

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06115

研究課題名(和文) 1分子計測による酵素パパインの耐熱メカニズムの研究

研究課題名(英文) Study of temperature resistant mechanisms of papain enzymes by single-molecule measurements

研究代表者

梅村 和夫 (UMEMURA, KAZUO)

東京理科大学・理学部第二部物理学科・教授

研究者番号：60281664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：耐熱性蛋白質のパパイン、セルラーゼ、プロメラインについて、原子間力顕微鏡(AFM)、近赤外顕微鏡(NIR)、近赤外分光などを用い1分子レベルでの耐熱メカニズムの理解を試みた。実験の工夫として、単層カーボンナノチューブ(SWNT)をセンサープローブとして用いるPL測定を行い、AFM実験では基板上で分子を混合する水溶液中測定を行った。その結果、近赤外顕微鏡観察では加熱したパパイン等の添加でもキラリティ特異的なSWNTの発光が得られること、SWNTをビーズ等に吸着させることでビーズ1個での近赤外発光計測できること、AFMでは基板上での個々の分子の変形や凝集を可視化できること、などの結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義はパパイン等の耐熱メカニズムの研究について、1分子計測の視点から知見を得たことにある。AFM測定では、分子の変形や凝集等の分子間相互作用を個々の分子レベルで可視化できた。近赤外測定では、1分子とはいえないがビーズ1個での測定が可能となり、パパイン等の与える効果がSWNTのキラリティ特異的であることがわかり、今後新たな生体分子応答の計測技術として確立できる可能性が示された。本研究の社会的意義は、生体分子の持つさまざまな機能を応用して実用的なバイオデバイス等を開発する場合、耐熱性の欠如は大きな弱点である。耐熱性生体分子の研究は熱に強いバイオデバイスの開発の基盤技術となりえる。

研究成果の概要(英文)：I investigated the heat resistance mechanisms of thermostable proteins, papain, cellulase, and bromelain, at the single molecule level using atomic force microscopy (AFM), near-infrared (NIR) microscopy, and near-infrared spectroscopy. To optimize the experimental procedures, I performed the use of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) as sensor probes for NIR measurements. I proposed a new protocol to mix the biomolecules and SWNTs on a substrate for AFM in liquids. As a result, chirality-specific SWNT NIR emission induced by the addition of heated papain and native papain molecules could be measured. The near-infrared emission can be measured even on a single bead by the NIR microscopy. Deformation and aggregation of the molecules on the substrate were well observed by AFM in liquid.

研究分野：生物物理学

キーワード：原子間力顕微鏡 パパイン セルラーゼ プロメライン カーボンナノチューブ 近赤外 耐熱性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体分子は一般に、水素結合など弱い相互作用で成り立っている部分が多くあり、加熱によって容易に変性して酵素活性などを失う。しかし、パパイヤの持つ酵素パパインや、パイナップルの持つ酵素ブロメリンなどは耐熱性が高いことが知られ、例えばパパインは 80 度でも高い酵素活性を示す。ほかの蛋白質と同じ 20 種類のアミノ酸からなる分子であるにも関わらず高い耐熱性を持つのは興味深く、その耐熱メカニズムについて巨視的には多くの先行研究が行われてきた。一方、原子間力顕微鏡など 1 分子計測からのアプローチは乏しかった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、原子間力顕微鏡 (AFM)、近赤外顕微鏡 (NIR)、デジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM) などのナノ計測技術を駆使し、これらに近赤外発光スペクトル測定等の巨視的な計測法による実験手法も加味して、ナノ計測の視点からパパイン等の耐熱メカニズム解明を目指すことを目的とした。また、これを実現するために、単層カーボンナノチューブ (SWNT) をセンサープローブとして用いるなど新規な試料作製法を提案することとした。

3. 研究の方法

研究方法の要点の一つは試料作製にあり、特に単層カーボンナノチューブ (SWNT) の近赤外発光・吸収スペクトルが周囲の環境変化に対して高感度で応答することを活かして、パパイン等分子のわずかな変化を検知すること、また AFM 試料について平坦な基板上でさまざまな組み合わせ・順序で分子を混合して水溶液中での 1 分子測定を行うことで分子の微小な構造変化を検知すること、を構想した。また、計測装置のうち、AFM、DHM、分光装置には温度制御装置を付与してその場で加熱実験を行えるようにし、それら以外の計測ではあらかじめ加熱した試料を計測することとした。

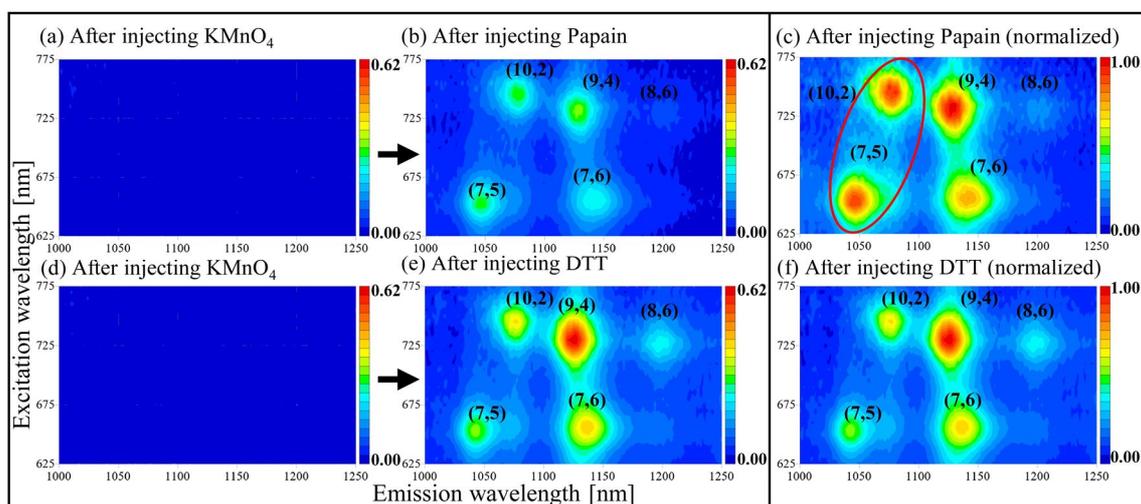
4. 研究成果

原子間力顕微鏡を用いたアプローチについては、耐熱性生体分子としてパパイン、セルラーゼ、ブロメリンを用いた。それぞれが単独の場合、SWNT と混合した場合、について主に水溶液中測定を行った。いくつかの条件において、加熱による分子の変形や集合が観察された。得られた知見のうち、パパイン分子と SWNT との相互作用が、水溶液の pH によって大きく変化することを個々の分子レベルで可視化したことについて、すでに論文発表を行った ()。この実験はもとも、可溶化した SWNT にパパイン分子を吸着させておき、加熱等の処理を施した際の分子の状態変化を SWNT の近赤外発光で検知することを想定し、それと並行して AFM 測定を行うはずだった。ところが、パパイン水溶液と SWNT 分散液を混合すると、肉眼で確認できるほどの明らかな凝集を生じることがわかり、まずその凝集現象を精査することとした。パパインは水溶性であり、SWNT も有機分子で可溶化することで安定して分散できるが、その 2 つを混合すると凝集する。この現象をよく理解しておかないと分光測定などで状態変化を測定しても、それが個々の分子の変化なのか凝集による影響なのかかわからないため、ぜひなく検証する必要が生じた。pH が凝集に影響することはわかったものの、凝集をなくすることはできなかつたため、本研究では SWNT やパパインをナノ多孔質シリカに吸着させることでこれを解決する (初めから固体表面に吸着させておけば凝集を避けることができる) こととした。一方、最近になって、SWNT 分散にポリエチレングリコールを用いると凝集を防げるとの報告がほかの研究グループから出ており、その手法は今後活かせる可能性がある ()。

原子間力顕微鏡による研究では、パパイン分子を水溶液中観察中に加熱すると変形することを見出したほか、セルラーゼについても類似の実験を行った。また、ブロメリンについては、特定の濃度や溶液の条件下で加熱すると大きな構造変化を起こすことも分かってきた。これらの実験では、DHM も AFM と相補的な情報を得るために有効であった。ただし、これら知見についてはなお検討したい点があり、フォースカーブ測定やほかの測定法の結果も合わせて報告するほうが研究の付加価値を高めることになるため、今後の研究への引き継ぐこととし、本研究の成果は前述の論文発表としたい。

次に、近赤外スペクトル測定、および近赤外顕微鏡による計測実験について述べる。この実験では、可溶化した SWNT の近赤外発光、あるいは近赤外吸収スペクトルを計測し、そこにパパイン等の生体分子を添加した場合、さらに基質を添加した場合のスペクトル変化を計測することにより、生体分子の微小な変化を検知することであった。この手法で蛋白質を調べた先行研究は少ないが、ビタミンなど分子量の小さな分子については多数の報告が行われている。当初の構想では、低分子の試料と同様に、SWNT の分散液にパパイン等を添加して測定する予定だった。しかし、上述のように、SWNT 分散液にパパインを添加すると明らかな凝集を生じることが分かったため、そのままではスペクトル測定に支障があると判断することとなった。この問題を解決するため、まず SWNT をナノ多孔質シリカまたはシリカビーズに吸着させ、そのうえでパパイン等を添加する手順に変更した。こうすることで凝集の問題を回避することができた。

巨視的な近赤外スペクトル測定の場合は、ナノ多孔質シリカを担体として用いた。その理由は、シリカビーズは短時間で沈殿してしまい、安定したスペクトル測定ができなかったためである。ナノ多孔質シリカの場合は問題なくスペクトル測定を行うことができた。そこでまず、ナノ多孔質シリカに吸着させた SWNT をあらかじめ酸化剤で消光させ、そこにパパインを添加することでパパイン添加に起因する SWNT の発光変化を計測した。SWNT の近赤外発光スペクトル自体は分散液の場合よりもやや弱くなるものの、測定に支障はなかった。その結果、パパイン添加で SWNT 発光の回復が認められ、さらに、対照試料として用いたジチオスレートール (DTT) 添加による発光回復と比較した場合、パパイン添加ではキラリティ (7,5) (10,2) の SWNT の発光が特に回復することが分かった。SWNT にはキラリティがあり、キラリティごとにその物性が異なることが知られている。パパインや DTT の添加で発光が回復するのは、これら分子の持つ抗酸化作用の効果が主な理由と考えられるが、本研究の結果はパパインと DTT では作用するキラリティが異なることを示唆している。SWNT のキラリティ特異性を活かした生体分子の計測はまだ先行研究が少なく、耐熱性蛋白質の研究例は全くなかったため、まずこの研究成果について論文発表を行った () 測定データの例として、発表論文掲載の図から、許諾を得てキラリティ特異的な発光マップを下記に転載する。パパインと DTT で SWNT 発光のキラリティ特異性が異なることが示されている。



続いて、加熱したパパイン溶液を用いて類似の実験を行った。この実験では、新たに近赤外顕微鏡を立ち上げての測定を行った。近赤外顕微鏡自体は、一般的な倒立顕微鏡等に近赤外測定のできるカメラを取り付ければ可能となるが、本研究の工夫として、上述したキラリティごとの違いをより明確に捕捉するため、特定のキラリティの SWNT の発光だけを検出できるようにバンドパスフィルターを用いて特定の波長域の発光だけを観測した。その結果、60 度、100 度で加熱したパパインについても、SWNT の発光回復を定量測定することができた。なお、この実験では SWNT をシリカビーズに結合させて使用した。分散液のスペクトル測定は巨視的であるが、近赤外顕微鏡による観察は 1 分子とまでは言えないがビーズ 1 個の測定であり、1 分子レベルの計測に近くものといえる。この結果について現在論文投稿中である。パパイン以外の蛋白質や基質についても同様の実験研究を進めてきたが、より精度の高い計測を行ってから発表したいため、本研究は現在投稿中の論文までを本研究の成果としたい。なお、近赤外測定においては、ベトナム国家大学の研究グループと一部実験を共同した。

本研究を実験の技術的な面から総括すると、SWNT 分散液に蛋白質溶液を添加すると凝集を生じる、という点が当初予想していなかった問題となった半面、その解決策としてナノ多孔質シリカやシリカビーズを担体として SWNT をあらかじめ固体表面に吸着させる、という手順を確立し、そのことが近赤外顕微鏡の立ち上げに役立った、といえる。

本研究の学術的な意義は、パパイン等の耐熱メカニズムの研究について、1 分子計測の視点から知見を得たことにある。AFM による研究では、分子の変形や、凝集等の分子間相互作用を個々の分子レベルで可視化することができた。近赤外測定では、1 分子とはいえないがビーズ 1 個での測定が可能となり、パパイン等の与える効果が SWNT のキラリティごとに特異性を持つことがわかり、今後新たな生体分子応答の計測技術として確立できる可能性が示された。本研究の社会的意義は、生体分子の持つさまざまな機能を応用して実用的なバイオデバイス等を開発する場合、生体分子が熱に弱いことは大きな弱点である。耐熱性生体分子の研究は熱に強いバイオデバイスの開発の基盤技術となりえる。

本研究のアウトプットは、採択済みの査読付き論文が 2 報、投稿中の論文 1 報が主な内容である。招待講演を含め国内外の学会で複数回の研究発表を行った。普及活動として所属機関の年 3 回のオープンキャンパスで高校生などに、科学技術振興機構 (JST) のさくらサイエンスプログラムで複数国から学生や若手研究者を招へいして研究紹介を行った。

<引用文献>

Masaki Kitamura, Kazuo Umemura, *Scientific Reports*, 13, 4833, 2023 年.

Naamah Levin, Adi Hendler-Neumark, Dotan Kamber, Gili Bisker, *Journal of Colloid and Interface Science*, 664, 650-666, 2024 年.

Kota Hirayama, Masaki Kitamura, Shigeki Mayama, and Kazuo Umemura, *Chemistry Letters*, 52,5, 408-411, 2023 年.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaki Kitamura, Kazuo Umemura	4. 巻 13
2. 論文標題 Hybridization of papain molecules and DNA-wrapped single-walled carbon nanotubes evaluated by atomic force microscopy in fluids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-31927-8	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 Hirayama Kota, Kitamura Masaki, Mayama Shigeki, Umemura Kazuo	4. 巻 52
2. 論文標題 Chirality-specific Near-infrared Photoluminescent Responses of Single-walled Carbon Nanotubes to Detect Papain Adsorption Assisted by the Use of DNA and Frustules	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 408 ~ 411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.230068	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梅村 和夫, 平山 航太, 北村 優樹, Nay San Lin, Minh Hieu Nguyen, Binh Duong Le, Anh Tuan Mai, 真山 茂樹
2. 発表標題 ナノ多孔質バイオシリカを用いたマイクロバイオデバイスの作製
3. 学会等名 第70回応用物理学会 春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平山航太、北村優樹、梅村和夫
2. 発表標題 単層カーボンナノチューブと珪藻殻の複合による再利用可能な近赤外発光デバイスの作製
3. 学会等名 第12回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村優樹、梅村和夫
2. 発表標題 温度変化が引き起こすパパインの構造変化
3. 学会等名 第12回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Kitamura, Kazuo Umemura
2. 発表標題 原子間力顕微鏡液中測定によるパパイン分子とDNA で被覆された単層カーボンナノチューブ との相互作用のpH の影響の研究
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Kitamura, Kazuo Umemura
2. 発表標題 Adsorption of papain molecules on DNA wrapped single-walled carbon nanotubes studied by atomic force microscopy in fluid
3. 学会等名 THE 22ND INTERNATIONAL VACUUM CONGRESS (IVC-22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maria Christine Lugo, Masaki Kitamura, Kazuo Umemura
2. 発表標題 Morphological observation of the amyloid fibrillation of stem bromelain at alkaline pH and under heat treatment
3. 学会等名 第13回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 立川 佳樹、伊藤 雅浩、入田 賢、梅村 和夫
2. 発表標題 ミクロンサイズの(6,5)単層カーボンナノチューブバイオセンサー
3. 学会等名 日本表面真空学会2024年度関東支部講演大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者情報データベース
<https://www.tus.ac.jp/ridai/doc/ji/RIJIA01Detail.php?act=nam&kin=ken&diu=5827>

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

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