

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22377

研究課題名(和文)液-液相分離によるタンパク質安定化技術の開発

研究課題名(英文)Stabilization method of proteins by liquid-liquid phase separation

研究代表者

白木 賢太郎(Shiraki, Kentaro)

筑波大学・数理解析系・教授

研究者番号：90334797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質はポリマーとともに液-液相分離して形成したドロプレットを形成させることができる。本研究課題は、抗体(IgG)を対象に、ドロプレットをふたたび分散できる方法の確立を目的とした。ポリグルタミン酸とIgGを対象に、タンパク質高分子電解質複合体(PPC)の可溶性と凝集性がどのように異なるのかを調べた。その結果、透明なタンパク質高分子電解質複合体(S-PPC)と、白濁した状態のタンパク質高分子電解質複合体(A-PPC)にわかれることがわかった。興味深いことに、ポリグルタミン酸を加えない分散した状態と比較し、A-PPCおよびS-PPCは粘度が下がることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の濃縮はバイオ医薬品の開発や応用の鍵となっている。本課題で研究を進めたPPCは、高濃度のタンパク質が含まれているにもかかわらず溶液の粘度がきわめて低い。しかも、イオン強度を上げるだけで、タンパク質をPPCからふたたび分散した状態に戻すこともできる。一連の研究を進めるなかで、超遠心分離する過程でIgGをガラス状に固めることができることを発見した。このガラス状のタンパク質コンデンセートも可逆性がきわめて高く、生理食塩水によって再分散させることが可能であり、タンパク質の変性もみられなかった。これらの方法は、バイオ医薬品の安定化や濃縮の技術に応用できるだろう。

研究成果の概要(英文)：Proteins can form liquid droplets with polyelectrolyte by liquid-liquid phase separation. In this study, we aimed to establish a method that can disperse an antibody (IgG) from liquid droplets. We investigated how the solubility and aggregation of protein polyelectrolyte complex (PPC) differ between poly(glutamic acid) and IgG. The results showed that there were two types of PPCs: transparent protein polyelectrolyte complex (S-PPCs) and cloudy protein polyelectrolyte complex (A-PPC). Interestingly, the viscosity of A-PPC and S-PPC decreased compared to the dispersed state without the addition of poly(glutamic acid).

研究分野：タンパク質溶液科学

キーワード：タンパク質 高分子電解質 液-液相分離 安定化 抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内にはタンパク質が液-液相分離して集合した相分離液滴(コンデンセート・ドロプレット)があり、多様な役割を担っていることがわかりつつある。形成のメカニズムは、天然変性タンパク質や RNA などのタンパク質-高分子電解質複合体(Protein-Polyelectrolyte Complex; PPC)と同様であると考えられる。すなわちこれらの事実は、PPCのドロプレット形成がタンパク質の合理的制御に有用である可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究課題では、研究代表者らがこれまで研究してきた PPC によるドロプレットの形成技術を生かし(*Curr Med Chem* 23, 276, 2017)、試験管内でのタンパク質ドロプレット形成に関わるパラメータを同定し、これをもとにドロプレット形成を任意にコントロールできる方法の確立を目指すことを目的とした。概念的には、液-液相分離させることが可能であれば、ドロプレットを形成したタンパク質は変性していないと考えられる。また、加熱などへの環境ストレスに耐性があると考えられる。タンパク質のドロプレットは可逆性が高く、ふたたび分散した状態に戻せるため、バイオ医薬品の安定化や濃縮の技術に応用できると考えられる。

3. 研究の方法

ポリグルタミン酸と抗体(IgG)を試料として用いた。両者を混合したときの PPC の状態を分光光度計および顕微鏡観察によって観察した。PPC の状態を再分散させたあとのタンパク質の構造を、遠紫外円偏光二色性スペクトルや蛍光スペクトルで測定した。

4. 研究成果

ポリグルタミン酸と IgG を対象に、タンパク質高分子電解質複合体(PPC)の可溶性と凝集性がどのように異なるのかを調べた。その結果、ポリグルタミン酸の濃度を変化させると、透明なタンパク質高分子電解質複合体(S-PPC)と、白濁した状態のタンパク質高分子電解質複合体(A-PPC)にわかれることがわかった(図1)。高濃度の抗体溶液にポリグルタミン酸を加えていくと、さいしょに A-PPC の状態が形成され、その後、S-PPC の状態になることがわかった。興味深いことに、ポリグルタミン酸を加えない分散した状態と比較し、A-PPC および S-PPC は粘度が下がることがわかった。PPC から再溶解させたあとのタンパク質の立体構造も変性しなかった。また、S-PPC はタンパク質溶液が透明であり粘度も低下した。この状態では疎水性相互作用による引力的な作用が減るために溶液の粘度が低下するのだと考えられる。

高濃度のタンパク質を含んでいるにもかかわらず、A-PPC は溶液の粘度がきわめて低くなり、しかも可逆に複合体からタンパク質を解離させることもできる。そのため PPC は、バイオ医薬品の濃縮のための方法に応用できると考えられる。

一連の研究を進めるなかで、超遠心分離する過程で IgG をガラス状に固めることができる

ことを偶然発見した。この状態もかなり可逆性が高く、生理食塩水によって再分散させることが可能である。また、再溶解後にも立体構造が保たれていることもわかった。この方法は、バイオ医薬品の安定化や濃縮のためにポリグルタミン酸のような添加物を加えなくてよいという利点がある。

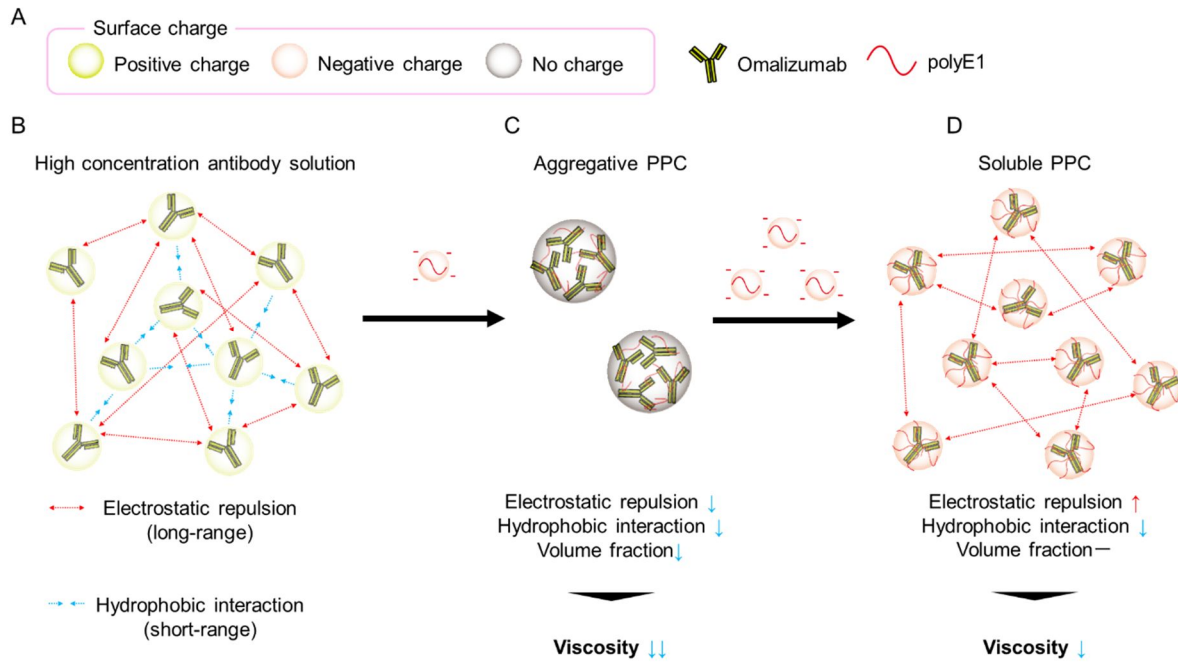


図 1 : 高濃度 IgG が形成する A-PPC と S-PPC のメカニズム

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakauchi Yoshitaka, Nishinami Suguru, Shiraki Kentaro	4. 巻 182
2. 論文標題 Glass-like protein condensate for the long-term storage of proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 162 ~ 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.017	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	富田 峻介 (Tomita Shunsuke) (50726817)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	栗之丸 隆章 (Kurinomaru Takaaki) (50769693)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 員 (82626)	

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