

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月17日現在

機関番号：12102
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23550189
研究課題名(和文) タンパク質の凝集や失活を防ぐ高分子アディティブの開発
研究課題名(英文) Development of polymer additive that prevents protein aggregation and inactivation
研究代表者 白木 賢太郎 (SHIRAKI, Kentaro)
筑波大学・数理物質系・准教授
研究者番号：90334797
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：

タンパク質の凝集をふせぐ低分子の溶液添加剤が開発されてきた。本研究では、タンパク質凝集をふせぐ高分子アディティブを開発し、その機構を解明することを目的とした。ポリエチレングリコールは低分子のアルギニンとは異なり、高温での凝集抑制能が高く、アルギニンと併用すると加算的な効果を示すことがわかった。カチオン性高分子電解質のポリアリルアミンと、アニオン性高分子電解質のポリアクリル酸は、荷電相補的にタンパク質に結合して安定化することがわかった。これらの高分子アディティブは大きなタンパク質に対して凝集させる性質があったが、PEG化ポリマーにはより高い凝集をふせぐ働きがあった。

研究成果の概要(英文)：

Small additives have been developed that prevents protein aggregation and inactivation. Here, we have developed the polymers that prevent protein aggregation and protein stabilization, and also we have examined those molecular mechanisms. The molecular mechanism of polyethylene glycol as an aggregation suppressor was different mechanism from that of the well-used additive arginine hydrochloride. It was found that cationic polyallylamine and anionic polyacrylic acid bind on protein that stabilizes protein structure in aqueous solution. PEGylated polymer was more favorable as aggregation suppressor for aggregation-prone protein.

研究分野： 化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード： タンパク質、凝集、高分子、溶液添加剤、失活

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は水溶液中で不安定なために、基礎研究や産業応用などに問題になることが多い。これまでに、タンパク質の凝集をふせぎ安定化する低分子の溶液添加剤（アディティブ）を開発してきた。アミノ酸誘導体やジアミンなどの低分子アディティブは、タンパク質結晶化やリフォールディング、保存液、難水溶性薬剤の溶液分散へと応用されてきたが、高濃度を添加する必要があるという欠点があった。そこで本申請では、極めて低濃度で特異的にタンパク質に作用するタイプの高分子アディティブを見つけて分子機構を明らかにしていく。高分子アディティブは、（１）低分子アディティブと比べて数桁低い濃度でタンパク質を安定化し凝集を防ぐので溶液の性質を変えない、（２）高分子なので結合・解離の制御ができる、という可能性があるだろう。本成果によって、低分子アディティブと同じように、タンパク質溶液の添加剤として広く利用されていくと考える。

2. 研究の目的

酵素や抗体などのタンパク質は、バイオテクノロジーや食品、医療などの産業とも関わる重要な分子である。しかし、タンパク質は水溶液中で不安定であるという欠点がある。タンパク質の水溶液中での安定性を向上させるために、低分子の溶液添加剤（アディティブ）が開発されてきた。

なかでもアルギニンは、タンパク質を不安定化させずに凝集をふせいだり、溶解度を向上させたりする働きがあるので、広く用いられてきてきた。他にもアミノ酸エステルやアミノ酸アミド、ジアミンなどは、水溶液中での化学劣化を防ぐ働きもあるので、応用の可能性の高い低分子アディティブである。しかし、これらの低分子アディティブは、通常、数百 mM 以上の高濃度が必要であるという欠点がある。また、低分子アディティブはバルクに加えるしかなく、固体や脂質膜の表面での利用ができないという性質もある。

そこで本研究では、タンパク質と複合体をつくる電解性高分子や親水性高分子、タンパク質の構造や安定性に影響を与える電解性高分子や親水性高分子を探索し、凝集の抑制能や失活抑制能を調べることを目的とした。また、タンパク質とポリマーとの相互作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

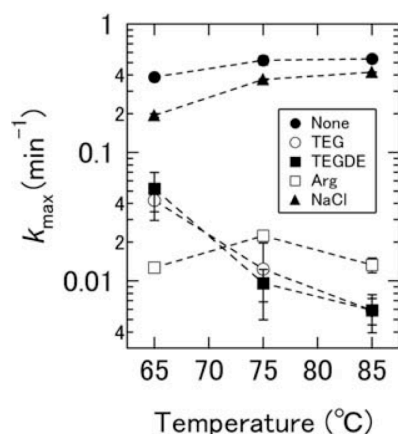
タンパク質溶液に共存させる高分子アディティブとして、ポリアクリル酸、ポリアリルアミン、ポリエチレングリコール、ポリスチレン、PEAMA-b-PEG（poly(N,N-

diethylaminoethyl methacrylate) -block-poly(ethylene glycol)) を用いた。タンパク質として卵白リゾチームやウシリボヌクレアーゼなどの小型のモデルタンパク質のほか、4 量体を形成する β ガラクトシターゼ、ブタ由来ミオシンやアミロイド β のアミロイドなどの繊維状タンパク質を用いた。タンパク質の凝集過程を調べるために、アルギニン塩酸塩や無機塩のほか、タンパク質の沈殿溶剤としても用いられるアルコールを共存させた系で調べた。タンパク質の凝集や失活は、溶液中のほか、ポリスチレン表面や、リポソーム表面でも調べて、バルク溶液での振る舞いとの違いを比較した。

以上のタンパク質やポリマー、溶液条件をもとに、タンパク質の凝集を、可視分光光度計による濁度や、酵素の残存活性、円偏光二色性、蛍光分光法を用いて調べた。

4. 研究成果

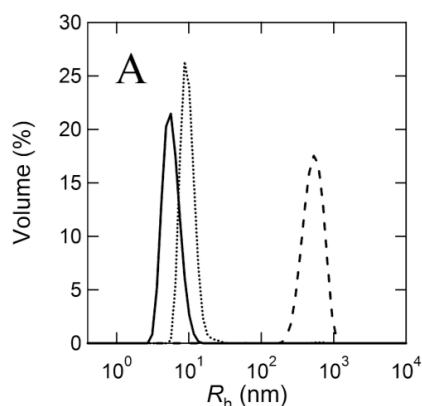
ポリエチレングリコールによるタンパク質の加熱凝集への効果を調べた。その結果、ポリエチレングリコールはアルギニン塩酸塩と加算的な凝集抑制効果を示すことがわかった (Biotechnol. Bioeng. 109, 2543-2542 (2012))。4つのエチレン基からなるテトラエチレングリコールは高温ほど凝集抑制能が高く、これまでに知られていた低分子凝集抑制剤のアルギニンとは異なっていること (Biotechnol. Prog. 29, 1325-1330 (2013)) がわかった。一連の結果は、高分子アディティブを用いる凝集抑制剤のデザインのガイドラインになるだろう。



図：それぞれの温度で加熱したときの熱凝集の一次反応速度定数。何も加えないときや1Mの塩化ナトリウムを加えたときと比べて、同じ濃度のアルギニンやテトラエチレングリコールを加えると凝集をよく抑制するが、テトラエチレングリコールは高温ほど効果が高まり75°Cでアルギニン以上の効果を示し

た。高温ほど凝集抑制効果が高くなる添加剤のデザインの指標になる (Biotechnol. Prog. 29, 1325-1330 (2013)より)。

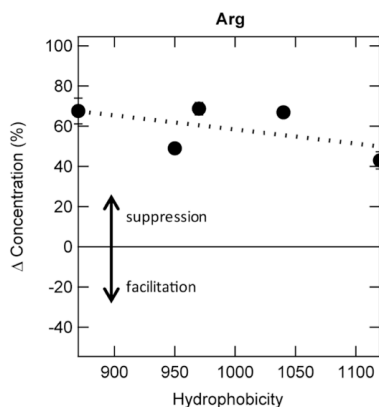
これまでに、酵素・ポリマー複合体をポリアリルアミンで形成させたとき、アミラーゼや β ガラクトシターゼなどの不安定な酵素は凝集を作ってしまうことがわかってきた。そこで、ポリエチレングリコールを持つカチオン性ポリマーの PEAMA-b-PEG を用いて調べたところ、大きな凝集しやすいタンパク質であっても、凝集させずに複合体を形成させることができることがわかった。この可溶性にある酵素・ポリマー複合体で酵素は変性していなかった。ポリアクリル酸を添加することで、活性のあるタンパク質を回収することにも成功した (Langmuir 28, 4334-4338 (2012))。



図：高分子電解質とタンパク質の複合体の流体力学直径。実線は α アミラーゼのみ、点線は α アミラーゼと PEAMA-b-PEG の複合体、破線は α アミラーゼとポリアリルアミンの複合体。 α アミラーゼは PAA と複合体を形成すると凝集してしまうが、PEAMA-b-PEG と可溶性の凝集体を形成することがわかった (Langmuir 28, 4334-4338 (2012)より)。

タンパク質のバルク中での凝集および高分子との結合のほか、表面での構造安定性も調べた。脂質二重膜と繊維状タンパク質であるアミロイドと、スタートアグリゲートと呼ばれる数十ナノメートルの大きさのタンパク質凝集体は、いずれも脂質二重膜と結合して破壊する性質があることがわかった (Langmuir 28, 3887-3895 (2012))。ナノスケールの粒子に毒性があることの物理的根拠になると考え、今後の研究につなげたい発見である。また、タンパク質は容器などの固体表面にも結合する。ポリスチレン固体表面への吸着や、吸着にともなうタンパク質の失活は、アルギニン数を数百 mM 加えておくこと

によって結合がかなり防ぐことができることがわかった (PLoS One 8(8): e70762 (2013))。タンパク質の等電点や性質が違っていてもアルギニンで抑制できた。これは、アルギニンは芳香環とカチオン・パイ相互作用するからだろうと考えられる (J. Phys. Chem. B 117, 7518-7528 (2013))。



図：等電点や大きさの異なる 5 種類のタンパク質は、いずれもポリスチレン表面に吸着する性質を持つが、0.5 M のアルギニンを添加するといずれも抑制できることがわかった。高分子とタンパク質の相互作用を低分子量のアルギニンが抑制するという新しい応用例の報告である (PLoS One 8(8): e70762 (2013)より)。

高分子とタンパク質との関連を調べた一連の研究の中で、タンパク質と添加剤のチオフィリックインタラクションを活かすことで、タンパク質と溶質の相互作用が可能なこと (Physical Chemistry Chemical Physics 16, 3566 - 3572 (2014))、アルコールはタンパク質を凝集させること (Int. J. Biological Macromolecules. 62, 647-651 (2013))、活性酸素種などによる化学劣化 (Applied Physics Letters, 104, 023701 (2014)) にも留意する必要があることなどがわかってきた。これらの成果は、高分子・タンパク質複合体の本研究から派生した、応用の可能性のある新しい発見であった。

結論として、まず、高分子アディティブとなるポリアリルアミンやポリアクリル酸、ポリエチレングリコール、PEG 化高分子を対象に、タンパク質との結合や吸着を定量した。その結果、高温ほど効果が高まる添加剤の構造が明らかになった。このように、当初の目的であるタンパク質の凝集や失活を、バルク溶液中で精査することができたほかに、固体表面やリポソーム膜への結合の機構を明ら

かにした。したがって、当初の目標を達成し、さらにその結果を踏まえて今後の研究課題につながる発見もあったと考えられる。

一連の成果によって、今後の高分子アディティブの応用や、さらなる性質を持った高分子アディティブの開発に活かされる結果になったと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) Eisuke Takai, Ken Uda, Tomonori Yoshida, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Kentaro Shiraki, Cysteine Inhibits the Fibrillisation and Cytotoxicity of Amyloid-beta 40 and 42: Implications for the Contribution of the Thiophilic Interaction, *Physical Chemistry Chemical Physics* 16, 3566 - 3572 (2014)
査読あり、DOI: 10.1039/C3CP54245A

(2) Eisuke Takai, Gai Ohashi, Tomonori Yoshida, Karin Margareta Sorgjerd, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Katsuhisa Kitano, Kentaro Shiraki, Degeneration of Amyloid-beta Fibrils Caused by Exposure to Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma in Aqueous Solution, *Applied Physics Letters*, 104, 023701 (2014)
査読あり、DOI: 10.1063/1.4861842

(3) Atsushi Hirano, Tomoshi Kameda, Daisuke Shinozaki, Tsutomu Arakawa, Kentaro Shiraki, Molecular Dynamics Simulation of Arginine-Assisted Solubilization of Caffeic Acid: Intervention in the Interaction. *J. Phys. Chem. B* 117, 7518-7528 (2013)
査読あり、DOI: 10.1021/jp401609p

(4) Yui Shikiya, Shunsuke Tomita, Tsutomu Arakawa, and Kentaro Shiraki. Arginine inhibits proteins adsorption on polystyrene surface. *PLoS One* 8(8): e70762 (2013)
査読あり、DOI: 10.1371/journal.pone.0070762

(5) Shunsuke Tomita, Yumiko Tanabe, and Kentaro Shiraki. Oligoethylene glycols prevent thermal aggregation of alpha-chymotrypsin in a temperature-dependent manner: implications for design guidelines. *Biotechnol. Prog.* 29, 1325-1330 (2013)
査読あり、DOI: 10.1002/btpr.1762

(6) Eisuke Takai, Shunsuke Yoshizawa, Daisuke Ejima, Tsutomu Arakawa, and Kentaro Shiraki. Synergistic Solubilization of Porcine Myosin in Physiological Salt Solution by Arginine. *Int. J.*

Biological Macromolecules. 62, 647-651 (2013)
査読あり、DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.035

(7) Hiroki Yoshikawa, Atsushi Hirano, Tsutomu Arakawa, and Kentaro Shiraki. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. *Int. J. Biological Macromolecules* 50, 865-871 (2012)
査読あり、DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.11.005

(8) Atsushi Hirano, Hiroki Yoshikawa, Shuhei Matsushita, Yoichi Yamada, and Kentaro Shiraki. Adsorption and disruption of lipid bilayers by nanoscale protein aggregates. *Langmuir* 28, 3887-3895 (2012)
査読あり、DOI: 10.1021/la204717c

(9) Takaaki Kurinamaru, Shunsuke Tomita, Shinpei Kudo, Sumon Ganguli, Yukio Nagasaki, and Kentaro Shiraki. Improved Complementary Polymer Pair System: Switching for Enzyme Activity by PEGylated Polymers. *Langmuir* 28, 4334-4338 (2012)
査読あり、DOI: 10.1021/la2043312

(10) Shunsuke Tomita, Yukio Nagasaki, and Kentaro Shiraki. Different mechanisms of action of poly(ethylene glycol) and arginine on thermal inactivation of proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 2543-2542 (2012)
査読あり、DOI: 10.1002/bit.24531

[学会発表] (計 9 件)

(1) 志喜屋惟、富田峻介、白木賢太郎。ポリスチレン表面へのタンパク質の吸着とアルギニンによる吸着の抑制。第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場、2012. 12. 14-16

(2) 栗之丸隆章、富田峻介、白木賢太郎。第 12 回日本蛋白質科学会年会。高分子電解質を利用した a-キモトリプシン超活性化系の作成。第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012. 6. 20-22

(3) 田邊裕美子、富田峻介、白木賢太郎。オリゴエチレングリコール誘導体によるタンパク質凝集の抑制。高分子討論会第 26 回高分子学会関東支部茨城地区若手の会交流会、つくばみらい市、2011. 11. 21-22

[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〕
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者
白木 賢太郎 (SHIRAKI, Kentaro)
筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：90334797