

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18550020

研究課題名 (和文) インスリン水溶液における液液相分離曲線と液滴
および結晶のゼータ電位の決定研究課題名 (英文) Determination of the liquid-liquid phase separation and
the zeta potentials of liquid droplets and crystals in
the insulin aqueous solutions

研究代表者

和泉 研二 (WAIZUMI KENJI)

山口大学・教育学部・教授

研究者番号：70260677

研究成果の概要：

タンパク質の機能を理解するには、タンパク質分子の精密な3次元構造を知ることが重要である。そのためには良質の単結晶を必要とするが、多くのタンパク質では良質な単結晶が得られず、研究遂行上のボトルネックとなっている。本研究では、タンパク質結晶の良質な単結晶を得るための研究の一貫として、インスリンの結晶形態制御および濃厚な液滴を経由して結晶が形成される現象についての基礎研究を行い、これまで報告されていなかった幾つかの新たな知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 2,400,000 | 0 | 2,400,000 |
| 2007年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2008年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 420,000 | 4,220,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：タンパク質、結晶成長、インスリン、相分離、ゼータ電位

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的な背景： 生体内での蛋白質の機能を理解するには、蛋白質分子の精密な3次元構造を知ることが本質的に非常に重要である。そのためには良質の単結晶が必要であるが、多くのタンパク質で単結晶育成に行き詰まり、単結晶を得ることが研究遂行上のボトルネックとなっており、タンパク質結晶成長機構の解明や結晶育成の主導原理の出現が期待されている。

(2) 核形成の制御に対するトピックス： 近年 Ten Word¹⁾や Haas ら²⁾ は、マクロ分子の分子

間相互作用は分子自身の大きさと比較すると近距離にしか働いていないと見なすことができ、そのようなマクロ分子の溶液は、二相分離 (液液相分離) を起して不混和状態となりやすいことを理論的に示した。彼らは、タンパク質溶液が液液相分離を起こすとタンパク質濃度の高い液滴相が溶液中で形成され、その液滴中で均一核形成が速度論的に素早く開始されること、すなわち “Two Step Nucleation Model” と呼ばれる液滴経由のタンパク質結晶核生成機構 (図1) を提唱し、液滴をうまく利用すれば、溶液全体

の過飽和度をあげることなくタンパク質の結晶核形成速度を大きくできることを理論計算によって示した。結晶核形成の駆動力は過飽和度によって決まるので、低過飽和度の溶液中での核形成速度は小さくなるが、成長する結晶は良質となる。従って彼らは、液滴の利用により、溶液全体として低過飽和度の溶液中で核形成速度のみを大きくし、効率的に良質の単結晶を育成できると主張した。そのため、申請時において、液液相分離経由の結晶育成は、タンパク質結晶成長の分野で大いに注目されていた³⁾。

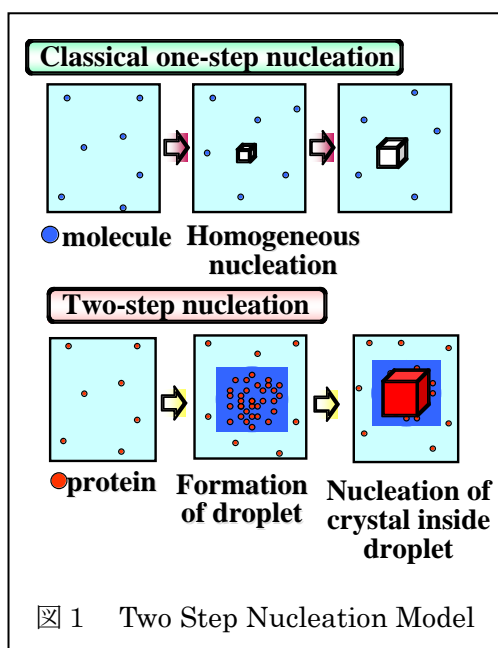


図1 Two Step Nucleation Model

(3) 申請者の研究の進行状況： 申請者は、重要な生体ホルモンの一つであるインスリンをモデル蛋白質として用いて、その成長機構に関する研究を行ってきた。そして、前回の基盤研究において、インスリン水溶液での液液相分離現象をはじめ確認した。発見した重要な現象は、1) 液液相分離（液滴の形成）は非晶質凝集体の析出後に起こること、2) その後、インスリン結晶は、Two Step Nucleation Model で考えられた液滴の内部での均一核形成ではなく、ること（図2）、3) 液滴から出発した結晶は特

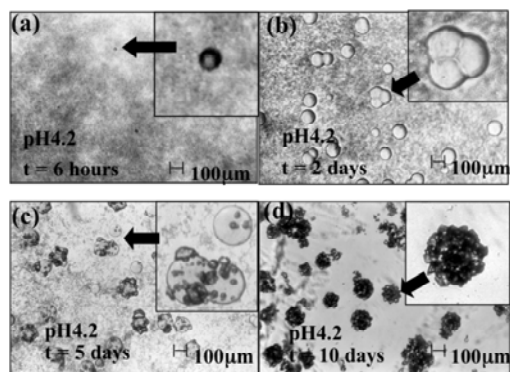


図2 液滴を経由したインスリン結晶の生成

異的な集合形態を呈すること、4) 液滴の形成は比較的狭い酸性の pH 領域に限られることなどである。タンパク質結晶成長の分野で注目されている液液相分離および液滴経由の結晶核形成を、重要な生体ホルモンであり薬として重要なインスリンでこれらの現象を捉えたことは、速報誌への掲載⁴⁾ や国際シンポジウムへの招待(2005.9)⁵⁾ などからも言えるように、注目される成果となっていた。

- 1) P. R. ten Wolde and D. Frenkel, *Science*, **277**, 1975 (1997).
- 2) C. Haas, J. Drenth, *J. Crystal Growth*, **196**, 388 (1999).
- 3) V. J. Anderson, H. N. W. Lekkerkerker, *Nature*, **416**, 811 (2002) ; P. G. Vekilov, *J. Crystal Growth*, **275**, 65 (2005).
- 4) K. Waizumi, T. Eguchi, *Chem. Lett.*, in press.
- 5) K. Waizumi, Interface Minegology (International Symposium, Sendai, 2005, invite).

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究課題では、タンパク質結晶成長の分野で大いに注目されている液液相分離および液滴経由の結晶核形成の現象について、インスリンでの理解を深めること目的とし、結晶および液滴のゼータ電位の決定、および液液相分離曲線の決定を目指した。しかし、液液相分離曲線の決定は、精度の問題をクリアできていないため、以下はゼータ電位についてのみ述べる。

3. 研究の方法

(1) ゼータ電位の決定法

溶液中で帯電している粒子に電場をかけると、粒子はその表面電位の符号と反対方向に移動する。ゼータ電位は、このときの泳動速度、電場の強さ、粘度や誘電率などの流体力学的な効果を考慮して計算される電位で、電気二重層の固定層と拡散層の境界（Stern面）より少し外側にあるスベリ面での電位である。一般に溶液中の帯電粒子の表面電位を測定することは難しく、代わりに、表面電位に関する情報として電気泳動実験から求められるゼータ電位で議論することが多い。

ゼータ電位の測定にはいくつかの方法がある。ここでは液滴および微結晶ともに顕微鏡下で確認できるので、最も視覚的にわかりやすい顕微鏡電気泳動法で行った。顕微鏡電気泳動実験では、目視により粒子の電気泳動速度 (v) を求める。また、セルの断面積 (A)、溶媒の電気伝導度 (σ)、そのときの電流値 (I) から電場 (E ; $E = I/A\sigma$) を求め、次式により電気泳動移動度 (U) を決定する。

$$U = v/E \quad \text{————— (1)}$$

ゼータ電位は、電気泳動移動度とSmoluchowskiの式

$$\zeta = \eta U / \epsilon \epsilon_0 \quad (2)$$

で関係づけられる。ここで、 η は溶液の粘性率、 U は電気移動度、 ϵ と ϵ_0 は溶媒と真空の比誘電率。

溶媒の電気伝導度および泳動実験中の電流値は、それぞれ伝導度計とデジタル電流計で測定した。溶液粘性の測定は、毛管粘度計（ペローデ型動粘度計）およびマイクロ粘度計（AntonPaar, AMVn）で行なった。

実験に必要な顕微鏡や顕微鏡用ビデオ撮影装置は研究所有の装置を用い、ゼータ電位の校正（装置定数の決定）は、ゼータ電位が既知のシリカゲルを用いて行なった。

電気泳動実験では、電荷を帯びたセル壁面からの影響を受けて、溶液自体に流れを生じる（電気浸透流）。荷電粒子の電気泳動速度を正しく測定するためには、電気浸透流の効果を加味しなければならないが、今回はいくつかの測定点の移動度をもとにして、角形セルに対して用いられる森・森本の下式を適応し、電気浸透流がゼロである位置（静止面）の位置を求めて真の移動度を決定した。

$$U_{obs} = AU_0(z/b)^2 + \Delta U_0(z/b) + (1-A)U_0 + U_p \quad (3)$$

ここで、 z :セル中心からの距離、 $U_{obs}(z)$:位置 y において測定される見かけの移動度、 $A=1/[(2/3)-(0.420166/k)]$ 、 $k=a/b$ （セル断面の辺の長さ a, b の比($a>b$)）、 U_p :粒子の真の移動度、 U_0 :セル上下面での溶媒の流速の平均、 ΔU_0 :セル上下面での溶媒の流速の差である。

インスリン微結晶のゼータ電位は溶液のpHに依存性することが予想されるため、結晶を得ることができるpH4～pH7程度のpH条件で、ゼータ電位を測定した。

移動速度（ v ）は、泳動の様子をビデオで撮影して保存し、映っているなるべく多くの粒子に対して測定し決定した。

4. 研究成果

水および塩酸-クエン酸三ナトリウム混合水溶液中における、インスリン結晶のゼータ電位のpH依存性を、図3に示す。pHの制御は、所定の量と濃度の塩酸または水酸化ナトリウムで行なった。なお、液滴についてはばらつきが大きく、発表には至っていないため、ここでは省略する。

すべての場合、pHの増加に伴って電位が正から負へと変化し、ほぼpH5.5で電位がゼロとなった。さらに興味あることに、水中での変化は、理論的に計算されるpHによるインス

リン単分子の電荷の変化パターン（図4）と相似であったが、塩酸-クエン酸混合溶液系における結晶では等電点を境にした電位のpH依存性に非対称性が認められ、低pH側では電位の絶対値が小さく、高pH側では大きいことが、今回判明した。

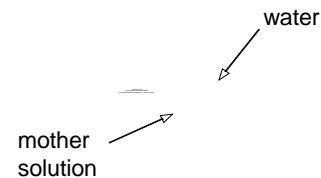


図3 インスリン微粒子のゼータ電位のpH依存性。

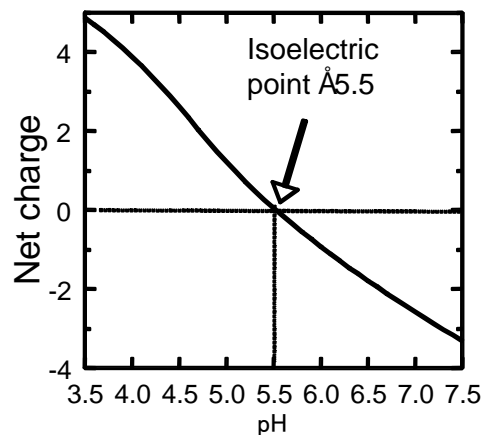


図4 アミノ酸の解離定数より理論的に計算したインスリン単分子の電荷のpH依存性。

このように高pH側でインスリン単分子の挙動とずれてくる原因は、クエン酸イオンのマイナス電荷がpHの増加と共に大きくなり、そのクエン酸イオンがインスリンに吸着するためと解釈できる。

この結果から、等電点からのpHのずれの大きさが同程度ならば、反発力は低pH側の方がより小さく、高pH側でより大きくなることが予想される。この違いは、低pH側で成長速度が早い樹枝状結晶が、高pH側で成長速度が遅い多面体型結晶が成長する観察結果（図5）と調和的であり、pHによる結晶形態変化には、ゼータ電位の特異なpH依存性が影響していると考えてよいことがわかった。

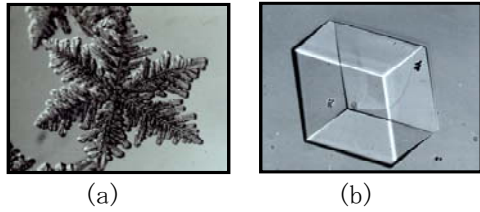


図5 インスリン結晶の形態の pH 依存性。
pH5.5 程度を境に低 pH 領域で樹枝状結晶
(a)、高 pH 領域で多面体型結晶 (b) となる。

ゼータ電位の粒径依存性を図6に示す。
本研究結果、リゾチーム微粒子ではないとさ
れているゼータ電位の粒径依存性が、インス
リン結晶にあることが判明した。結晶が大き
くなるにつれて電位がマイナスに大きくなる
原因としても、電離が進んだクエン酸イオン
が吸着して行くためと解釈できた。

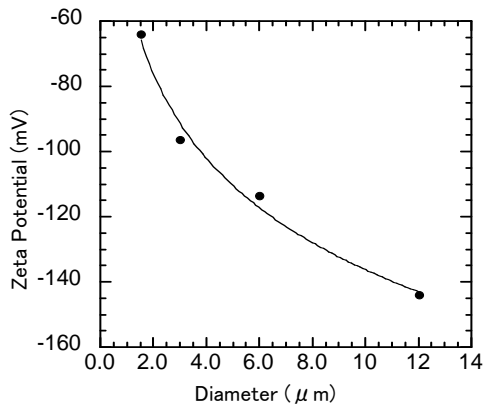


図6 インスリン微粒子のゼータ電位の
粒径依存性

以上、研究が進行するに従って、計画当初
の研究の背景や目的とは、研究の方向がシフ
トして行ったが、バルク溶液の過飽和度の pH
依存性およびインスリン結晶の成長単元で
ある六量体の量（実質的な過飽和度）の pH
依存性では説明できなかったインスリン
結晶の形態変化の pH 依存性を、表面電位の
pH 依存性から説明できる証拠を得ることが
できたとともに、リゾチームでは報告されて
いなかったゼータ電位の粒径依存性など、興
味ある新しい知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① KENJI WAIZUMI, NAWATA SHUSUKE, KIMURA
ATSUSHI, Effects of pH and Particle
Size on Zeta Potential of Insulin
Crystals in their Growth Solutions,
J. Jpn. Soc. Microgravity Appl.,
Vol. 25, No. 3, 593-597, 2008、査読有

- ② 和泉研二、名和田周助、インスリン微粒
子のゼータ電位 — 結晶形態変化との
関連 —、日本結晶成長学会誌、33・4、
148、2007、査読無
③ 和泉研二、インスリン結晶の核形成に対
する微小重力の影響、Space
Utilization Research、23、9-11、2007、
査読無

〔学会発表〕(計5件)

- ① KENJI WAIZUMI, Effects of Zeta
Potential on the Morphological
change of Insulin Crystals,
Japan-Netherlands Symposium on
Crystal Growth - Theory and
In-situ Measurements-, 2008. 10. 21,
Sapporo.
② KENJI WAIZUMI, Effects of pH and
Particle Size on Zeta Potential of
Insulin Crystals in their Growth
Solutions, Third International
Symposium on Physical Sciences in
Space, 2007. 10. 23, NARA.
③ KENJI WAIZUMI, Relationship between
the Crystal Morphology and Zeta
Potential of Insulin, 2nd
International Topical Team Meeting on
Crystal Growth, 2007. 10. 21, NARA.
④ 和泉 研二、木村 敦、インスリン微粒
子のゼータ電位、日本化学会第87回春
季年会、2007年3月27日、関西大学
⑤ KENJI WAIZUMI, Nucleation and Growth
of Insulin Crystals, 19th General
Meeting of the International
Mineralogical Association, 2006. 7. 27,
KOBE.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉 研二 (WAIZUMI KENJI)

山口大学・教育学部・教授

研究者番号：70260677

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし