

機関番号：17201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750221

研究課題名 (和文)

バイオベースポリマーをテンプレートとするタンパク質空間規則的局在化技術の確立

研究課題名 (英文)

Study of specifically patterned localization of proteins based on Biobased polymer

研究代表者

成田 貴行 (NARITA TAKAYUKI)

佐賀大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：30423560

研究成果の概要 (和文)：

バイオベースポリマーをテンプレートとするタンパク質空間規則的局在化技術の確立することを検討した。多糖類水溶液相分離系では束縛空間の形、温度、濃度を変えることによって、形状の異なる模様を持ったゲルを得ることに成功した。また2成分の多糖類のゲル化を使うことで直径10 μ mの微粒子中にグルコースオキシターゼとカタラーゼが局在化した粒子を作成することに成功した。脂質混合相分離系においては、リン脂質を用いたリポソームの表面上で2成分からなるリン脂質の相分離挙動を確認した。相分離を誘起させる手段としてリポソーム内側と外側の水溶液のイオン強度及び、pHを変化させた結果、リポソーム内部のリン脂質とリポソーム外部の脂質のパッキングの違いによりリポソーム自身の変形が起こることが分かった。コレラ毒素タンパクVCHは単分子膜上で脂質混合膜を相分離を誘起させ、コレステロールリッチ相にのみVCHが局在することが分かった。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I attempted to use the technique of self-patterning of biobased polymer to pattern and localize proteins on the biobased polymer matrix. We successfully obtained uniquely patterned gels based on the self-patterning of biobased polymer by changing parameter such as preparation temperature and concentration of the polymer. JAUNS particles immobilizing glucose oxidase and catalase separately can be also obtained by using the galation of two different polysaccharides that can form gels by different salts. It was also found that VCH cholera toxin, a membrane protein, induces phase separation of monolayer composed of DMPC and Cholesterol, which lead to localize VCH in the Cholesterol rich phase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：高分子・繊維材料

キーワード：天然・生体高分子材料 相分離、局在化、バイオベースポリマー

1. 研究開始当初の背景

バイオベース材料をテンプレートとして空間規則的にタンパク質を局在化する手段は、バイオチップなどの医療材料加工手段としては①生体適合性が良く（合成高分子、化学薬品を用いないため）②安価な（合成の必要が無い多糖、脂質を使う為）③マトリックスがタンパクの活性を高める可能性が高い方法として切望される。しかし、十分な空間的規則形状を構築できる手段がマトリックスである多糖や脂質系には無かった為に未だ開拓されていない。申請者らは、多糖類水溶液の“相分離”を利用して生体模様類似の形態が自己組織的に形成する現象を見出し、バイオベースポリマーを空間規則的に配置できる手段を得ていた。この見地と相分離技術が一般にタンパク質の分別技術に応用されている事実から、バイオベース材料をテンプレートとした空間規則的にタンパク質を局在化できる手段が確立可能であると着想した。タンパク質の局在化については、脂質混合単分子膜系においては“相分離”挙動が毒素タンパク VCH を局在化させることについて申請者らが報告しており、“バイオベースポリマーの空間規則的配置”、“タンパクの局在化”の両面を相分離挙動から議論できる準備が整っていた。

2. 研究の目的

生体親和性の良い脂質や多糖等のバイオベースポリマーをテンプレートにしてタンパク質を空間規則的に局在化する手段の確立を目的とする。目的を達成する為に①多糖類水溶液相分離系と②脂質混合相分離系、2つのアプローチを試みる。①の系では申請者らが既に空間的高秩序化に成功している。しかし、サイズはサブミリオオーダーである。本研究ではミクロンオーダーへのa. ダウンサイズ化及びb. 粒子内での3次元的局在化を図る。②の系ではサブミクロンサイズの2次元空間に形成する相分離構造にタンパク質を局在化することに成功している。しかしながら空間的秩序性は①程ではない。そこで、この2次元混合単分子系の相分離形態に“空間規則性”取り入れることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 多糖類水溶液相分離系

①多糖ゲルパターンのダウンサイズ化

多糖相分離系では申請者らが既に空間的高秩序化に成功している。しかし、サイズはサブミリオオーダーであった。溶液の粘性変えることでパターンのダウンサイズ化を図った。

②粒子内での3次元的相分離構造の制御

κ -カラギーナン粒子とアルギン酸粒子を作成して表面及び内部の形態を、明視野、暗視野、偏光顕微鏡、及び蛍光顕微鏡で観察した。

③多糖ゲルの高秩序様相分離をもちいて、たんぱく質のゲル内での局在化を試みた。 κ -カラギーナン水溶液はカリウムイオンを一方に拡散させることで液晶と非晶部分が自己組織的に巨視的なストライプ状構造を形成する。この液晶と非晶部分では親疎水性が異なるためタンパク質は其々の部分に局在化すると考えられる。ここでは(a)緑色蛍光タンパク質 GFP と用いる系と(b)染色体を構成するタンパク質の一群であるヒストンをゲル中での局在化を検討した。

④互いのゲル化因子を含んだ2つの多糖エマルジョンを接触させることで二つの領域が分離した JANUS 粒子を作成することができる。互いの多糖エマルジョンに異なるタンパクを入れて固定化することによってバイオポリマーをテンプレートとするタンパク質局在化技術となり得るため、この方法について検討した。

(2) 脂質質混合相分離系

①リン脂質-コレステロール系において pH を調整することで静電相互作用を強調し、コレラ菌毒素タンパク VCH を DMPC とコレステロール混合脂質膜に吸着させることで、タンパク質空間規則的局在化を図った。操作は気-液界面で行なった。

②リン脂質を用いたリポソームの表面上で2成分からなるリン脂質の相分離挙動を確認した。相分離を誘起させる手段としてリポソーム内側と外側の水溶液のイオン強度及び、pH を変化させた。

③異なるリン脂質作成した相分離様リポソーム2種類を作成し、其々のリポソームに異なる酵素を内包し、単一粒子中複数の酵素が局在化させた JANUS 微粒子の創製を図った。

4. 研究成果

①アルギン酸水溶液系でのダウンサイズ化を図るために、多糖類の分子量を小さい場合とアルギン酸濃度を低下させることでゲルパターンのダウンサイズ化を図ったが、パターンの大きさが大きく変わることはなかった。大幅に粘度の低下を図ることで、ゲルのパターンが現れない状態になることもあった。つまり、パターン化は相分離が支配しているので、濃度や分子量を変えることで相分離曲線が変わり、パターンが現れにくい領域になってしまうと考えられる。網羅的に相分離の相図を作り、どの点の相分離が一般的にパターン化するのかについて検討する必要がある。

② κ -カラギーナン水溶液で粒子を作成した際にある領域で表面が玉ねぎ型の表面をもつ微粒子が形成できることが明らかになった(図1(a))。一方でアルギン酸水溶液を粒子で作成した場合にはカプセル型の形態を持つゲ

ルが形成された(図1(b))。

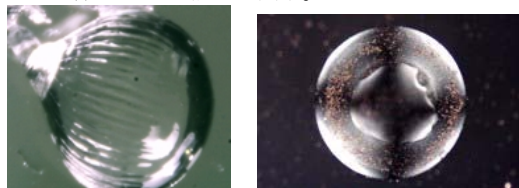


図1(a) κ -カラギーナン粒子

図1(b) アルギン酸粒子

これらの様々な形態をもつ粒子は、単なるゲル化によることでは生じない。つまり内部ゲルの相分離に伴うゲル表面及び内部の収縮により形成されると考えられる。ゲル形態の再現性は得られているが、今のところ形態をコントロールするには至っていない。形態形成と収縮の形態については、相図と形態の関係を網羅的に調べる必要がある。

③(a) 緑色蛍光タンパク質GFPを用いた系では、GFP自体の蛍光を確認することでタンパク質が局在化するかについて検討した。 κ -カラギーナンのプレゲル溶液の中に一様に分散させたGFPはゲル化後も κ -カラギーナングル内にほぼ均一に固定化された。その際にはカラギーナングル自体は内部に液晶と非晶部分のパターンを形成した。局在化されなかった理由として、カラギーナンとGFPの相互作用がほとんど無かったことが考えられる。③(b) ヒストンを用いた系では上記で示したGFPと同じ実験を行った。ヒストンの等電点はpH9付近であることから、pH9でカリウムイオンを拡散させることによって、 κ -カラギーナングルの巨視的パターン化及びヒストンの局在化を図った。しかしながら、ヒストン自体が κ -カラギーナンと凝集体を作ってしまうためにカラギーナングルをパターン化することができなかった。

④アルギン酸とキトサンのゲル化を利用してグルコースオキシターゼとカタラーゼの局在化及び固定化を図った。結果、互いの酵素が10ミクロン以下の領域に局在化した状態を持つJANUS微粒子を作成することに成功した。この粒子は、一方の酵素反応で得られた生産物がもう一方の酵素の基質となるため、酵素反応を原動力とするナノモーターとして期待できる。

(2)脂質質混合相分離系

①VCHはこの脂質混合膜を相分離し、コレステロールリッチ相にのみVCHが局在することが分かった。マイクロサイズでタンパク質を局在化することには成功したが、パターン化するまでには至らなかった。今後、相分離様式の解明を行い、分離した2相の界面張力を下げることで、2相分離形態を自己組織化的に構築させ、規則配置化を試みる。現在、系

内の塩濃度をコントロールするなどして調整を図っている。

②リポソーム内部のリン脂質とリポソーム外部の脂質の占有面積が変わることでリポソーム自身の変形が起こることが分かった。pH変化とこの変形また相分離の発展度の関係をつけることで、リポソーム膜上の相分離と変形をコントロールできると考えられる。

③異なるリン脂質作成したリポソームは電荷の違いによりお互いが引き合いJANUS微粒子を作成することに成功した(図2)。またこのリポソーム系JANUS粒子に異なる酵素を内包した。現在これらリポソーム内に、異なる酵素が局在化して内包されているかについて検討を行っている。

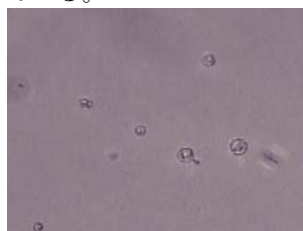


図2 得られたリポソーム系JANUS粒子

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ①Takayuki Narita, Masayuki Tokita, Spatial patterns induced by gelation of polysaccharide solutions, PRECIPITATION PATTERNS IN REACTION-DIFFUSION SYSTEMS, 査読有、in press 2011
- ②Osami Kuroda, Hiroshige Seto, Takayuki Narita, Michio Yamanaka, Yushi Oishi, Liposome Deformation by Transmembrane pH and Ionic Strength Imbalance, Progress in Colloid and Polymer Science, 査読有、in press 2011
- ③Miyuki Kuramori, Takamasa Ishikawa, Takayuki Narita and Yushi Oishi, Phase separation for Langmuir monolayer in binary system based on a π -A isotherm measurement, Progress in Colloid and Polymer Science, 査読有、in press 2011
- ④Y. Tagami, T. Narita, H. Ikigai and Y. Oishi, Penetration Behavior of Vibrio cholerae hemolysin into (DMPC/Cholesterol) Mixed Monolayer Colloids and Surfaces A 査読有 347 巻, 2009, pp.225-229
- ⑤T. Narita, T. Kishigawa, Y. Tagami and Y. Oishi, Preparation of W/O/W Microcapsule Containing Enzyme Without Alcohol, Colloids and Surfaces A 査読有 347 巻, 2009, pp.187-191
- ⑥Y. Tagami, T. Matsufuji, H. Ikigai, T. Narita and Y. Oishi, Pressure

Dependence of Aggregation State of (DMPC/Cholesterol) Mixed Monolayer Based on AFM Observation., Bulletin of the Chemical Society of Japan 査読有、84 巻、2009、pp.536-538

[学会発表] (計 19 件)

- ① Osami Kuroda, Takayuki Narita, Yushi Oishi, Michio Yamanaka; Fluorescence microscopic study of vesicle deformation induced by pH and Ionic strength perturbations; 2010 環太平洋国際化学会議; 2010 年 12 月 17 日; ハワイコンベンションセンター
- ② Takayuki Narita; pH Sensitive Microcapsule Whose Membrane Undergoing Volume Phase Transition; 2010 International Symposium on Stimuli-Responsive Materials; 2010 年 10 月 27 日;
- ③ Takayuki Narita, Osami Kuroda Hiroshige Seto, Michio Yamanaka and Yushi Oishi; Liposome deformation derived by the differences in pH and/or ionic strength between inside and outside of the vesicle; 24th Conference of the European Colloid and Interface Society; 2010 年 10 月 8 日; Prague, Czech Republic
- ④ Hiroshige Seto, Hajime Ikigai, Takayuki Narita, Yushi Oishi; Interaction between Vibrio cholerae hemolysin and sterol monolayers; The 3rd International Kyushu Colloid Colloquium; 2010 年 9 月 23 日; 福岡 Fukuoka Recent Hotel
- ⑤ 黒田修未・瀬戸洋繁・成田貴行・大石 祐司; pH 及びイオン強度に誘起されるリポソームの変形; 第 47 回化学関連支部合同九州大会; 2010 年 7 月 10 日; 福岡 北九州国際会議場
- ⑥ Osami Kuroda, Hiroshige Seto, Takayuki Narita, Yushi Oishi, Michio Yamanaka; Liposome deformation derived by the differences in pH and/or ion strength between inside and outside of the vesicle; 4th Mini-symposium on liquids; 2010 年 6 月 26 日; 福岡 九州大学
- ⑦ 緒方 越子・成田 貴行・大石 祐司; キトサン-フタル酸マイクロカプセルの調製と pH 応答性の評価; 日本化学会第 90 春季年会; 平成 22 年 3 月 28 日; 大阪府 近畿大学
- ⑧ 成田貴行, 大西勇, 鴫田昌之, 大石祐司; 金属イオンの拡散によって形成される多糖ゲルの空間パターン; 高分子学会九州支部フォーラム平成 22 年 2 月 10 日; 福岡近畿大学分子工学研究所
- ⑨ H. Matsumae, T. Narita, M. Tokita, Y. Oishi; Spatial Pattern formation of Alginate Gel in Capillary; 2009 Pusan-Kyeongnam/Kyushu-Seibu Joint Symposium; October 26, 2009; Kagoshima, Kagoshima Univ.
- ⑩ E. Ogata, X. Cui, Y. Tagami, T. Narita, Y. Oishi; Release Behavior of Ammonium Chloride from Glucose-Sensitive Microcapsule; 2009 Pusan-Kyeongnam/Kyushu-Seibu Joint Symposium; October 26, 2009; Kagoshima, Kagoshima Univ.
- ⑪ 緒方 越子, 崔 香花, 田上 安宣, 成田 貴行, 大石 祐司; 糖応答性マイクロカプセルからのアンモニウム塩の放出挙動; 第 62 回コロイドおよび界面化学討論会; 平成 21 年 9 月 17 日-19 日;
- ⑫ 松前 治樹, 成田 貴行, 大西 勇, 鴫田 昌之, 大石 祐司; 多糖ゲルに形成される空間パターンの温度依存性; 第 62 回コロイドおよび界面化学討論会; 平成 21 年 9 月 17 日-19 日; 岡山 岡山理科大学
- ⑬ 成田 貴行, 大西 勇, 鴫田 昌之, 大石 祐司; 多糖水溶液のゲル化とパターン形成; 第 58 回高分子討論会; 平成 21 年 9 月 16 日-18 日; 熊本 熊本大学
- ⑭ 尾形尚子, 岸川毅, 田上安宣, 成田貴行, 大石 祐司; 酵素を内包したグルコース応答性マイクロカプセルの調製と評価; 第 58 回高分子討論会; 平成 21 年 9 月 16~18 日; 熊本 熊本大学
- ⑮ 成田貴行, 岸川毅, 田上安宣, 大石祐司; 酵素反応を利用した糖応答性カプセルゲルの収縮挙動; 田中記念シンポジウム 2009; 2009 年 8 月 6 日; 福岡 アクロス福岡
- ⑯ 尾形 尚子, 岸川 毅, 田上 安宣, 成田 貴行, 大石 祐司; グルコースオキシターゼを内包した PPL マイクロカプセルの調製と糖応答; 第 46 回化学関連支部合同九州大会; 2009 年 7 月 11 日; 福岡 北九州国際会議場
- ⑰ 緒方 越子, 崔 香花, 田上 安宣, 成田 貴行, 大石 祐司; 糖応答性マイクロカプセルの薬剤放出挙動; 第 46 回化学関連支部合同九州大会; 2009 年 7 月 11 日; 福岡 北九州国際会議場
- ⑱ 松前 治樹, 成田 貴行, 大西 勇, 鴫田 昌之, 大石 祐司; 多糖ゲルに形成される空間パターンと温度の影響; 第 46 回化学関連支部合同九州大会; 2009 年 7 月 11 日; 福岡 北九州国際会議場
- ⑲ 成田貴行, 大西勇, 鴫田昌之, 大石祐司; 毛細管内のゲル化により形成される多糖ゲルの空間パターン; 第 32 回日本バイオレオロジー学会年会, 2009 年 6 月 5 日, 群馬 桐生市民文化会館

〔産業財産権〕○出願状況（計1件）

名称：疎水性基板及びその製造方法
発明者：大石祐司、成田貴行、田上安宣
権利者：佐賀大学
種類：特願
番号：2009-100159
出願年月日：2009年4月16日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://evalwww.cc.saga-u.ac.jp/search/IST?ISTActId=FINDJPDetail&ISTKidoKbn=&ISTErrorChkKbn=&ISTFormSetKbn=&ISTTokenChkKbn=&userId=1505>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 貴行 (NARITA TAKAYUKI)
佐賀大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：30423560