

令和 4 年 9 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H01809

研究課題名(和文) 超高純度カーボンナノチューブを用いたタンパク質コロナ形成機構の解明

研究課題名(英文) A study of protein corona formation using purified carbon nanotubes

研究代表者

平野 篤 (Hirano, Atsushi)

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：90613547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はカーボンナノチューブ表面上で形成されるタンパク質コロナの形成機構を解き明かすことを目的としている。カーボンナノチューブなどのナノ粒子は生体内に取り込まれた直後にタンパク質に覆われ、タンパク質コロナと呼ばれる構造を形成する。タンパク質コロナはナノ粒子の有害性と深く関わっているため、タンパク質コロナの形成機構を明らかにすることは、ナノ粒子の潜在的な有害性を分子レベルで理解することにつながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、カーボンナノチューブ表面のタンパク質コロナ形成に寄与するアミノ酸残基が明らかになった。平面性の側鎖を有するアミノ酸残基(トリプトファン、チロシン、アルギニンなど)はカーボンナノチューブへの結合の起点となり、システイン残基はカーボンナノチューブおよび夾雑する遷移金属イオンによって酸化される。これらの知見はカーボンナノチューブ表面のタンパク質コロナ形成機構の理解に役立つ。今後、本知見と本手法をカーボンナノチューブ以外のナノ粒子にも適用し、タンパク質コロナ形成の包括的な予測法を確立することが、持続的な材料開発の要となる。本研究は、そのための基礎研究として、有益な知見をもたらした。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the mechanism of protein corona formation on carbon nanotubes. Nanomaterials including carbon nanotubes undergo protein adsorption in early stages of their uptake into biological systems, which leads to the formation of a protein layer called the protein corona. The protein corona is closely associated with various biological impacts. Thus, it is necessary to clarify the mechanism of the protein corona formation for understanding potential biotoxicity of the nanomaterials at the molecular level.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：タンパク質 カーボンナノチューブ タンパク質コロナ 分子動力学計算

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ(CNT)をはじめとするナノ粒子は、環境中から生体内に取り込まれると、速やかに生体内のタンパク質に覆われ「タンパク質コロナ」と呼ばれる構造を形成する。これがナノ粒子の生体応答における最初のプロセスであり、ナノ粒子の細胞への取り込み過程に大きな影響を与えることが明らかになっている。したがって、タンパク質コロナの形成機構を解明することは、ナノ粒子の生体応答の根源的な理解につながり、さらに言えば、将来開発される新規ナノ材料の生体内動態の予測法の確立や安全性の担保にもつながっていく。

2. 研究の目的

CNT のタンパク質コロナ形成機構をタンパク質の構成アミノ酸レベルあるいは CNT の原子骨格レベルで解明する。物理的な相互作用(物理吸着反応)と化学的な相互作用(化学反応)の両者について調査する。

3. 研究の方法

(1) アミノ酸と CNT の結合自由エネルギー: アミノ酸 1 分子と CNT (およびグラフェン) の間の結合自由エネルギーを分子動力学計算で定量化した。

(2) タンパク質と CNT の物理吸着反応: タンパク質と CNT の物理吸着反応を CNT の分光測定によって調べた。

(3) タンパク質と CNT の化学反応(酸化還元反応): タンパク質と CNT の酸化還元反応(タンパク質から CNT への電荷移動)を CNT の分光測定によって調べた。加えて、タンパク質の酸化状態の確認に電気泳動法を利用した。

4. 研究成果

一般的に CNT は酸性 pH 条件下で酸化する。酸化に伴って CNT の吸収スペクトルの強度は低下する。しかし、血清由来のタンパク質の存在下では、酸性 pH 条件下でのスペクトル強度の低下が抑制されることが明らかになった(図 1)。この結果は、タンパク質が CNT の表面に吸着することによって、CNT の酸化反応が抑制されることを示している。したがって、血中では、タンパク質の吸着によって CNT の化学反応性が抑制されることが示唆される [引用文献]

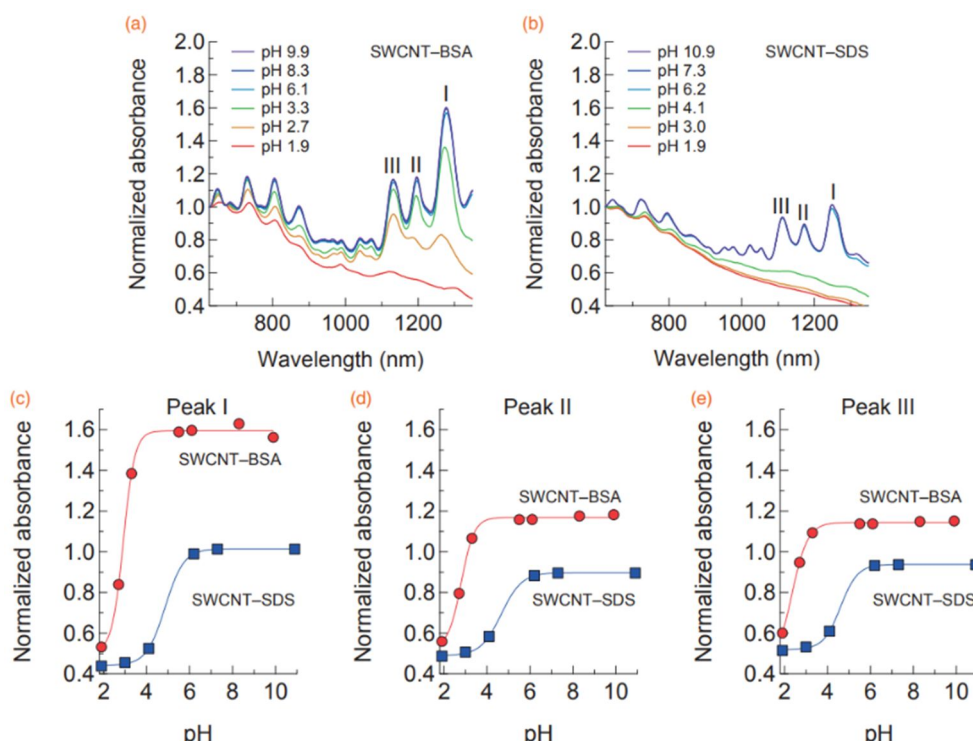


図 1 . (a,b) CNT(SWCNT)と BSA の複合体(a)と CNT(SWCNT)と SDS の複合体(b)の吸収スペクトルの pH 依存性。各吸収スペクトルは 625 nm の吸光度で規格化されている。(c-e) 代表的なピーク(I-III)の値の pH 依存性 [引用文献] Tomohito Nakayama, Takeshi Tanaka, Kentaro Shiraki, Muneaki Hase, Atsushi Hirano, Suppression of Single-Wall Carbon Nanotube Redox Reaction by Adsorbed Proteins, Applied Physics Express, 11, 2018, 075101. DOI: 10.7567/APEX.11.075101

システイン残基を有するタンパク質とCNTの酸化還元反応が、鉄イオン存在下で極めて迅速に進行することが明らかになった[引用文献]。反応速度解析の結果、鉄イオンがCNTによるシステイン残基の酸化反応を触媒することが明らかになった。これらの結果は、タンパク質の酸化ストレスを理解するためには、ナノ粒子との直接的な化学反応だけでなく、夾雑する金属イオンなどの影響も考慮する必要があることを示している(図2)。

アミノ酸とCNT(およびグラフェン)の間の親和性(結合自由エネルギー)はアミノ酸側鎖の種類に大きく依存することが分子動力学計算によって明らかになった[引用文献]。平面性の側鎖をもつアミノ酸(トリプトファン、チロシン、アルギニン)はCNTに対して特に高い親和性を有する。この親和性はCNTの曲率が小さいほど強まることも明らかになった。これらのデータをもとに、芳香族表面とアミノ酸残基の親和性を表す新指標を提案した。具体的には、アミノ酸とグラフェンの結合自由エネルギーを規格化した値を指標とした(図3)。この指標は芳香族表面に対するアミノ酸側鎖の親和性を示すものであり、これらの値を用いることで、ナノカーボンに対する任意のタンパク質表面の親和性を可視化することも可能になった。

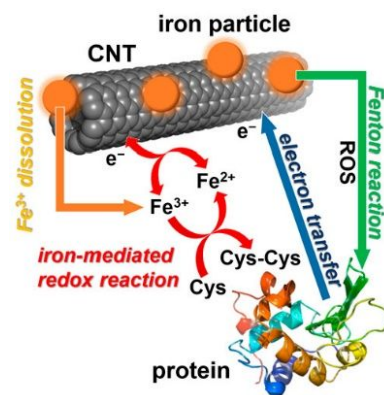


図2. タンパク質とCNTの酸化還元反応の模式図[引用文献]。Reprinted with permission from ACS Nano 13, 2, 1805-1816 (2019). Copyright 2019 American Chemical Society.

Aromaphilicity of Amino Acids and Protein Surfaces

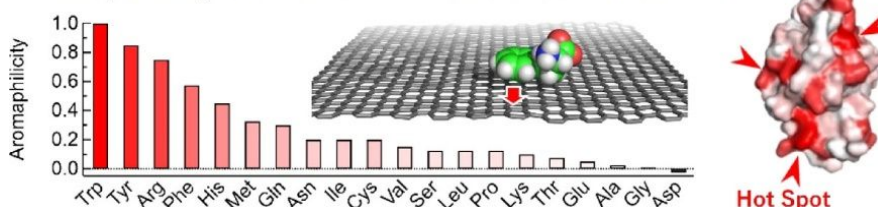


図3. アミノ酸のアロマフィリシティ・インデックスとタンパク質表面のアロマフィリシティ。赤色が濃いほど、アロマフィリシティが高い[引用文献]。Atsushi Hirano, Tomoshi Kameda, Aromaphilicity Index of Amino Acids: Molecular Dynamics Simulations of the Protein Binding Affinity for Carbon Nanomaterials, ACS Applied Nano Materials, 4, 2021, 2486-2495. DOI: 10.1021/acsnm.0c03047

タンパク質以外の生体分子(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH))とCNTの間の酸化還元反応における金属イオンの効果を調査することで、酸化還元反応の多角的な理解を目指した。結果として、NADHとCNTの間の酸化還元反応には夾雑する金属イオンはほとんど影響を与えないことが明らかになった。つまり、NADHとCNTの酸化還元反応には、両者の直接の電荷移動が主に寄与していることが示唆された。

本研究によって、CNT表面のタンパク質コロナ形成に寄与するアミノ酸残基が明らかとなった。平面性の側鎖を有するアミノ酸残基はCNTへの結合の起点となり、システイン残基はCNTと夾雑する遷移金属イオンによって酸化される。これらの知見は、CNT表面のタンパク質コロナ形成機構の理解に役立つ。今後、本知見と本手法をCNT以外のナノ粒子にも適用し、タンパク質コロナ形成の包括的な予測法を確立することが持続的な材料開発の発展の要となる。本研究は、そのための基礎研究として有益な知見をもたらした。

<引用文献>

Tomohito Nakayama, Takeshi Tanaka, Kentaro Shiraki, Muneaki Hase, Atsushi Hirano. Suppression of Single-Wall Carbon Nanotube Redox Reaction by Adsorbed Proteins, Applied Physics Express, 11, 2018, 075101

Atsushi Hirano, Momoyo Wada, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura. Oxidative Stress of Carbon Nanotubes on Proteins Is Mediated by Metals Originating from the Catalyst Remains, ACS Nano, 13, 2019, 1805-1816

Atsushi Hirano, Tomoshi Kameda. Aromaphilicity Index of Amino Acids: Molecular Dynamics Simulations of the Protein Binding Affinity for Carbon Nanomaterials, ACS Applied Nano Materials, 4, 2021, 2486-2495

平野 篤、亀田 倫史. アロマフィリシティ・インデックス: 芳香族表面に対するアミノ酸の親和性、生物工学会誌、100巻、2022、29-37

Atsushi Hirano, Tomoshi Kameda. The Affinity of Amino Acid Side Chains for Aromatic Surfaces—Aromaphilicity: Qualitative Experiments and Quantitative Molecular Dynamics Simulations、生物物理、62巻、2022、46-49

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakayama Tomohito, Kobayashi Kaito, Kameda Tomoshi, Hase Muneaki, Hirano Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Protein's Protein Corona: Nanoscale Size Evolution of Human Immunoglobulin G Aggregates Induced by Serum Albumin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 32937 ~ 32947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.2c08271	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 平野 篤、亀田 倫史	4. 巻 100
2. 論文標題 アロマフィリシティ・インデックス：芳香族表面に対するアミノ酸の親和性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.100.1_29	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 HIRANO Atsushi, KAMEDA Tomoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 The Affinity of Amino Acid Side Chains for Aromatic Surfaces—Aromaphilicity: Qualitative Experiments and Quantitative Molecular Dynamics Simulations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 46 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.62.46	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 Hirano Atsushi, Wada Momoyo, Kitamura Masahiro, Kasahara Shinjiro, Kato Katsuya	4. 巻 37
2. 論文標題 Interactions between Amino Acids and Zirconia Modified with Ethylenediaminetetra(methylenephosphonic acid): Mechanistic Insights into the Selective Binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 1605 ~ 1612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c03471	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 Hirano Atsushi, Kameda Tomoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Aromaphilicity Index of Amino Acids: Molecular Dynamics Simulations of the Protein Binding Affinity for Carbon Nanomaterials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 2486 ~ 2495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.0c03047	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 Hirano Atsushi, Wada Momoyo, Sato Takehiro K., Kameda Tomoshi	4. 巻 178
2. 論文標題 The solubility of N-acetyl amino acid amides in organic acid and alcohol solutions: Mechanistic insight into structural protein solubilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 607 ~ 615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.141	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 Nakayama Tomohito, Tanaka Takeshi, Shiraki Kentaro, Hase Muneaki, Hirano Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Suppression of single-wall carbon nanotube redox reaction by adsorbed proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Physics Express	6. 最初と最後の頁 75101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/APEX.11.075101	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 Hirano Atsushi, Wada Momoyo, Tanaka Takeshi, Kataura Hiromichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Oxidative Stress of Carbon Nanotubes on Proteins Is Mediated by Metals Originating from the Catalyst Remains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 1805 ~ 1816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.8b07936	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野 篤、亀田 倫史、和田 百代、田中 丈士、片浦 弘道
2. 発表標題 Carbon Nanotubes Induce Oxidative Stress in Coenzyme-Dependent Metabolic Reactions
3. 学会等名 第62回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 智仁、平野 篤
2. 発表標題 Size evolution of human immunoglobulin G aggregates induced by human serum albumin
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 篤、亀田 倫史
2. 発表標題 Aromophilicity index of amino acids: Prediction of protein binding affinity for aromatic surfaces
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 篤、亀田 倫史、和田 百代、田中 丈士、片浦 弘道
2. 発表標題 Aromophilicity: the affinity for graphene and carbon nanotubes determined by experiments and simulations
3. 学会等名 第61回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 篤、亀田 倫史
2. 発表標題 Aromaphilicity index: アミノ酸と芳香族表面の相互作用の指標
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 篤
2. 発表標題 アミノ酸レベルから見るナノカーボンとタンパク質の相互作用原理
3. 学会等名 溶液化学研究会若手の会オンラインシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野 篤、和田 百代、田中 丈士、片浦 弘道
2. 発表標題 Iron ion-mediated oxidation of coenzyme NADH by carbon nanotubes
3. 学会等名 第58回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野 篤、和田 百代、田中 丈士、片浦 弘道
2. 発表標題 カーボンナノチューブによるタンパク質の酸化反応における触媒由来金属の効果
3. 学会等名 第55回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン 総合シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平野篤	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 6
3. 書名 導電性材料の設計，導電性制御および最新応用展開 第6節 タンパク質を用いたカーボンナノチューブの分散技術とその原理	

〔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	亀田 倫史 (Kameda Tomoshi) (40415774)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員 (82626)	
研究分担者	白木 賢太郎 (Shiraki Kentaro) (90334797)	筑波大学・数理物質系・教授 (12102)	
研究分担者	田中 丈士 (Tanaka Takeshi) (30415707)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・上級主任研究員 (82626)	

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