会、2016 年 6 月 9 日、福岡
- ⑥ 野島達也、彌田智一、タンパク質より成る液状物質タンパク質凝縮体 (Protein Condensate)の開発・解析・応用、第 4 回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2016 年 3 月 1 日、東京
- ⑦ Tatsuya Nojima、Tomokazu Iyoda、Protein Condensate: Novel Ordered State of Protein with Surfactant and Water、The 16th Ries-Hokudai International Symposium、2015 年 11 月 10 日、札幌
- ⑧ 野島達也、彌田智一、タンパク質と界面活性剤と水の複合化合物「タンパク質凝縮体」の開発、第 64 回高分子討論会、2015 年 9 月 16 日、仙台

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称：タンパク質凝縮体ゲルおよびその製造方法

発明者：野島達也、彌田智一  
 権利者：国立大学法人東京工業大学  
 種類：特許  
 番号：特許願 2017-25407  
 出願年月日：平成 29 年 2 月 14 日  
 国内外の別：国内

名称：タンパク質凝縮体膜およびその製造方法

発明者：野島達也、彌田智一  
 権利者：国立大学法人東京工業大学  
 種類：特許  
 番号：特許願 2016-060125  
 出願年月日：平成 28 年 3 月 24 日  
 国内外の別：国内

名称：タンパク質凝縮体ゲルおよびその製造方法

発明者：野島達也、彌田智一  
 権利者：国立大学法人東京工業大学  
 種類：特許  
 番号：特許願 2016-060124  
 出願年月日：平成 28 年 3 月 24 日  
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：タンパク質凝縮物およびその製造方法、並びにタンパク質凝縮物膜

発明者：野島達也、彌田智一  
 権利者：国立大学法人東京工業大学  
 種類：特許  
 番号：特許第 6115980 号  
 出願年月日：平成 27 年 5 月 8 日  
 取得年月日：平成 29 年 3 月 31 日  
 国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野島 達也 (Nojima, Tatsuya)  
 東京工業大学・科学技術創生研究院・特任助教  
 研究者番号：40721858