

# カーボンナノチューブカラムを用いた光制御可能な蛋白質分離法

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ナノ炭素材料研究グループ

平野 篤

## 要旨

当該研究ではカーボンナノチューブ(CNT)をリガンドとするカラムを創製し、光照射で蛋白質を分離・精製する手法「CNTカラムクロマトグラフィ」の開発を目指す。当該研究期間内ではカラムに充填する担体(CNT担体)の作製とCNT担体への蛋白質吸着の観測を重点的に行なった。加えて、CNT担体への蛋白質の吸着機構を明らかにするために、ホモポリペプチドを用いたCNTの分散実験を行った。

## 1. 背景と目的

蛋白質を利用したバイオ医薬品は、ターゲットに対する高い特異性をもち、副作用も少ないため、従来の低分子の医薬品では困難な病気の治療やその高い効能が期待されている。しかしながら、従来の蛋白質分離法では溶出液などのストレスにより蛋白質の凝集が生じることがあり、蛋白質の安定性に関する問題が存在する。当該研究ではCNTをリガンドとする担体(CNT担体)を充填させたカラムを作製し、蛋白質の新規のカラムクロマトグラフィを行うことを目的とする。CNTは光応答性を有しており、可視光の照射によって表面物性(荷電状態)が変わるため、CNT担体を用いれば、光で蛋白質の溶出を制御でき、温和な環境で蛋白質を分離できると期待される。当該研究期間内ではCNT担体の作製とCNT担体に対する蛋白質の吸着反応の観測を行った。

## 2. 結果と考察

超音波照射で*N*-メチル-2-ピロリドンに分散させたCNTをアミノ基を有するシリカゲル(NH<sub>2</sub>-シリカゲル)の担体と混合することによってCNT担体を作製した。モデル蛋白質として用いた1 mg/mLのリゾチームとCNT担体を混合し、遠心分離した後に上清(未吸着画分)の吸収スペクトル測定を行うことで、未吸着のリゾチーム量を定量した。図1には添加剤無添加および塩化ナトリウムまたは尿素を添加した際に未吸着画分に残存したリゾチームの吸収スペクトルを示した。塩化ナトリウムを添加するとスペクトル強度が低下する一方で、尿素を添加するとスペクトル強度が増加した。これらの結果は、塩化ナトリウムの添加によってCNT担体へのリゾチームの吸着量が増加し、尿素の添加によって吸着量が低下したことを示している。NH<sub>2</sub>-シリカゲルは中性条件では正に荷電しており、リゾチームも正電荷を有している。したがって、塩化ナトリウムによる吸着量の増加はCNT担体とリゾチームの間の静電遮蔽効果による静電反発力の低下に起因すると考えられる。一方で、尿素は疎水性相互作用を低下させる性質があるた

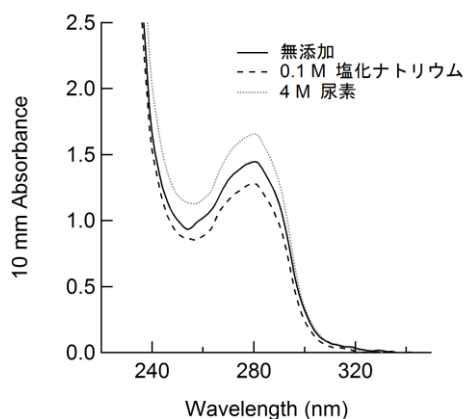


図1. 未吸着画分に存在するリゾチームの吸収スペクトル。

め、尿素によるリゾチームの吸着量の低下は CNT とリゾチームの間の疎水性相互作用の低下に起因すると考えられる。

リゾチームは塩基性タンパク質であり、アルギニン残基を豊富に含有している。これらのアルギニン残基の多くはリゾチームの表面に存在するため、リゾチームと CNT の相互作用には疎水性アミノ酸残基だけでなく、アルギニン残基も寄与すると考えられる。そこで、アルギニン残基と CNT の相互作用を検証するために、ポリアルギニンを用いた CNT の分散性の評価を行った。対照実験にはポリリシンを用いた。分散性の評価には分散処理(超音波照射と遠心分離)によって得られた上澄み液の CNT 濃度を使用した。図 2 は 1 mg/mL の各ホモポリペプチドを用いた際の CNT の分散性を示している。ポリリシンに比べてポリアルギニンでは高い CNT の分散性が得られた。これらの結果はアルギニン側鎖末端のグアニジニウム基が CNT との高い親和性を有していることを示している。このようなアルギニンの性質は芳香族性のリガンドを有するカラムクロマトグラフィにおける溶出剤としてのアルギニンの効果からも支持されている。

以上の結果からリゾチームと CNT の相互作用には疎水性アミノ酸残基だけでなくアルギニン残基も関与することが示唆される。加えて、既述のように NH<sub>2</sub>-シリカゲルは正電荷を有するため、CNT 担体へのリゾチームの吸着には荷電性アミノ酸残基も寄与すると考えられる。したがって、CNT 担体は蛋白質の表面物性に依存して様々な形で蛋白質と相互作用するため、CNT 担体を充填させたカラムクロマトグラフィを行うことで表面物性の異なる蛋白質を分離することが可能であると期待される。今後、CNT 担体をカラムへ充填させることにより、蛋白質の分離の実証と光の照射による溶出の検証を行う必要がある。

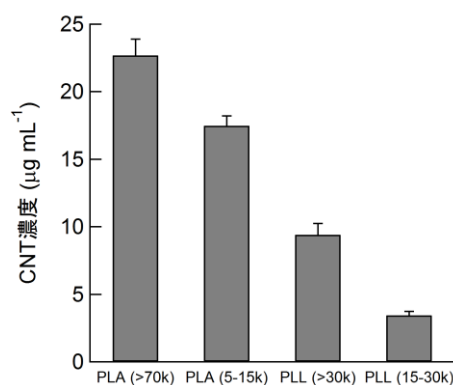


図 2. ポリアルギニンとポリリシン存在下での CNT の分散性。PLA, ポリアルギニン; PLL, ポリリシン。括弧内は分子量分布を示している。

### 3. まとめと今後の課題

NH<sub>2</sub>-シリカゲルに CNT を結合させた CNT 担体を作製し、CNT 担体へのリゾチームの吸着を観測することに成功した。塩化ナトリウムの添加による吸着量の増加はリゾチームと NH<sub>2</sub>-シリカゲルの間に静電相互作用が働くことを示している。一方で、尿素の添加によって吸着量が低下したことはリゾチームと CNT の間に疎水性相互作用が働くことを示している。ポリアルギニンによる CNT の分散実験から、疎水性アミノ酸残基だけでなくアルギニン残基も蛋白質と CNT の相互作用に関与することが明らかになった。今回、CNT 担体への蛋白質の吸着が観測されたことにより、CNT 担体をカラムへ充填することで蛋白質分離のためのクロマトグラフィを行うことができる可能性を開いた。今後は、当該研究の最終目的である光照射による蛋白質の吸着制御を行うために、添加剤の代わりに光照射を行うことで、CNT 担体への蛋白質の吸着力の変化を観測することが課題である。