

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02383

研究課題名(和文) タンパク質液-液相分離の低分子コントロール

研究課題名(英文) Control of liquid-liquid phase separation of protein by small additives

研究代表者

白木 賢太郎 (Shiraki, Kentaro)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：90334797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は凝集や液-液相分離の状態を形成しやすい。高濃度タンパク質の溶液状態の安定化のメカニズムを明らかにし、制御する方法の確立を目指した。卵白に由来する異種タンパク質を低イオン強度の溶液中で混合すると液-液相分離した状態になるが、時間とともに成熟が進み共凝集になることがわかった。相分離液滴の安定化にはアルコールやポリイオン複合体が効果的であることがわかったが、これは凝集体の安定化とは性質が異なっていた。一連の研究によって高濃度タンパク質の溶液状態の理解が深められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高濃度のタンパク質の溶液状態の制御は、食品や医薬品の開発のために重要な知見を与える。本研究は集合した状態のタンパク質を低分子で制御する方法の確立を目指した。卵白由来のタンパク質の凝集や液-液相分離の低分子による制御は、食品産業への応用が期待できる。ポリアミノ酸による抗体の安定化は、バイオ医薬品への応用が期待できる。タンパク質の凝集体を選択的に除去するための仕組みとして水性二相溶液が利用できることは、課題となっている目に見えない凝集体除去の方法の開発に役立つだろう。

研究成果の概要(英文)：Proteins are prone to form aggregates and liquid droplets. We aimed to clarify the mechanism of stabilization of the solution state of high-concentration proteins and to establish a method to control the solution states. It was found that when different proteins derived from egg white were mixed in a low ionic strength solution, they formed a liquid-liquid phase separated state, but matured with time to become co-aggregated. Alcohols and polyion complexes were found to be effective in stabilizing the phase-separated droplets, but this was different from the stabilization of aggregates. These studies have enhanced our understanding of the solution states of highly concentrated proteins.

研究分野：タンパク質溶液科学

キーワード：タンパク質 高濃度 凝集 液-液相分離 低分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内には膜のないオルガネラが存在しており、機能に関する研究が最近盛んに報告されている。この液-液相分離して形成された液滴は、温度やイオン強度や代謝産物などで、可逆に形成したり溶解したりする。細胞内は異種分子が含まれており、このような「濃度ムラ」や「濃淡」の理解は、生命を理解するための新しい物理学的なアプローチになると考えられる。

研究代表者はこれまで、タンパク質凝集や液-液相分離の研究を長年続けてきた。そのなかで、濃度ムラのような状態を形成するのは経験的にもわかってきている。例えば、濃縮をするだけで乳白色に変化したり、異種のタンパク質を加えるだけで不均質な溶液状態ができたりする。ここで観察される状態は、凝集と比べてはるかに可逆性が高く、タンパク質の変性も伴わないため、ある種の液-液相分離ではないか、また、これは細胞内から製剤まで通底する高濃度混合タンパク質溶液の普遍的性質ではないか、と考えるようになった。

### 2. 研究の目的

本研究では、高濃度タンパク質の溶液状態の安定化のメカニズムを明らかにし、制御する方法の確立を目指す。タンパク質の高濃度の条件を作り、その条件で生じる乳白色状態のメカニズムと制御法を明らかにする。加熱や振盪などの外部からのストレスに応じてタンパク質が凝集するメカニズムを明らかにし、制御方法を明らかにする。2種類のタンパク質を混合したときの共凝集と相分離の性質を明らかにし、制御方法を確立する。

### 3. 研究の方法

液-液相分離させる材料として、抗体や卵白由来タンパク質、ポリアミノ酸を用いた。これらを混合することで液-液相分離や共凝集の状態を作らせた。ここに第三成分を入れることで可逆性や不可逆性、状態の成熟などを調べた。

### 4. 研究成果

卵白に由来するオボアルブミンとリゾチームを低イオン強度で混合すると白濁がみられる。この白濁はイオン強度を増加させるだけで溶けるため、静電相互作用によって安定化している液-液相分離して形成させた液滴であることが明らかになった (Iwashita 2019)。この状態でしばらく時間がたつとイオン強度を増加させても溶けなくなり、疎水性相互作用が主な安定化因子へと成熟し、共凝集になると考えられる (Iwashita 2019)。

抗体とポリアミノ酸による可逆性の高い液滴の形成をバイオ医薬品の安定化に使う方法を確立してきた。このタンパク質高分子電解質複合体の液滴を、どのようにすれば可逆性を高められるのか、また、高濃度化が可能なのかを調べた (Matsuda 2019)。その結果、可逆性の高い液滴はタンパク質と高分子電解質の等電点の間で形成することがわかった。一方、塩基性 pH になると液滴を形成せず、酸性だと凝集性の高い不可逆な共凝集になることがわかった。可逆性を高めるために第三成分を網羅的に調べた結果、低濃度のアルコールを加えたときに最も可逆性の高

いタンパク質高分子電解質複合体の液滴が形成できることがわかった (Mimura 2019)。

さらに、タンパク質の凝集体を可溶性分子と除去する方法として、水性二相溶液を用いる方法を確立して報告した (Shibata 2019)。高濃度のタンパク質溶液の粘度を下げるために、凝集抑制剤として開発してきたヒダントインが利用できることがわかった (Nishinami 2019)。

これらの一連の成果によって、高濃度のタンパク質に生じる液-液相分離や、複数種類のタンパク質が含まれたときの凝集のメカニズムが低分子の添加剤によって理解でき、制御できることが明らかになってきた (Shiraki 2020)。タンパク質の溶液状態での振る舞いを調べるアプローチとして低分子の添加剤が有効であることが、本研究課題の成果から示された (図 1)。タンパク質の集合体である液-液相分離や凝集は内部構造を調べるのが困難だが、主にどのような相互作用が働くことで安定化されているのかを低分子で調べる方法になると考えられる。



<p>主な安定化因子</p>	 <p>静電相互作用 カチオン-<math>\pi</math>相互作用 広がった構造</p>	 <p>疎水性相互作用</p>
<p>安定化</p>	<p>アルコール クラウダー ポリイオン複合体形成 TMAO</p>	<p>クラウダー 糖質 コスモトローブ</p>
<p>不安定化</p>	<p>ヘキサジオール 糖質 オスモライト 低濃度のイオン</p>	<p>アルギニン 変性剤 界面活性剤 カオトローブ</p>

図 1: タンパク質の液-液相分離および凝集の状態に影響をおよぼす低分子添加剤 (白木賢太郎. 生物工学 98, 5, (2020) )

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata Chika, Iwashita Kazuki, Shiraki Kentaro	4. 巻 133
2. 論文標題 Salt-containing aqueous two-phase system shows predictable partition of proteins with surface amino acids residues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 1182 ~ 1186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.185	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 Shibata Chika, Iwashita Kazuki, Shiraki Kentaro	4. 巻 161
2. 論文標題 Selective separation method of aggregates from IgG solution by aqueous two-phase system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 57 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2019.05.002	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 Iwashita Kazuki, Handa Akihiro, Shiraki Kentaro	4. 巻 120
2. 論文標題 Coacervates and coaggregates: Liquid?liquid and liquid?solid phase transitions by native and unfolded protein complexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 10 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.063	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 Matsuda Ayumi, Mimura Masahiro, Maruyama Takuya, Kurinomaru Takaaki, Shiuhei Mieda, Shiraki Kentaro	4. 巻 107
2. 論文標題 Liquid Droplet of Protein-Polyelectrolyte Complex for High-Concentration Formulations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 2713 ~ 2719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2018.06.021	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 Iwashita Kazuki、Mimura Masahiro、Shiraki Kentaro	4. 巻 19
2. 論文標題 Control of Aggregation, Coaggregation, and Liquid Droplet of Proteins Using Small Additives	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Biotechnology	6. 最初と最後の頁 946 ~ 955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389201020666181204113054	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 Mimura Masahiro、Tsumura Keisuke、Matsuda Ayumi、Akatsuka Naoki、Shiraki Kentaro	4. 巻 150
2. 論文標題 Effect of additives on liquid droplet of protein?polyelectrolyte complex for high-concentration formulations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 064903 ~ 064903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5063378	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 Nonaka Takahiro、Tsurui Noriko、Mannen Teruhisa、Kikuchi Yoshimi、Shiraki Kentaro	4. 巻 155
2. 論文標題 Non-chromatographic purification of Teriparatide with a pH-responsive CspB tag	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 66 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2018.11.008	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 Shiraki Kentaro、Mimura Masahiro、Nishinami Suguru、Ura Tomoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of additives on liquid droplets and aggregates of proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 587 ~ 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00682-9	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 Hong Taehun, Iwashita Kazuki, Han Jeungmin, Nishinami Suguru, Handa Akihiro, Shiraki Kentaro	4. 巻 146
2. 論文標題 Aggregation of hen egg white proteins with additives during agitation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 LWT	6. 最初と最後の頁 111378 ~ 111378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lwt.2021.111378	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三村真大、津村圭亮、栗田僚二、白木賢太郎
2. 発表標題 液-液相分離によるIgGの濃縮法
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会大会 第71回細胞生物物理学学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suguru Nishinami, Yumiko Ohhashi, Kentaro Shiraki
2. 発表標題 Liquid-liquid phase separation and fibrillization of yeast prion Sup35 NM domain
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会大会 第71回細胞生物物理学学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦朋人、白木賢太郎
2. 発表標題 体膜のない細胞内小器官を模倣した PLL/ATP 液滴の研究
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会大会 第71回細胞生物物理学学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suguru Nishinami, Yumiko Ohhashi, Kentaro Shiraki
2. 発表標題 Effects of co-solutes on liquid-liquid phase separation and fibrillization of yeast prion Sup3
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of The Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白木賢太郎
2. 発表標題 相分離生物学
3. 学会等名 第1回LLPS研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白木賢太郎
2. 発表標題 タンパク質の凝集・共凝集・相分離のメカニズムと産業応用
3. 学会等名 第80回酵素工学研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 白木 賢太郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 176
3. 書名 相分離生物学	

1. 著者名 白木 賢太郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 400
3. 書名 相分離生物学の全貌 (現代化学増刊46)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	富田 峻介  (Tomita Shunsuke)  (50726817)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員   (82626)	
研究分担者	加納 英明  (Kano Hideaki)  (70334240)	九州大学・大学院理学研究院・教授   (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------