

令和元年6月7日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03826

研究課題名(和文) 超分子ヒドロゲルを用いた生体高分子の電気泳動

研究課題名(英文) Electrophoresis of Biopolymer using Supramolecular Hydrogel

研究代表者

山中 正道 (Yamanaka, Masamichi)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：10377715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質や核酸類などの生体高分子の新規な分離分析法として、低分子ヒドロゲル化剤の自己集合により形成する超分子ヒドロゲルを支持体とする電気泳動技術の開発を行った。変性タンパク質の電気泳動では、イオン性界面活性剤の濃度により分離様式が変化することを明らかにした。DNA断片の電気泳動においては、超分子ヒドロゲルを支持体とすることで、通常ではパルスフィールド電気泳動法でなければ分離が困難なサイズのDNA試料を、ごく一般的なサブマリン型電気泳動装置で分離することに成功した。また、新たな支持体として機能することが期待される、新規な低分子ヒドロゲル化剤の開発も達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質や核酸類などの生体高分子の電気泳動による分離分析は、生命科学における極めて重要な実験手法である。アフィニティー電気泳動や二次元電気泳動など様々な操作方法が開発されてきた一方で、電気泳動に用いられる支持体はポリアクリルアミドとアガロースに限定されていた。電気泳動における新規な支持体の開発は、電気泳動技術の飛躍的な発展を可能にすると着想し、高い柔軟性と設計性を有する超分子ヒドロゲルに着目し、研究を行った。その結果、既存の高分子ゲルを支持体とした電気泳動とは、異なる特性を示す電気泳動を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed electrophoresis technique using supramolecular hydrogels, which formed by self-assembly of low molecular weight hydrogelator, as a novel separation and analysis method for biopolymers such as proteins and nucleic acids. In the electrophoresis of the denatured proteins, it was revealed that the separation manners were changed by the concentration of the ionic surfactant. Large DNA samples, which generally need pulse field gel electrophoresis to separate, could be separated by a common submarine electrophoresis apparatus by using a supramolecular hydrogel as a matrix. We also achieved the development of new low molecular weight hydrogelator, which are expected to function as a new matrix of electrophoresis for biopolymers.

研究分野：超分子化学

キーワード：電気泳動 ゲル 超分子 自己集合 タンパク質 DNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質や核酸など生体高分子のゲル電気泳動は、生命科学の研究における不可欠な技術として広く用いられている。アフィニティー電気泳動や二次元電気泳動など、様々なゲル電気泳動技術が開発される一方で、その支持体となるゲルは、アガロースとポリアクリルアミドに限定されてきた。低分子ヒドロゲル化剤の自己集合により形成する超分子ヒドロゲルは、高い柔軟性と設計性を有する。超分子ヒドロゲルを電気泳動の支持体としての適用は、生命科学に新たな研究手法を提供することとなる。研究代表者らは、2011年に超分子ヒドロゲルを支持体とする変性タンパク質の電気泳動について報告し、自己集合で形成する超分子材料が電気泳動の支持体として適用可能であることを明らかにした。その後、未変性のタンパク質試料であっても、超分子ヒドロゲルを支持体とする電気泳動により分離できることを報告した。

### 2. 研究の目的

本研究では、こうした背景のもと、超分子ヒドロゲルを支持体とした生体高分子の電気泳動法を、より実践的な分離分析技術として確立することを目的とする。具体的には、変性タンパク質の電気泳動におけるイオン性界面活性剤の濃度効果について検討した。また、通常ではパルスフィールドゲル電気泳動法による分離が必要となる、大きな DNA 断片の超分子ヒドロゲルによる電気泳動も検討した。一方で、電気泳動により適した支持体となる超分子ヒドロゲルの開発も検討した。超分子ヒドロゲルの物理的強度の弱さを、根本的に解決する方法として、ゲル化剤の二量体を合成し、化学架橋点として機能させることを試みた。また、市販の化合物より短段階で効率的に合成できる低分子ヒドロゲル化剤の開発も実施した。

### 3. 研究の方法

変性タンパク質の電気泳動におけるイオン性界面活性剤の濃度効果、大きな DNA 断片の電気泳動については、我々がこれまでに開発した両親媒性三回対称トリスウレア化合物の自己集合で形成する超分子ヒドロゲルを用いる。変性タンパク質の電気泳動では、分子サイズの異なるタンパク質試料を組み合わせ、種々のイオン性界面活性剤濃度における分離様式を評価する。DNA 断片の電気泳動においては、複数の DNA 断片を含む DNA マーカーをサンプルとして用いる。新規超分子ヒドロゲルの開発においては、これまでの超分子ゲルの研究において蓄積した知見に基づき、可能な限り論理的な分子設計を行い、効率的な低分子ヒドロゲル化剤の探索を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 変性タンパク質の電気泳動におけるイオン性界面活性剤の濃度効果

我々は、両親媒性三回対称トリスウレア化合物 (1) が、イオン性界面活性剤の存在下で超分子ヒドロゲルを形成することを見出した (図 1)。この超分子ヒドロゲルは、変性タンパク質試料の電気泳動における支持体として適用することができた。イオン性界面活性剤である SDS の濃度が 3.5 mM のとき、45 kDa を境界に、分子量の大きなタンパク質ほど陽極側への移動度が大きくなる分離様式が観測された。こうした特異な分離様式は、電気泳動に見られる分子ふるい効果と、ゲル濾過に見られる分子ふるい効果という二種類の分子ふるい効果に起因する。電気泳動に見られる分子ふるい効果では、分子量の大きな分子ほど支持体に遮られ移動しにくくなる。一方でゲル濾過に見られる分子ふるい効果では、分子量の小さな分子ほど支持体の細孔に拡散するため移動しにくくなる。分子量が 45 kDa よりも大きな分子量のタンパク質では、「電気泳動に見られる分子ふるい効果」が支配的な分離様式として機能し、分子量が 45 kDa よりも小さな分子量のタンパク質では「ゲル濾過に見られる分子ふるい効果」が支配的な分離様式として機能する。また、両親媒性三回対称トリスウレア化合物 (1) より形成する超分子ヒドロゲルは、イオン性界面活性剤の濃度により繊維状集合体の太さが変化することを見出していた。こうした結果より、SDS 濃度を変化させたとき、支配的な分離様式の切り替わる境界を調節できると考えた。

SDS 濃度を減じた溶液 (トリス: 25 mM; グリシン: 195 mM; SDS: 1.0 mM) より調製した超分子ヒドロゲルを用い電気泳動を行ったところ、SDS 濃度 3.5 mM では 45 kDa であった支配的な分離様式の境界が、66 kDa に変化した。具体的には、牛血清アルブミン (66 kDa) とオボアルブミン (45 kDa) の混合物の電気泳動を行ったところ、SDS 濃度 3.5 mM では分子量の小さなオボアルブミンがより陽極側に移動したのに対し、SDS 濃度 1.0 mM では分子量の大きな牛血清アルブミンがより陽極側に移動した (図 2A, 2B)。一方、SDS 濃度の高い溶液 (トリス: 25 mM; グリシン: 195 mM; SDS: 7.0 mM) より調製した超分子ヒドロゲルを用い電

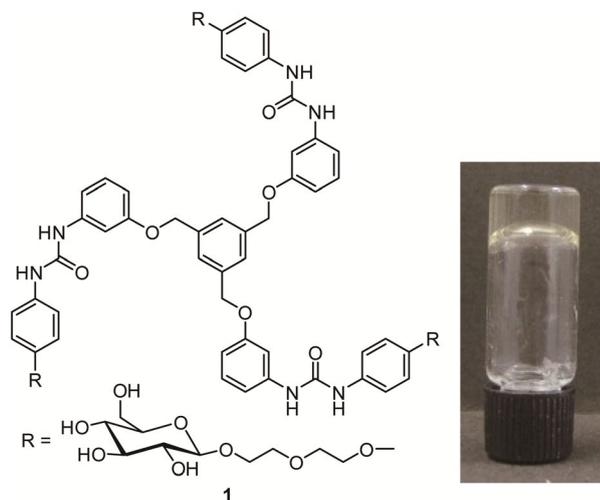


図 1 両親媒性三回対称トリスウレア化合物

#### (1) の構造と超分子ヒドロゲル

電気泳動を行ったところ、支配的な分離様式の境界は 14 kDa に変化した。炭酸脱水素酵素 (29 kDa) とリゾチーム (14 kDa) の混合物の電気泳動においても、分離は電気泳動に見られる分子ふるい効果が支配的で、分子量の小さなリゾチームが、より陽極側に検出された (図 2 C)。ところが、リゾチーム (14 kDa) とアプロチニン (6.5 kDa) の混合物の電気泳動では、ゲル濾過に見られる分子ふるい効果が支配的となり、分子量の大きなリゾチームが、より陽極側に検出された。このように、**1** より形成する超分子ヒドロゲルを用いた電気泳動では、SDS 濃度により分離様式が制御できた。

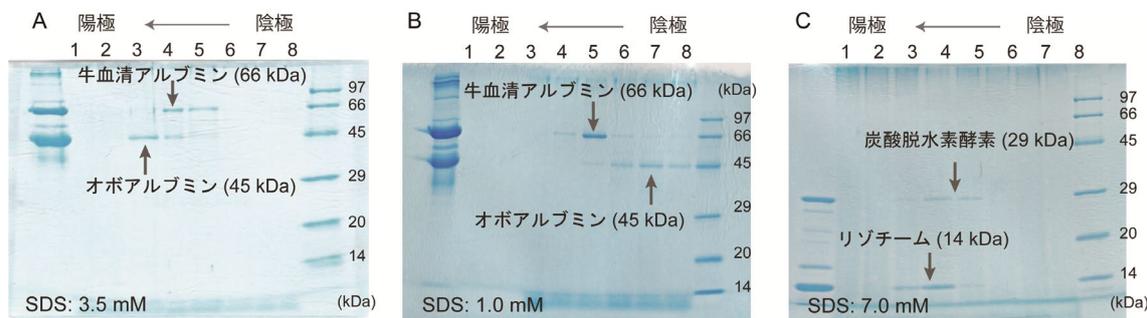


図 2 超分子ヒドロゲルを支持体とする変性タンパク質の電気泳動における SDS 濃度の効果

(2) 超分子ヒドロゲルを支持体とした DNA 断片の電気泳動

超分子ヒドロゲルを用いた未変性タンパク質の電気泳動の検討において、両親媒性三回対称トリスウレア化合物 (**2**) より形成される超分子ヒドロゲルが、タンパク質を分子量に依存せず等電点で分離することを見出した。この結果は、**2** より形成する超分子ヒドロゲルの細孔サイズが大きいことを示唆しており、大きなサイズの DNA 断片の電気泳動に有効であると着想した。両親媒性三回対称トリスウレア化合物 (**2**) とトリス-ホウ酸-EDTA 溶液 (トリス : 45 mM; ホウ酸 : 45 mM; EDTA : 1.0 mM) より形成する超分子ヒドロゲルを用い、大きな DNA 断片の電気泳動を検討した。DNA サンプルには、 $\lambda$ -Hind III digest (2~23 kbp)、 $\lambda$  DNA-Mono Cut Mix (10~49 kbp)、Marker 7 GT (10~165 kbp) という 3 種類の DNA マーカーを用いた。

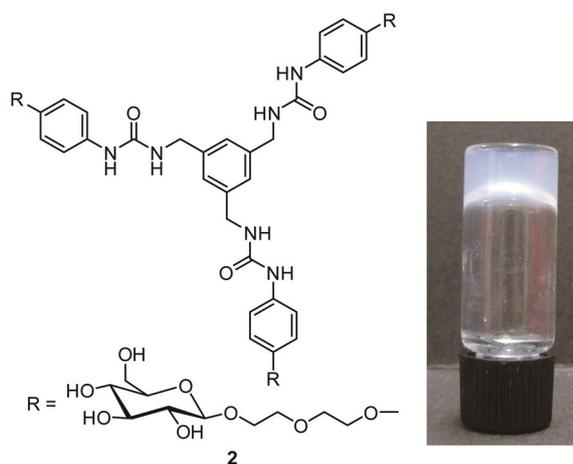


図 3 両親媒性三回対称トリスウレア化合物 (**2**) の構造と超分子ヒドロゲル

まず、 $\lambda$ -Hind III digest (2.0、2.3、4.4、6.6、9.4、23.1 kbp の DNA 断片を含む) の分離を検討した。DNA 断片はその長さによって分離され、短い断片は長い断片より大きな移動度を示した (図 4 A)。陽極側から、レーン 2 に 2.0 kbp の DNA 断片、レーン 3 に 2.3 kbp の DNA 断片、レーン 4 に 4.4 kbp の DNA 断片、レーン 5 に 6.6 kbp の DNA 断片が見いだされた。レーン 6 には、9.4 および 23.1 kbp の DNA 断片が検出され、レーン 7 には 23.1 kbp の DNA 断片に対応する薄いバンドが検出された。この条件において、六つの DNA 断片はきれいに分離された。特筆すべき点として、類似の長さを有する 2.0 および 2.3 kbp の DNA 断片が完全に分離できた。続いて  $\lambda$  DNA-Mono Cut Mix (10.1、15.0、17.1、24.0、24.5、30.0、33.5、38.4、48.5 kbp の DNA 断片を含む) の分離を検討した (図 4 B)。10.1 kbp の DNA 断片は、主にレーン 4 に検出された。15.0 kbp の DNA 断片は主にレーン 7 に、17.1 kbp の DNA 断片は主にレーン 8 に検出され、

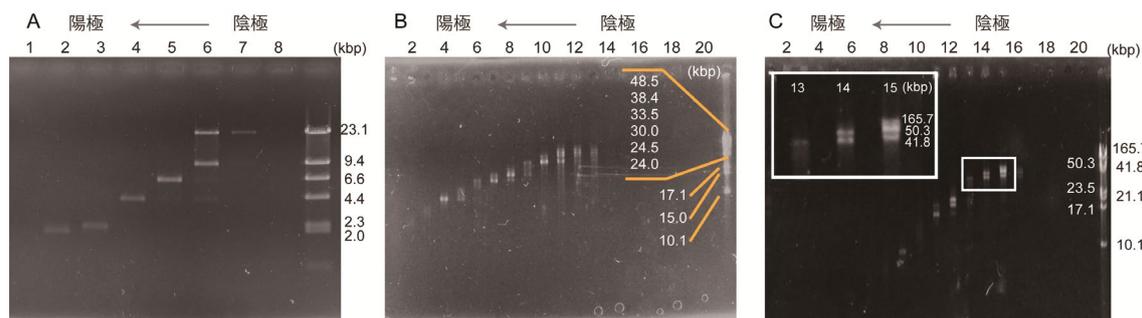


図 4 超分子ヒドロゲルを支持体とする DNA 断片の電気泳動

明確な分離が確認できた。24.0～48.5 kbp の DNA 断片はレーン 10～13 に検出された。これらの DNA 断片が分離されていることは明白であったが、アガロース H ゲル電気泳動の分解能の問題より、それぞれの断片の同定には至らなかった。より大きな DNA 断片を含む Marker 7 GT (10.1、17.7、21.1、23.5、41.8、50.3、165.7 kbp の DNA 断片を含む) の分離を検討した (図 4 C)。10.1、17.7 kbp の DNA 断片は、レーン 9、レーン 11 のみにそれぞれ検出された。レーン 12 には、21.1 および 23.5 kbp の DNA 断片が検出された。レーン 13～15 には 41.8 kbp 以上の大きな DNA 断片が検出された。この三つのレーンに含まれる DNA 断片を解析すると、41.8 kbp の DNA 断片はレーン 13～15 に、50.3 kbp の DNA 断片はレーン 14～15 に、165.7 kbp の DNA 断片はレーン 15 にのみ含まれていた。超分子ヒドロゲルを支持体としたとき、100 kbp を超えるサイズの巨大 DNA 断片を、サブマリン型電気泳動装置のような典型的な連続場電気泳動装置で分離できた。

### (3) ゲル化剤の二量体の添加による超分子ゲルの高強度化

低分子ゲル化剤の自己集合により形成する超分子ゲルは、刺激応答性などその柔軟性に基づく多様な機能を発現する一方で、その強度の低さは、材料応用を考慮したとき解決すべき課題である。我々は、超分子ゲルに化学架橋点を導入することで、超分子ゲルを高強度化できると着想した。低分子ゲル化剤を適切なリンカーで連結した二量体は、超分子ゲルの繊維状集合体間を連結する化学架橋点として機能することが期待できる。そこで、低分子ヒドロゲル化剤として機能する両親媒性三回対称トリスウレア化合物 (3) を基本構造に、側鎖の一つをオクタエチレングリコールにて連結した二量体 (4) を設計、合成した。両親媒性三回対称トリスウレア化合物 (3) と二量体 (4) の混合物は超分子ヒドロゲルを形成した (図 5)。さらに、その強度と安定性は、3 のみより調製した超分子ヒドロゲルよりも向上した。二量体 (4) の添加量に関して詳細に検討した結果、3:4 が 95:5 のときに最も高強度な超分子ヒドロゲルが得られることが明らかとなった。

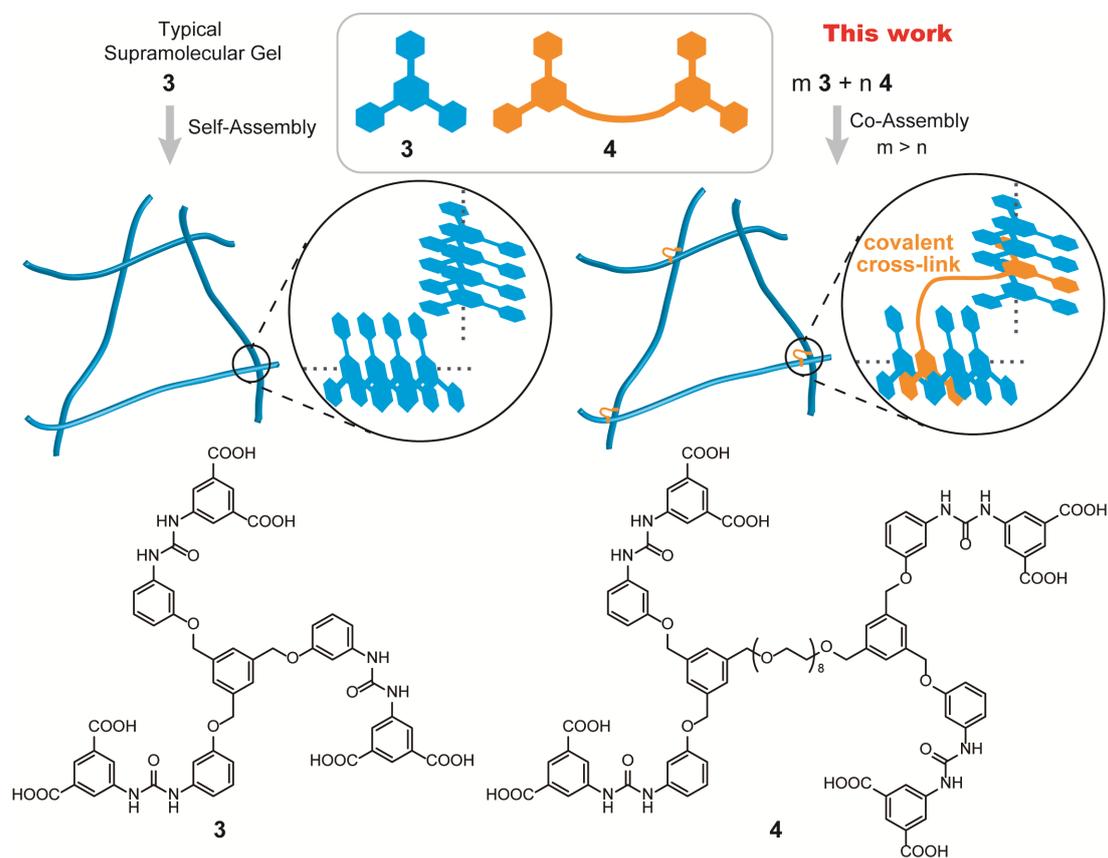


図5 低分子ヒドロゲル化剤の二量体の添加による超分子ヒドロゲルの高強度化

### (4) 短工程で合成可能な低分子ヒドロゲル化剤の開発

超分子ヒドロゲルを支持体とする生体高分子の電気泳動を、汎用な技術として確立するためには、大量合成可能な低分子ヒドロゲル化剤を開発する必要がある。しかしながら、両親媒性三回対称トリスウレア化合物は、その合成に多段階を要するため、大量合成法の確立は困難である。そこで、市販の化合物より短工程で効率的に合成できる、低分子ヒドロゲル化剤の開発を検討した。これまでの知見に基づき、糖を親水基とする両親媒性ウレア化合物が、低分子ヒドロゲル化剤に適した構造であると考えた。また、短工程での合成を実現するために、糖は無保護のままアミノグリコシル化反応により導入することを計画した。

親水基に二糖であるラクトースを有し、疎水部のアルキル基としてシクロヘキシル基を有する両親媒性ウレア化合物 (**5**) は、低分子ヒドロゲル化剤として機能し、最少ゲル化濃度 0.3 wt% で超分子ヒドロゲルを形成した (図 6)。両親媒性ウレア化合物 (**5**) は、市販の化合物から二段階で合成することができた。さらに、形成した超分子ヒドロゲルは酵素応答性を有し、ラクトースの加水分解酵素である  $\beta$ -ガラクトシダーゼを添加したところ、二糖部位の加水分解が進行し、それに伴うゲルから溶液への相転移が観測された。

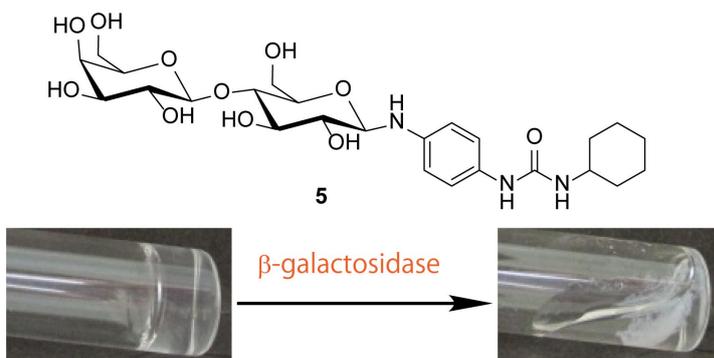


図 6 両親媒性ウレア化合物 (**5**) の構造と超分子ヒドロゲルの酵素に応答した相転移

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Masamichi Yamanaka, Supramolecular gel electrophoresis, *Polymer J.*, 査読有, **50**, 627–635 (2018). DOI 10.1038/s41428-018-0033-y
  - ② Shuto Akama, Takumi Maki, Masamichi Yamanaka, Enzymatic hydrolysis-induced degradation of a lactose-coupled supramolecular hydrogel, *Chem. Commun.*, 査読有, **54**, 8814–8817 (2018). DOI 10.1039/C8CC04727H
  - ③ Hiroki Sawada, Masamichi Yamanaka, Synthesis of a bis-urea dimer and its effects on the physical properties of an amphiphilic tris-urea supramolecular hydrogel, *Chem. Asian J.*, 査読有, **13**, 929–933 (2018). DOI 10.1002/asia.201800217
  - ④ Shohei Tazawa, Kazuhiro Kobayashi, Takanori Oyoshi, Masamichi Yamanaka, Supramolecular gel electrophoresis of large DNA fragments, *Electrophoresis*, 査読有, **38**, 2662–2665 (2017). DOI 10.1002/elps.201700223
  - ⑤ Shohei Tazawa, Kazuhiro Kobayashi, Masamichi Yamanaka, Effect of sodium dodecyl sulfate concentration on supramolecular gel electrophoresis, *ChemNanoMat*, 査読有, **2**, 423–425 (2016). DOI 10.1002/cnma.201600003
- (他 7 件)

[学会発表] (計 39 件)

- ① Masamichi Yamanaka, Lactose-coupled supramolecular hydrogel responsive to enzymatic reaction, The 10th Singapore International Chemistry Conference (SICC-10), National University of Singapore, (Singapore) (2018 年 12 月 17 日)
  - ② Masamichi Yamanaka, Enzymatic reaction of a lactose-coupled supramolecular hydrogel, The 3rd International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN 2018), Newcastle Exhibition & Conference Centre (Australia) (2018 年 11 月 2 日)
  - ③ 山中 正道, 超分子ヒドロゲルを用いた生体高分子の電気泳動、第 69 回日本電気泳動学会総会、北里大学 (神奈川) (2018 年 8 月 8 日)
  - ④ Masamichi Yamanaka, Synthesis and property of hexakis-urea, 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC 2018), Sendai International Center (Miyagi) (2018 年 7 月 31 日)
  - ⑤ 山中 正道, 三回対称分子を用いた超分子集合体の創出、日本薬学会東海支部特別講演会、静岡県立大学 (静岡) (2017 年 11 月 17 日)
- (他 34 件)

[図書] (計 5 件)

- ① 山中 正道 他、(株)エヌ・ティー・エス、刺激応答性高分子ハンドブック、132–138 (2018).
- ② 山中 正道 他、(株)技術情報協会、ゲル化・増粘剤、670–678 (2018).
- ③ 山中 正道 他、シーエムシー出版、低分子ゲルの開発と応用、181–188 (2016).
- ④ 山中 正道 他、静岡学術出版、ナノバイオ・テクノロジー、251–267 (2016).
- ⑤ 山中 正道 他、フロンティア出版、自己組織化マテリアルのフロンティア、205–212 (2015).

[その他]

ホームページ等

<https://www.shizuoka.ac.jp/yamanaka/>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。