

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82626
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17H02726
研究課題名(和文) 分子膜ナノチャンネル垂直配向集積化フィルターの創製とタンパク質分離精製への応用

研究課題名(英文) Construction of Vertical Alignment Filters Assembled from Monolayer Membrane Nanochannels and Their Bio-application for Separation and Purification of Proteins

研究代表者
亀田 直弘 (Kameta, Naohiro)

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：20517297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,080,000円

研究成果の概要(和文)：医薬用途等の拡大に伴い、タンパク質の生産プロセスにおける効率的な分離・精製技術の開発が喫緊の課題となっている。本研究では、タンパク質の高効率分離・高純度精製を目的とし、陽極酸化アルミナ膜空孔内に合成脂質分子から成る分子膜ナノチャンネルを垂直配向・集積化後、ゾルゲル反応により固定化したハイブリッドナノフィルターを開発した。タンパク質の分離効率に及ぼすナノチャンネルの口径サイズ効果、膜表面官能基との相互作用などを明らかにした。また、既存の分離法では除去対象である目的タンパク質の変性体や凝集体に対して、凝集解離・リフォールディング促進・活性再生機能を付与したナノフィルターの創出にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
有用性物質の分離、化学資源の貯蔵、触媒的物質変換、汚染物質の除去、生活水の獲得等の社会ニーズに応えるべく、多種多様な構成成分、次元・形状・サイズを有するフィルターが開発されてきた。フィルター膜に対して口径数十ナノメートル以下の縦穴を整然と集積化できれば、分離理論段数の飛躍的な向上、分離の超高速化だけでなく、フィルターにかかる圧力負荷を大幅に低減可能である。多孔性膜内での自己組織化により形成させる本提案の垂直型ナノフィルターは、目的対象物に応じてその空孔サイズや表面構造をテーラーメイド化できるため、タンパク質の分離精製だけでなく、上記の社会ニーズに対応した技術シーズの創出が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Biotechnologies for separation and purification of proteins have been attracted in the medical fields. Herein we develop hybrid nanofilters based on molecular-monolayer nanochannels that are vertically aligned in a porous anodic alumina. The separation efficiency of proteins strongly depends on the diameters and the surface functional groups of the molecular-monolayer nanochannels. We also succeeded in construction of hybrid nanofilters, which allow us to accelerate the dissociation and the refolding of protein aggregates.

研究分野：ナノ構造化学

キーワード：自己組織化
脂質分子 単分子膜 ナノチャンネル ナノフィルター タンパク質 分離 リフォールディング

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の生理活性や触媒活性が、医薬品や化粧品分野において大きな注目を集めている。特に免疫に関与するタンパク質を成分とする抗体医薬は、疾患のある特定の細胞や組織に対してピンポイントに働きかけるため、化学合成で製造される低分子医薬品と比較して効能が高く、副作用が少ないなどの利点を有しており、その世界市場は急速に拡大している。抗体を生産するDNA組換え型動物細胞の改質や培養条件の最適化に関するバイオテクノロジーが大きく進展してきた一方、抗体医薬品の品質安全性、及び製造コストに影響するダウンストリーム工程に関する研究は大きく遅れている。抗体分子の分離精製には、抗体分子を特異的に認識して結合するリガンドタンパク質の固定化担体を充填したアフィニティークロマトグラフィーが用いられる。しかしながら、リガンドタンパク質と強く結合した抗体分子をカラムから溶離させるには、強酸・強塩基性条件が必要な場合が多く、これによって引き起こされる抗体分子の変性、凝集形成だけでなく、高価なりガンドタンパク質の変性も懸念されている¹⁾。また、抗体医薬の多品種化に対応すべく、リガンドタンパク質の探索、調製、カラム固定化手法の確立も大きな課題である。

一方、本研究代表者はこれまでに、的確な分子設計を施した合成脂質分子の液相中での自己組織化により形成する分子膜ナノチャンネルの開発を独創的に展開してきた²⁾。その結果、空孔のサイズ制御、膜表面の選択的機能化などを世界に先駆けて達成した。これにより、タンパク質・酵素やDNA等の生体高分子をナノチャンネルに包接・輸送させることにも成功している。膜表面官能基との相互作用を利用し、輸送速度の制御も可能であった。また、空孔内への束縛効果により、包接化タンパク質の熱・化学安定性が著しく増大すること、輸送過程においては、変性タンパク質の正常な立体構造へのリフォールディングが促進されるという注目すべき現象も見出している。

2. 研究の目的

医薬用途の拡大に伴い、タンパク質の効率的な生産プロセスの開発が喫緊の課題となっている。その工程でボトルネックとなっているのが、培養液からの目的タンパク質の分離・精製である。本研究では、タンパク質の高効率分離・高純度精製を目的とし、陽極酸化アルミナ膜空孔内に合成脂質分子から成る分子膜ナノチャンネルを垂直配向・集積化後、ゾルゲル反応により固定化したハイブリッドナノフィルターを開発する（図1）。ナノチャンネルのサイズ効果、膜表面官能基との相互作用を利用した新規分離モードを確立する。また、既存の分離法では除去対象である目的タンパク質の変性体や凝集体に対して、凝集解離・リフォールディング促進・活性再生機能を付与したナノフィルターも創出し、目的タンパク質の高濃度化も目指す。

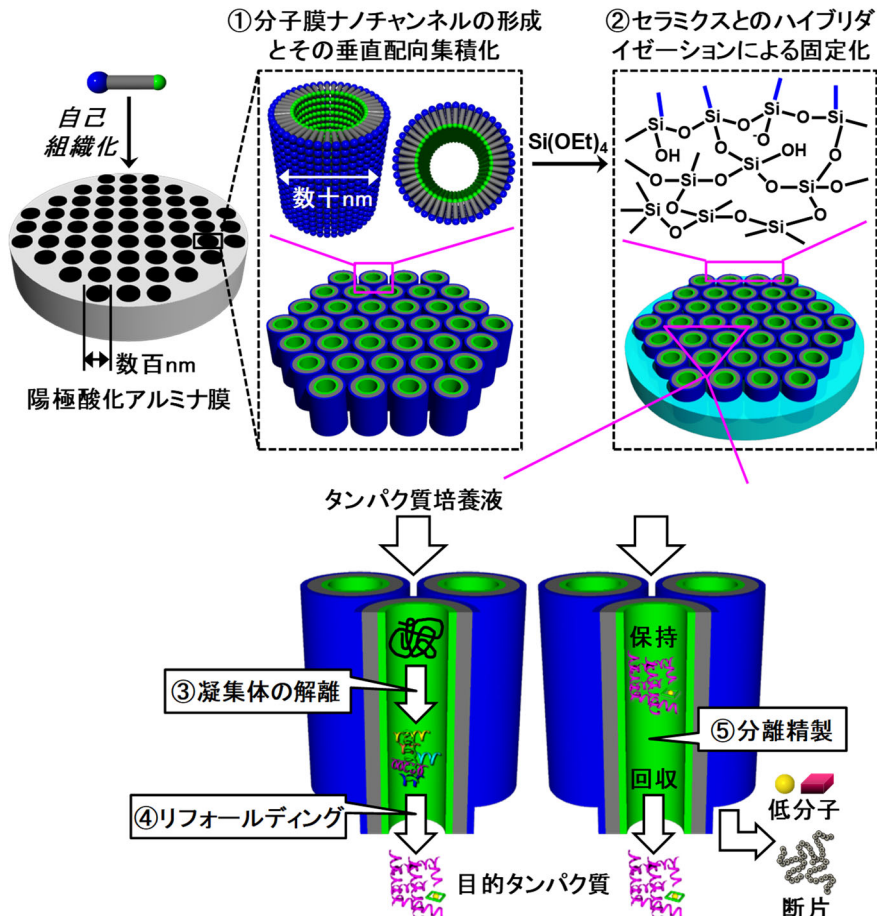


図1 単分子膜ナノチャンネル垂直配向集積化フィルターによるタンパク質の凝集解離・リフォールディング促進とタンパク質の分離精製

3. 研究の方法

(1) タンパク質の凝集解離・リフォールディング促進用フィルターの調製

オリゴメチレン鎖の片端に短鎖ポリエチレングリコール (PEG)、もう一端にアルコキシシリル基を有する脂質分子 1 を設計・合成した (図 2)。1 の分散水溶液に口径 800 nm のポリカーボネイト多孔性膜を浸漬、多孔性膜を取り出した後、加熱・冷却操作により 1 の自己組織化を行った。ゾルゲル反応を施し、単分子膜ナノチャンネル同士、及び多孔成膜への固定化を行った。

(2) タンパク質の分離精製用フィルターの調製

オリゴメチレン鎖の片端に親水性官能基 (ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基など)、もう一端にアルコキシシリル基またはアルコキシシリルアミノ酸残基を有する脂質分子 2(n) と 3(R₁) を設計・合成した (図 2)。多孔性膜内で 2(n) または 3(R) の自己組織化を行った後、ゾルゲル反応を施した。

(3) 孤立分散単分子膜ナノチャンネルにおけるタンパク質の単一分子解析

2(n) または 3(R) の分散水溶液を加熱・冷却することでそれぞれの単分子膜ナノチャンネルの孤立分散水溶液を調製した。その分散水溶液をガラス基板上に滴下し、室温・常圧で乾燥させた。そこに、pH や塩濃度を調製した蛍光タンパク質の水溶液を滴下した後、時間分解蛍光顕微鏡観察及びイメージング蛍光相関分光測定を行った。

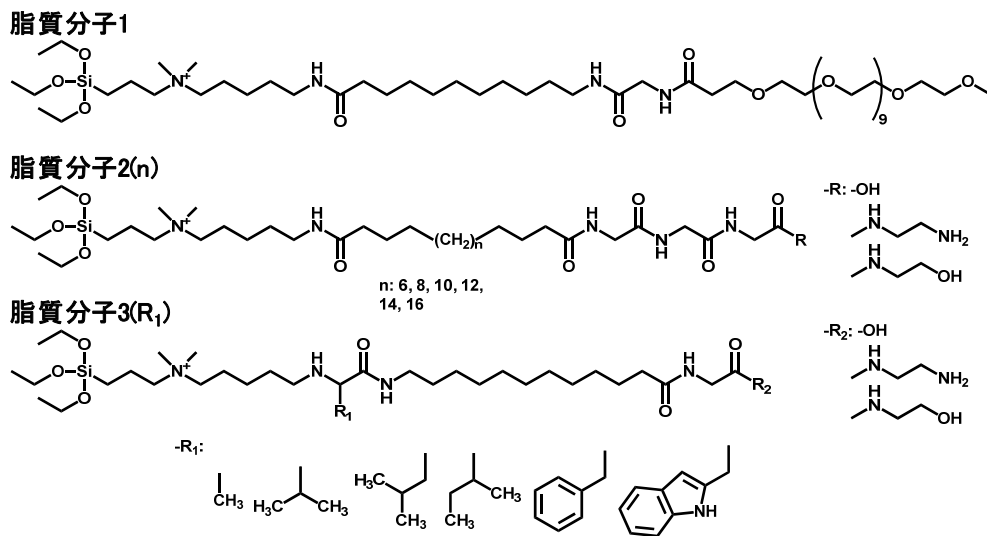


図 2 合成脂質分子の化学構造式

4. 研究成果

(1) タンパク質の凝集解離・リフォールディング促進用フィルターの開発

電子顕微鏡観察により、多孔性膜の空孔内に脂質分子 1 の単分子膜から成る内径約 10 nm のナノチャンネル集積体が形成されていることが分かった。単分子膜ナノチャンネルは、多孔性膜の空孔の長軸方向に沿って配向し、その長さが約 15 μm と多孔成膜の厚さ 15 μm を反映していた。エックス線回折、赤外分光を用いた構造解析により、単分子膜ナノチャンネルの内表面には短鎖 PEG、外表面にはアルコキシシリル基が配置されていることが明らかとなった。

加熱 (50°C)・冷却 (25°C) 操作をしながら当該フィルターにモデルタンパク質としてリゾチーム、炭酸脱水酵素、クエン酸合成酵素などの凝集体を通過させたところ、正常構造となったそれぞれのタンパク質が得られた。分子膜ナノチャンネル内表面の短鎖 PEG の加熱脱水和に基づく疎水化と冷却再水和に基づく親水化といった熱相転移³⁾により、タンパク質凝集体の解離とリフォールディングが誘起されたと考えられる (図 3)。

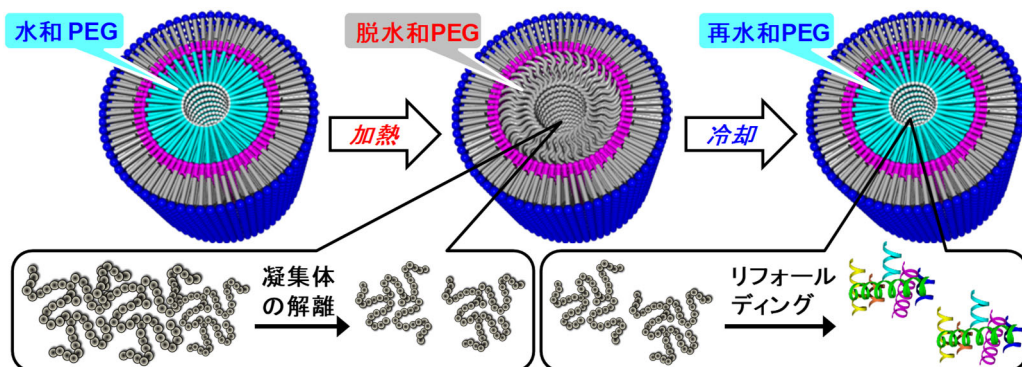


図 3 PEG 修飾単分子膜ナノチャンネルによるタンパク質リフォールディングの促進

(2) タンパク質の分離精製用フィルターの開発

各種分光手法を用いた構造解析により、単分子膜ナノチャンネルの内表面には親水性官能基、外表面にはアルコキシシリル基が配置されていることを確認した。リンタングステン酸で染色した単分子膜ナノチャンネルの電子顕微鏡像より、単分子膜ナノチャンネルの内径を見積もった。2(n)からなる単分子膜ナノチャンネルの内径は、オリゴメチレン鎖の炭素数 (n) の減少に伴い、25 nm (n = 20)、22 nm (n = 18)、17 nm (n = 16)、13 nm (n = 14)、10 nm (n = 12) と減少した。また、3(R₁)からなる単分子膜ナノチャンネルの内径は、アミノ酸側鎖 (R₁) の嵩高さの減少に伴い、45 nm (R₁ = CH₃)、31 nm (R₁ = CH(CH₃)₂)、16 nm (R₁ = Phe)、12 nm (R₁ = Indole)、9 nm (R₁ = CH₂C(CH₃)₂)、5 nm (R₁ = CH(CH₃)CH₂CH₃) と減少した (図4)。脂質分子の構造を変化させることで、単分子膜ナノチャンネルの内径を精密に制御することが可能であった。

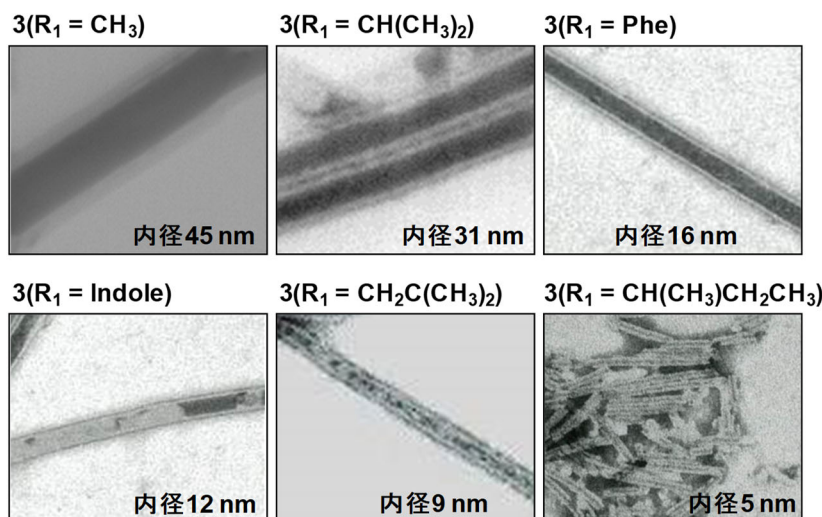


図4 脂質分子 3(R₁)が形成する単分子膜ナノチャンネルの透過型電子顕微鏡像

単分子膜ナノチャンネルにリガンドとしてプロテイン A を化学修飾し、抗体 IgG の結合容量を評価した。結合容量は、リガンドの修飾率が同じ場合、単分子膜ナノチャンネルの径の減少とともに著しく増加した。また、結合容量 (静的) の最大値は、市販品のアフィニティー担体よりも2倍程度高かった。さらに、フィルターを1分間で通過させた時、即ちリガンドと抗体の接触時間を1分とした時の結合容量 (動的) も高性能とされている市販品のアフィニティー担体に匹敵することが明らかとなった。

(3) 孤立分散単分子膜ナノチャンネルにおけるタンパク質泳動拡散の可視化

時間分解蛍光顕微鏡観察、及びイメージング蛍光相関分光測定より、1本の単分子膜ナノチャンネル (内径 16 nm) を泳動拡散する蛍光タンパク質 (サイズ 3~4 nm) の可視化に成功した (図5)。蛍光タンパク質の表面電荷と反対の電荷を示すイオン性官能基を有する単分子膜ナノチャンネルでは、蛍光タンパク質の拡散係数が減少し、両者の間で静電相互作用が生じていることが分かった。静電相互作用による拡散係数の減少は、単分子膜ナノチャンネルの内径が小さいほど顕著であり、タンパク質の分離に関わる重要なファクターであることを突き止めた。

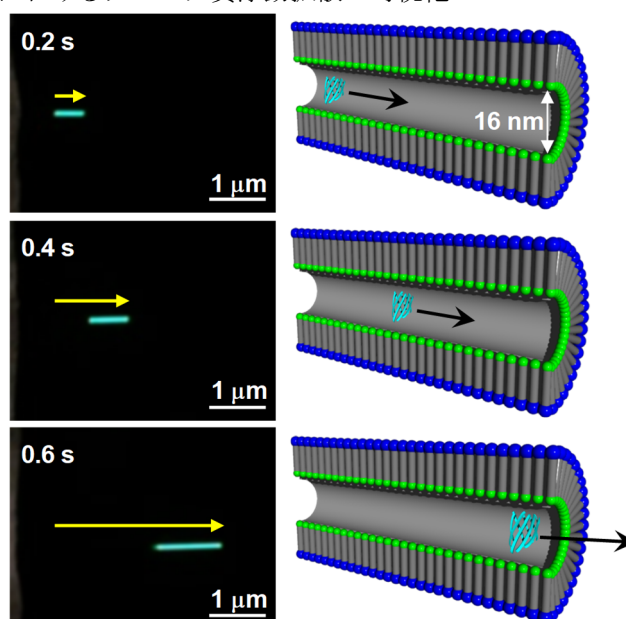


図5 単分子膜ナノチャンネルを泳動拡散する蛍光タンパク質を捉えた時間分解蛍光顕微鏡像

<引用文献>

- ① 山口照英監修, バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発, シーエムシー出版 (2012).
- ② T. Shimizu, N. Kameta, W. Ding, M. Masuda, *Langmuir* **32**, 12242 (2016).
- ③ N. Kameta, T. Matsuzawa, K. Yaoi, M. Masuda, *RSC Adv.* **6**, 36744 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kameta Naohiro, Akiyama Haruhisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Shrinkable Nanotubes for Duplex Formation of Short Nucleotides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 1801967 ~ 1801967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.201801967	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 Kameta Naohiro, Ding Wuxiao	4. 巻 15
2. 論文標題 Supramolecular Nanotube Reactors for Production of Imine Polymers with Controlled Conformation, Size, and Chirality	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 1900682 ~ 1900682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.201900682	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 Kameta Naohiro, Ding Wuxiao	4. 巻 92
2. 論文標題 Direct Joining of a Heterogeneous Pair of Supramolecular Nanotubes and Reaction Control of a Guest Compound by Transportation in The Nanochannels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1053 ~ 1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20190046	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 Kameta Naohiro, Ding Wuxiao, Dong Jiuchao	4. 巻 2
2. 論文標題 Soft Nanotubes Derivatized with Short PEG Chains for Thermally Controllable Extraction and Separation of Peptides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 6143 ~ 6150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.7b00838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kameta Naohiro, Manaka Yuichi, Akiyama Haruhisa, Shimizu Toshimi	4. 巻 2
2. 論文標題 Bioreactors Based on Enzymes Encapsulated in Photoresponsive Transformable Nanotubes and Nanocoils End-Capped with Magnetic Nanoparticles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advanced Biosystems	6. 最初と最後の頁 1700214 ~ 1700214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adbi.201700214	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 Kameta Naohiro, Dong Jiuchao, Yui Hiroharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Thermoresponsive PEG-Coated Nanotubes as Chiral Selectors of Amino Acids and Peptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 1800030 ~ 1800030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.201800030	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 亀田直弘	4. 巻 17
2. 論文標題 ナノチューブゲルの創製とバイオ・グリーン応用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 623 ~ 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Shimizu Toshimi, Ding Wuxiao, Kameta Naohiro	4. 巻 120
2. 論文標題 Soft-Matter Nanotubes: A Platform for Diverse Functions and Applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Reviews	6. 最初と最後の頁 2347 ~ 2407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrev.9b00509	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 亀田直弘	4. 巻 68
2. 論文標題 脂質分子膜ナノチューブの分析化学への応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 683 ~ 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunseki.kagaku.68.683	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 亀田直弘	4. 巻 68
2. 論文標題 脂質単分子膜から創るナノチューブ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 高分子	6. 最初と最後の頁 414 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 亀田直弘、眞中雄一、秋山陽久
2. 発表標題 光刺激形態可変性ナノチューブ・ナノコイル：酵素の包接化及び磁性ナノ粒子でキャッピングしたバイオリクター
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kameta Naohiro, Ding Wuxiao
2. 発表標題 Monolayer-Based Nanotubes with Controllable Diameters
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀田直弘、眞中雄一、秋山陽久
2. 発表標題 光刺激形態可変機能を持つナノチューブ・ナノコイル ～酵素の包接化及び磁性ナノ粒子でキャッピングしたバイオリクター～
3. 学会等名 第16回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀田直弘、秋山陽久
2. 発表標題 酵素固定化担体としての光刺激形態可変性ナノチューブ・ナノコイル
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第38回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀田直弘
2. 発表標題 分析化学への貢献を目指したソフトナノチューブの開発
3. 学会等名 第15回茨城地区分析技術交流会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀田直弘
2. 発表標題 中分子や高分子を安定に貯蔵できるナノカプセルを開発
3. 学会等名 サステナブル技術連携促進シンポジウム「ヘルスケア」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Ghimire Govinda、Espinoza Roberto、Hao Xu、Shinobu Nagasaka、亀田直弘、増田光俊、Daniel Higgins、Takashi Ito
2. 発表標題	Diffusion behavior of charged dye molecules in self-assembled organic nanotubes studied using imaging fluorescence correlation spectroscopy
3. 学会等名	256th National Meeting and Exposition of the American-Chemical-Society (ACS) - Nanoscience, Nanotechnology and Beyond (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	亀田直弘、松沢智彦、矢追克郎
2. 発表標題	短鎖PEG修飾ソフトナノチューブのタンパク質凝集抑制効果
3. 学会等名	第66回高分子討論会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	亀田直弘、松沢智彦、矢追克郎
2. 発表標題	糖脂質から成るナノチューブ・ベシクルの熱相転移を利用したタンパク質凝集体の可溶化とリフォールディング促進
3. 学会等名	第68回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Naohiro Kameta
2. 発表標題	Soft Nanotube Materials for Biological Applications
3. 学会等名	5th Nano Today Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

産業技術総合研究所ナノ材料研究部門
<https://unit.aist.go.jp/nmri/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----