

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750120

研究課題名(和文) タンパク質の安定溶解とリフォールディングを可能にする水和イオン液体の創成

研究課題名(英文) Hydrated ionic liquid for dissolution and refolding of proteins

研究代表者

藤田 恭子 (FUJITA, Kyoko)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90447508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：コリニウムカチオンとリン酸二水素アニオンからなるイオン液体([ch][dhp])を用いて、水の添加量を変化させながら解析を行ったところ、水分子はイオンと強く相互作用して結合水として存在することが明らかとなった。さらに、この水和[ch][dhp]中に各種タンパク質や核酸塩基は溶解可能であり、buffer中と同様の高次構造を保持していることが明らかとなった。水和[ch][dhp]中に溶解した生体分子の活性評価を行ったところ、水和[ch][dhp]中でも活性を示し、電極反応としての検出も可能であった。水和[ch][dhp]を用いることで、応答の耐熱性や経時安定性の向上が確認された。

研究成果の概要(英文)：Physicochemical property of hydrated ionic liquid which is composed by cholinium cation ([ch]) and phosphate anion ([dhp]) has been analyzed with changing the water contents. The water molecules were interacted with ions strongly and existed as bound water. Proteins and nucleobase pairs were dissolved in hydrated [ch][dhp] with remained the higher ordered structure. Furthermore, the activity of dissolved biomolecules in hydrated [ch][dhp] were observed by spectroscopically and electrochemically. Furthermore, thermal stability and long term stability of the responses has been improved in hydrated [ch][dhp].

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：イオン液体 生体高分子

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は至適条件下でのみ優れた機能を示すが、*in vitro* での安定性は低く、凝集などを生じ活性を失う。また、異種発現時における凝集、不活性化も大きな問題である。この問題を解決し、タンパク質をより安定に取り扱うことが可能な方法の確立が求められている。1つのアプローチとして、非水溶媒中でタンパク質を取り扱うことによる安定性の向上についての検討などが進められてきたが、扱えるタンパク質の制限や、溶媒の性質により汎用には至っていない。

2. 研究の目的

タンパク質を安定に溶解可能な新規溶媒の開発を目指し、室温で液体の塩であるイオン液体にわずかな水を添加した「水和イオン液体」を用いた検討を行う。イオン構造のデザインおよび特性評価を行いながら、タンパク質の安定性の改善を実現する水和イオン液体を提案する。具体的には、(1)水和イオン液体中の水の存在状態について解析を行う。(2)タンパク質の溶解性や高次構造に及ぼす影響を把握する。また、(3)溶媒として用いることで、タンパク質など様々な生体分子の安定な取り扱いを実現する水和イオン液体の設計を行う。

3. 研究の方法

イオンの水の構造形成能を示すコスモトロピシティの順列を参考にしてイオン構造を選択し、イオンペアに対して水分子の数を変化させながら水和イオン液体を調整した。調整した水和イオン液体について、DSC測定、水分活性測定、誘電分光測定等を用いて評価を行った。

水和イオン液体中に各種タンパク質や、核酸塩基など生体分子の溶解性について検討した。さらに溶解したものについては、高次構造について分光学的な手法を用いて解析を行った。

水和イオン液体中に溶解したタンパク質の活性について、分光学的あるいは電気化学的な手法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1)水和イオン液体中の水の状況に及ぼすイオン構造と含水率の影響

コスモトロピシティの順列を参考にしてアニオンの構造の選択を行った。カチオンはイオン液体の合成で一般的に用いられるイオン構造を用いて進めた。得られたイオン液体に対して系内に存在する水分子数を制御しながら添加して水和イオン液体を調整した。各種水和イオン液体について、水分活性測定を行ったところイオン構造に関わらず、1イオンペアに対する水分子の数の増加に伴い、水分活性値が増大し、1イオンペアに対して7分子程度の水が存在する状況を境に水分活性値は一定となる傾向が示された。同一

の水分子数が存在した場合、よりコスモトロピックなイオンほど水分活性値は低く、カオトロピックなイオンほど水分活性値は高くなることが確認された。

さらに、1イオンペアに対する水分子の量を変化させた水和イオン液体についてDSC測定を行った。その結果、カチオンにコリニウムイオン、アニオンにリン酸二水素イオンを持つイオン液体([ch][dhp])とその類似構造からなるイオン液体で、低温からの昇温過程で水の再結晶化に基づくコールドクリスタリゼーション(CC)が観測されるモル比が存在することが明らかとなった。CCは、生体適合性を示す高分子が含水している際にも観測されており、バルク状態の水ではなく、結合水が示す挙動であることが報告されている。イオン液体の構造と含水率によっては、このようなCCを示す水が存在する状態を形成していることが明らかとなった(発表論文, 図1)。

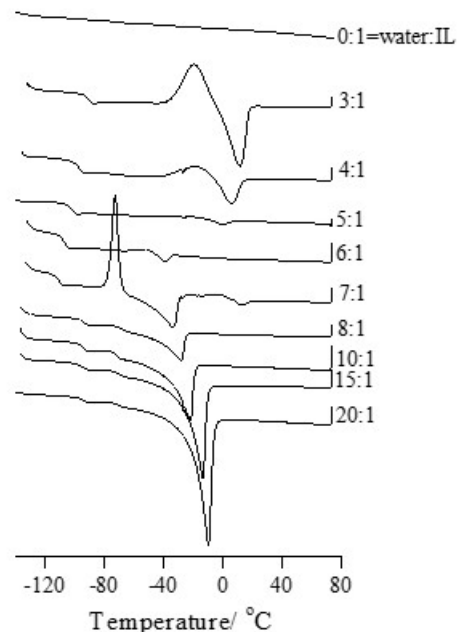


図1 水和[ch][dhp]のDSCカーブ

また、水和[ch][dhp]の誘電緩和過程を議論するため、フィッティングを使って誘電緩和スペクトルのカーブフィットを行ったところ、水分子とイオンが強く相互作用した共同運動が示唆された。つまり、系内では水分子とイオンが強く相互作用し、大きな動的液体構造が形成され、液体の構造の揺らぎが大きくなっていると考えられる(学会発表)。

(2)水和イオン液体中への生体分子の溶解と高次構造の解析

自由水が存在しない1イオンペアに対して3分子程度の水が存在する水和イオン液体を用いて、タンパク質や核酸塩基の溶解と溶解後の構造について検討を行った。その結果、水和[ch][dhp]中に各種タンパク質や核酸塩基が溶解可能であり、さらに溶解後もbuffer

中と類似の高次構造を保持していることを報告した(発表論文)。

また、グアニジンリッチな配列により四重鎖構造を形成する核酸配列をサンプルとして用いて水和イオン液体中への溶解性と溶解後の構造について解析を行ったところ、イオン液体の構造によって、構造形成への影響が異なることが明らかとなった。自由水が存在しないような含水率では、[ch][dhp]と、[ch]と[dhp]を共有結合で結んだ双性イオンであるホスホコリンからなる水和イオン液体中では四重鎖構造の形成が確認できたものの、その他の系では構造形成は確認されなかった。また、水和イオン液体中の含水率が高く、自由水が存在するような系においては、四重鎖構造の形成は特定のイオンではなく、イオンのコスモトロピシティと相関があることが明らかとなった(発表論文)。

(3)水和イオン液体中に溶解した生体分子の活性評価

水和[ch][dhp]を中心として、水和イオン液体中に溶解したタンパク質や核酸配列の活性や構造安定性について評価を行った。

水和[ch][dhp]中に溶解した核酸配列の四重鎖構造の構造安定性について検討を行ったところ、水溶液中と同様の融点と金属イオンの添加による構造安定化が観測された。

また、水和イオン液体中において、タンパク質の電子伝達反応が可能であることを以前に報告したので、この反応について電気化学的な検出を試みた。電極上にセロピオースデヒドロゲナーゼ、およびフルクトースデヒドロゲナーゼを固定化した。それぞれの電極に対して、基質を添加して電極応答を観測した。その結果、基質添加により酵素反応の進行を示す電極応答が検出された(図2)。この応答は基質の濃度に比例することも確認された。また、水和[ch][dhp]中に保存した酵素固定化電極は水中で保存した場合に比べて安定であり、長期間にわたって電極応答が観測されることが示された(発表論文)。

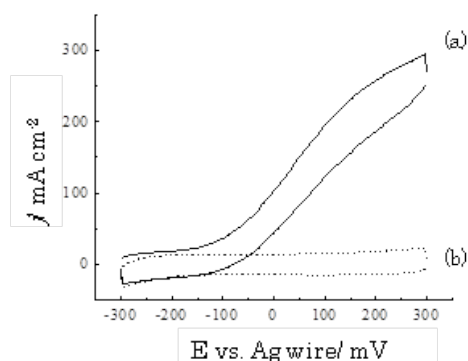


図2 電極上に固定化されたフルクトースデヒドロゲナーゼの水和イオン液体中での電極応答 (a)フルクトース添加あり、(b)添加なし

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8件)

Y.Nikawa, K.Fujita, K.Noguchi, H.Ohno, 2-(Trimethylazaniumyl)ethyl hydrogen phosphate (phosphocholine) monohydrate, *Acta Cryst.E*, 査読有, E70, 2014, o549

DOI:10.1107/S160053681400779X

K.Fujita, N.Nikawa, H.Ohno, Cold crystallisation behaviour of water molecules in ionic liquids as a screening method to evaluate biocompatibility of the hydrated ionic liquids, *Chem.Commun.*, 査読有, 49, 2013, 3257-3259

DOI:10.1039/c3cc39033k

K.Fujita, D.Kobayashi, N.Nakamura, H.Ohno, Direct dissolution of wet and saliferous marine microalgae by polar ionic liquids without heating, *Enzyme and Microbial Technology*, 査読有, 52, 2013, 199-202

DOI:10.1016/j.enzmictec.2012.12.004

T.Hoshino, K.Fujita, A.Higashi, K.Sakiyama, H.Ohno, K.Morishima,

Contracting cardiomyocytes in hydrophobic room-temperature ionic liquid, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 査読有, 427, 2012, 379-384

DOI:10.1016/j.bbrc.2012.09.068

K.Fujita, H.Ohno, Stable G-Quadruplex Structure in a Hydrated Ion Pair:Cholinium Cation and Dihydrogen Phosphate Anion, *Chem. Commun.*, 査読有, 48, 2012, 5751-5753

DOI:10.1039/C2CC30554B

K.Fujita, K.Murata, M.Masuda, N.Nakamura, H.Ohno, Ionic liquids designed for advanced applications in bioelectrochemistry, *RSC.Adv.*, 査読有, 2, 2012, 4018-4030

DOI:10.1039/C2RA01045C

藤田恭子、田村薫、大野弘幸、タンパク質を未変性で溶解できるイオン液体の設計、*ファインケミカル*、査読無、40、2011、31-36

K.Fujita, N.Nakamura, K.Murata, K.Igarashi, M.Samejima, H.Ohno, Electrochemical analysis of electrode-immobilized dehydrogenases in hydrated choline dihydrogen phosphate-type ionic liquid, *Electrochimica Acta*, 査読有, 56, 2011, 7224-7227

DOI:10.1002/elan.201100215

[学会発表](計 8件)

梶山万悠子、藤田恭子、劉遠、中村暢文、大野弘幸、イオン液体を用いた不溶化セルラーゼの溶解とリフォールディング、日本化学会第94春季年会、2014年3月

30 日、名古屋大学

K.Fujita, H.Ohno, Hydration state of choline dihydrogen phosphate and analogous ionic liquids, Post-symposium on Ionic Liquids from Science to Green Chemical Applications, 13 July 2013, Tokyo, Japan.

K.Fujita, Y.Nikawa, H.Ohno, Cold crystallization behavior of co-existed water molecules observed in dihydrogen phosphate analogs, 5th International Congress on Ionic Liquids, 22 April 2013, Vilamoura, Portugal

K.Fujita, H.Ohno, G-quadruplex formation in hydrated ionic liquids, 5th International Congress on Ionic Liquids, 22 April 2013, Vilamoura, Portugal

藤田恭子、大野弘幸、コリニウムリン酸二水素を基本構造とする水和イオン液体の解析とタンパク質溶媒としての評価、第62回高分子討論会、2013年9月12日、金沢大学、

藤田恭子、澤田拓也、喜多理王、新屋敷直木、八木原晋、大野弘幸、誘電分光法による水和イオン液体の分子ダイナミクス評価、イオン液体研究会、2012年12月7日、沖縄県男女共同参画センター「ていいる」

藤田恭子、大野弘幸、水和イオン液体中での DNA 四重鎖構造形成の検討、第2回イオン液体討論会、2011年12月17日、キャンパスプラザ京都、

K.Fujita, H.Ohno, Effectiveness of hydrated ionic liquid composed of choline cation and dihydrogen phosphate anion as a medium for biomolecules, The 4th International Congress on Ionic Liquids(COIL-4), 17 June 2011, Hilton crystal city, Washington DC

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

該当なし

○取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~ohno/index.html> (大野研ホームページ内)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 恭子 (FUJITA, Kyoko)

東京農工大学・大学院工学研究院・講師

研究者番号：90447508