

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750172

研究課題名(和文) タンパク質コロナと生体分子の相互作用の解明

研究課題名(英文) Investigation of the interaction between protein coronas and biomolecules

研究代表者

平野 篤(Hirano, Atsushi)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・研究員

研究者番号：90613547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に取り込まれたナノ粒子はタンパク質と相互作用して「タンパク質コロナ」と呼ばれる複合体構造を形成することが知られている。安全なナノ粒子の開発にはタンパク質コロナの物性の解明が必須である。当該研究ではカーボンナノチューブおよび荷電性のホモポリペプチドをそれぞれナノ粒子とタンパク質のモデルとして利用し、タンパク質コロナの形成に関する基礎知見を得た。特にポリアルギニンがカーボンナノチューブへ強く結合するという知見は、ナノカーボン材料のタンパク質コロナ形成におけるアルギニン残基の重要性を示唆するものであり、芳香環を有するナノ粒子全般におけるタンパク質コロナの形成機構の理解にもつながる成果となった。

研究成果の概要(英文)：The protein layers around colloidal nanoparticles, known as "protein corona", are formed when they are taken in living systems. The mechanism of the protein corona formation should be elucidated for safe development of the nanoparticles. In this study, protein corona formation mechanism was investigated using carbon nanotubes and charged homopolypeptides as models of nanoparticles and proteins, respectively. It was found that polyarginines were strongly bound to the carbon nanotubes, which suggests that arginine residues of proteins have a critical role in the protein corona formation of carbon nanotubes. The mechanistic insights can also be applied to other nanoparticles with aromatic moieties.

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：ナノ材料 蛋白質 生体分子

1. 研究開始当初の背景

材料開発において安全性評価が後手に回することは、材料開発に対する社会的懸念を生む要因となる。ナノ粒子の応用開発も例外ではない。現在、ナノ粒子の安全性を評価する細胞・動物実験が進められているが、その根本原理である分子機構は未解明である。分子機構の解明は、既存のナノ粒子の安全性の理解だけでなく、新規ナノ粒子の安全開発につながる重要な課題である。近年、生体内に取り込まれたナノ粒子はタンパク質と相互作用して「タンパク質コロナ」と呼ばれる複合体構造を形成することが知られるようになった。タンパク質コロナの物性を明らかにすることが安全なナノ粒子開発につながることを期待されている。

2. 研究の目的

本研究ではカーボンナノチューブとホモポリペプチドをそれぞれナノ粒子とタンパク質のモデルとして用いることで、タンパク質コロナの形成機構、特にカーボンナノチューブとホモポリペプチドの相互作用に関する基礎知見を得ることを目的とした。カーボンナノチューブは1991年の発見以来、ナノテクノロジーにおける次世代の材料として研究開発が進められているナノ粒子である。ホモポリペプチドは一種のアミノ酸からなるポリペプチドであり、タンパク質に比べてナノ粒子との相互作用の解析が容易である。研究のアプローチとしては、ホモポリペプチド溶液中におけるカーボンナノチューブの分散性の評価や分子動力学計算を行うことでカーボンナノチューブとホモポリペプチドの相互作用を明らかにし、カーボンナノチューブとホモポリペプチドによる蛋白質コロナ形成機構の理解を目指した。

3. 研究の方法

(1)カーボンナノチューブの分散

カーボンナノチューブの分散処理には超音波照射と遠心分離を利用した。用いたポリペプチドはポリアルギニン(PLA)とポリリシン(PLL)である。0.2または1.0 mg/mLのポリペプチド溶液へ濃度が0.2 mg/mLになるようにカーボンナノチューブの粉末を添加し、得られた溶液に対して20 W/cm²の出力密度で0.5時間超音波照射した後、210,000 gで0.5時間遠心分離を施した。上澄み液の70%をカーボンナノチューブの分散液として採取した。

(2)分散性の評価

カーボンナノチューブの分散性の評価にはカーボンナノチューブの分散溶液の吸光度測定と蛍光スペクトル測定を利用した。カーボンナノチューブの分散液の紫外領域の吸光度からカーボンナノチューブの濃度を定量し、蛍光スペクトルから分散溶液中に含まれるカーボンナノチューブのカイラリティの同定を行った。

(3)分子動力学計算

カーボンナノチューブとポリペプチドの相互作用を理解するために分子動力学計算(GROMACS 4.5.5)を利用した。用いたカーボンナノチューブのカイラリティと長さはそれぞれ(7,6)および4.6 nmである。ポリペプチドのモデルとして、残基数15のオリゴアルギニンとオリゴリシンを利用した。

4. 研究成果

(1)ポリペプチドを用いたカーボンナノチューブの分散

PLAおよびPLL溶液中でカーボンナノチューブの分散処理(超音波照射と遠心分離)を行った結果、各上澄み溶液から図1Aに示すようなカーボンナノチューブの分散量が吸光度測定から定量された。PLAとPLLを比較したところ、PLAの方がカーボンナノチューブに対する高い分散力を示した。いずれのポリペプチドにおいても、分子量が大きいほどカーボンナノチューブに対する分散力が強まることが明らかになった。残基数が5,10,20のオリゴペプチドを用いて同様の実験を行ったところ、図1Bに示すように、残基数が大きいポリペプチドほど分散力が強いことが確認された。特筆すべきは、5残基のオリゴアルギニンでもわずかな分散性を保持した点である。以上の結果から、PLAがカーボンナノチューブに対する高い親和性を有することが示唆された。

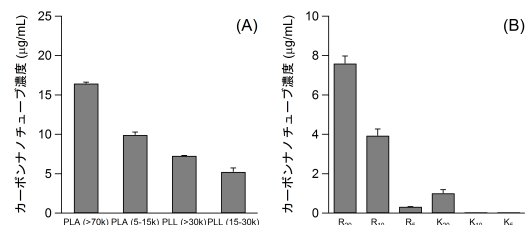


図1 (A)ポリペプチド溶液中におけるカーボンナノチューブの分散量。横軸ラベルの括弧内の数値は各ポリペプチドの分子量分布を示している。(B)オリゴペプチド溶液中におけるカーボンナノチューブの分散量。RとKはそれぞれアルギニンとリシンを意味し、添字は残基数を示している。

(2)カーボンナノチューブの蛍光スペクトル測定

孤立分散したカーボンナノチューブは特有の蛍光スペクトルを近赤外領域に示す。カーボンナノチューブに対するポリペプチドの分散効果を調べるためにPLA(>70k)とPLL(>30k)で分散させたカーボンナノチューブの蛍光スペクトルを測定した。図2に見られる各ピークはカーボンナノチューブの各カイラリティに対応している。全体的なスペクトルの形はPLA(>70k)とPLL(>30k)で大きな違いはなく、これらのポリペプチドにはカーボンナノチューブの分散におけるカイラ

リティの選択性は観察されなかった。しかしながら、PLA(>70k)で分散させたカーボンナノチューブの蛍光スペクトルのピーク位置はPLL(>30k)に比べてわずかに長波長にシフトした。ピーク位置の違いはカーボンナノチューブと相互作用するPLAおよびPLLの局所的な誘電率の違いに起因すると考えられる。

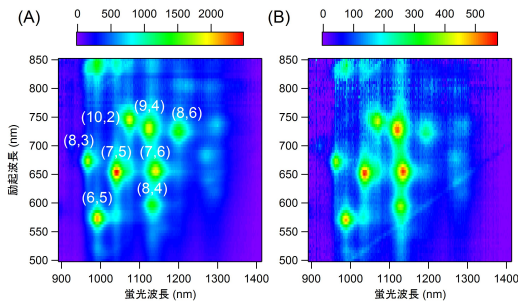


図2 PLA(>70k)(A)とPLL(>30k)(B)で分散させたカーボンナノチューブの蛍光スペクトル。

(3)カーボンナノチューブとオリゴペプチドの相互作用の分子動力学計算

(7,6)のカイラリティのカーボンナノチューブとオリゴペプチド(R_{15} と K_{15})の相互作用を分子動力学計算で調べた。(7,6)は実験試料に含まれるカーボンナノチューブのカイラリティの中でも主要なカイラリティの一つである(図2)。分子動力学計算の結果、 R_{15} と K_{15} の両方のオリゴペプチドにおいて、主鎖だけでなく側鎖もカーボンナノチューブと相互作用することが明らかになった(図3)。これらのオリゴペプチドをカーボンナノチューブから引き剥がすために必要な最小限の力を計算したところ、 R_{15} では200-225 pNであり、 K_{15} では100-125 pNであった。以上の結果から、 R_{15} が K_{15} よりも強くカーボンナノチューブに結合することが計算結果からも支持された。

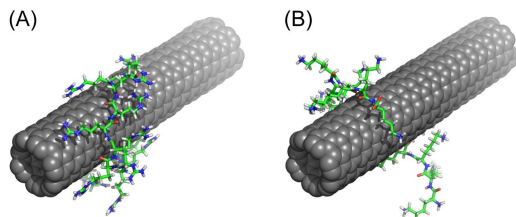


図3 カーボンナノチューブと相互作用する R_{15} (A)と K_{15} (B)の構造。

(4)カーボンナノチューブと相互作用するオリゴペプチドの動径分布関数

カーボンナノチューブとオリゴペプチドの側鎖の各官能基の相互作用を理解するために、図4に示すようにオリゴペプチドの側鎖の代表的な原子の動径分布関数を計算した。興味深いことに、 R_{15} の側鎖の末端のグアニジニウム基の位置に対応する C_{β} がカーボンナノチューブに最も近接することが示され、グアニジニウム基がカーボンナノチューブと強

く相互作用することが示唆された。このような相互作用はカーボンナノチューブとリゾチームなどのタンパク質の相互作用に関する分子動力学計算でも示されている。一方、 K_{15} では側鎖のアルキル鎖に対応する C_{β} 、 C_{γ} 、 C_{δ} がカーボンナノチューブに近接しており、アルキル鎖がカーボンナノチューブと相互作用することが示唆された。末端(N_{ϵ})がカーボンナノチューブの表面から離れた距離に位置する点は R_{15} とは対照的であり、 R_{15} と K_{15} の特徴的な違いといえる。

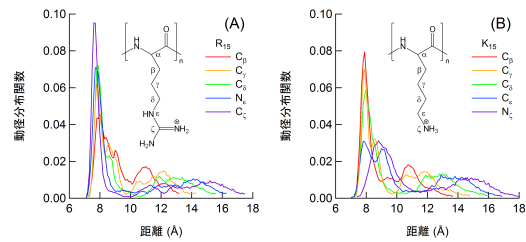


図4 カーボンナノチューブと相互作用する R_{15} (A)と K_{15} (B)の側鎖の代表的な原子の動径分布関数。

(5)カーボンナノチューブとグアニジニウム基の相互作用のメカニズム

カーボンナノチューブとタンパク質の相互作用に関するこれまでの研究において、アルギニン残基がカーボンナノチューブと相互作用することが主にシミュレーションで示されている。しかし、カーボンナノチューブとPLAの相互作用を実験と分子動力学計算の両者から調べた例はなかった。カーボンナノチューブの表面は疎水性であり、このような表面物性がカーボンナノチューブとPLAの相互作用に寄与していると考えられる。アルギニンのグアニジニウム基と類似の化合物であるグアニジンは平面構造を有する分子であり、水中ではグアニジン分子の面上は疎水性を示すことが報告されている。したがって、アルギニンのグアニジニウム基はカーボンナノチューブと疎水性相互作用すると考えることができる。また、カーボンナノチューブとグアニジニウム基はいずれも電子を有しており、 π - π 相互作用も関与していることが想定される。

(6)タンパク質コロナ形成に関する知見

一般にカーボンナノチューブとタンパク質の相互作用には疎水性相互作用、ファンデルワールス力、静電相互作用、 π - π 相互作用が関与していると考えられている。これらの相互作用の中で、アルギニン残基においては上述のように疎水性相互作用や π - π 相互作用が中心的役割を担っていると考えられる。実際に、リゾチームやヒストンなどのアルギニン残基に富むタンパク質がカーボンナノチューブに対する高い分散性を示すことが報告されている。当該研究によって明らかになったアルギニンのこのような性質はカー

ボンナノチューブに限られるものではなく、グラフェンやフラーレンなどの他のカーボンナノ材料にも適用可能であると考えられる。つまり、芳香環を有するナノ粒子のタンパク質コロナの形成機構を理解するためには、タンパク質の疎水性領域だけでなく、アルギニン残基の関与も無視できないと考えられる。当該研究結果は、ナノ粒子の中でもとりわけ芳香環を有するナノ粒子のタンパク質コロナの形成機構の理解につながる成果であり、それらの安全性評価に有用な知見をもたらした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

平野 篤、田中 丈土、片浦 弘道、亀田 倫史、Chemistry - A European Journal、査読有、20 巻、2014、4922 - 4930
DOI: 10.1002/chem.201400003

〔学会発表〕(計3件)

平野 篤、田中 丈土、片浦 弘道、亀田 倫史、ポリアルギニンをういたカーボンナノチューブの分散 / Polyarginine as a Dispersant for Carbon Nanotubes、第14回日本蛋白質科学会年会、2014年6月25日~2014年6月27日、ワークピア横浜 / 横浜産貿ホール マリネリア(神奈川)

亀田 倫史、平野 篤、田中 丈土、片浦 弘道、ポリペプチドによるカーボンナノチューブの可溶化プロセス / Solubilization of carbon nanotube by polypeptide、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日~2013年6月14日、とりぎん文化会館(鳥取)

平野 篤、亀田 倫史、田中 丈土、片浦 弘道、カーボンナノチューブとホモポリペプチドの相互作用 / Interaction of carbon nanotubes with homopolypeptides、第44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、2013年3月11日~2013年3月13日、東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール (東京)

〔その他〕

ホームページ等

<https://staff.aist.go.jp/hirano-a/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 篤 (HIRANO, Atsushi)

(独)産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・研究員

研究者番号：90613547