

# タンパク質に優しくタンパク質を濃縮 できる細胞質模倣溶媒の開発

九州大学 大学院工学研究院  
応用化学部門  
准教授 岸村 顕広



# 従来技術とその問題点

細胞質環境は、タンパク質が実際に働く場として理想的環境の一つと考えられるが、従来の試験管レベルの環境は希薄溶液系であり、十分とはいえない。

⇒コアセルベートのような濃厚環境が有望

⇒使いたいタンパク質に対してコアセルベート（濃厚液相）形成が常に可能なわけではない。また、濃厚にすることで不可逆的凝集を起こし機能を喪失してしまうことも多くあった。

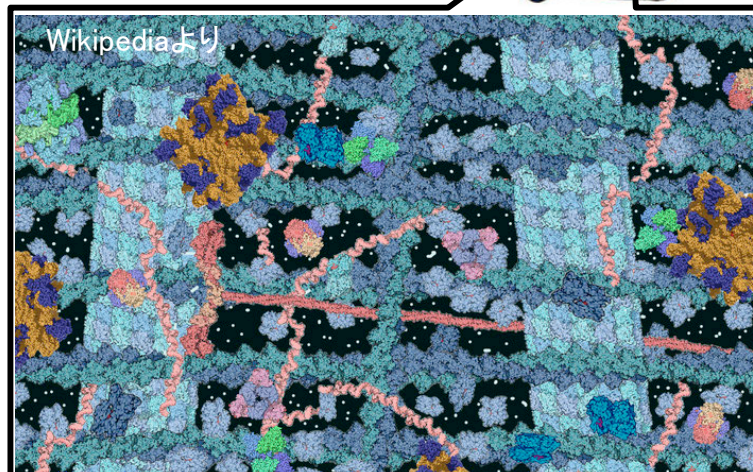
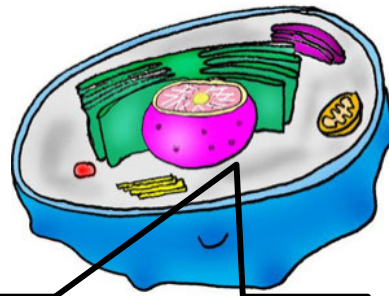
⇒タンパク質にとって居心地の良い濃厚環境の設計ができるとうい。

細胞質環境は濃厚環境である。

**Coacervation (Droplet formation)**

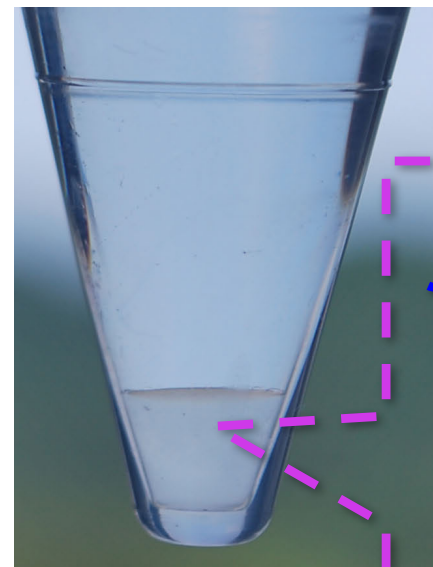
(Liquid-liquid phase separation)

細胞質内の高分子濃度は300mg/mLとも言われている。



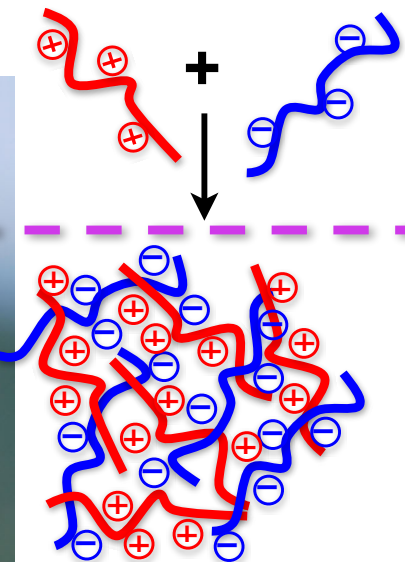
Solvent rich phase

Polymer rich phase



ポリカチオン溶液

ポリアニオン溶液



Complex coacervate

✓ある種の濃厚環境はタンパク質にとって居心地の良い場  
 ✓コアセルベート内に自在にタンパク質を導入・集積化できれば、タンパク質にとって有利な使い方ができる。  
 ⇒デザインできると良い。

- ◇ 種々の物質を簡便に濃縮可能
- ◇ 流動性に富む (高い含水率)
- ◇ 成形加工が容易、injectable・塗布可能
- ◇ Protocell (by オパーリン)、人工細胞

# 新技術の特徴・従来技術との比較（1）

- 本技術では、対象とするタンパク質に応じて、タンパク質を積極的に取り込み、濃縮することができる細胞質模倣溶媒として、コアセルベートを設計する手法を開発することに成功した。  
⇒設計と言っても、使用する高分子電解質の荷電密度を調整するだけ。

特徴1. タンパク質水溶液からタンパク質を濃縮した液体を調製することが可能。

特徴2. あらかじめ作製した液体にタンパク質を抽出することが可能。

特徴3. タンパク質を放出することが可能。

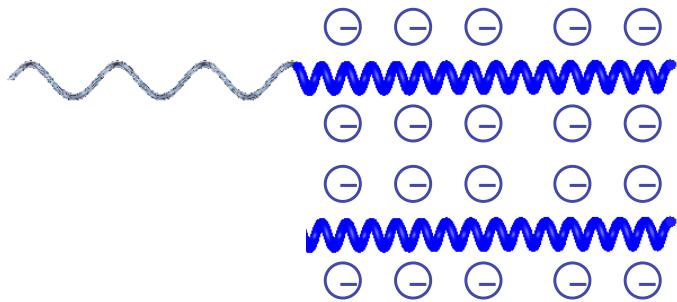
## 新技術の特徴・従来技術との比較（2）

- 本技術では、対象とするタンパク質に応じて、タンパク質を積極的に取り込み、濃縮することができる細胞質模倣溶媒として、コアセルベートを設計する手法を開発することに成功した。
- 従来は高分子電解質とタンパク質の直接的相互作用に注目する手法に限られていたが、濃厚な場としてのコアセルベート（液状ポリイオンコンプレックス）を設計するという発想の転換を行うことで新手法の開発に至った。
- 本技術の適用により、非常に簡便な設計指針（高分子電解質の化学修飾）でタンパク質の濃縮と機能維持ができるため、汎用性のほか、コストダウンを見込むことができる。

ポリオンコンプレックス(PIC)による自発的構造形成

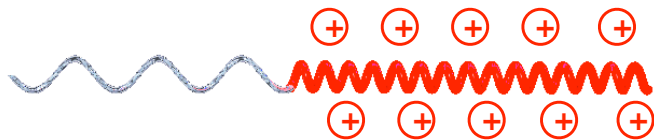
ブロック共重合体の組成・調製条件を変えるだけでナノ～マイクロスケールで種々の自己集合構造制御が可能。

PEG-ポリアニオン

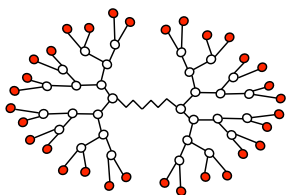


ホモポリアニオン

+



PEG-ポリカチオン



ホモポリカチオン

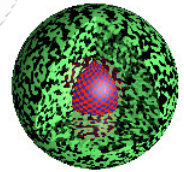
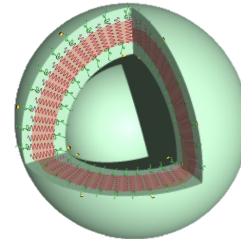
水溶液の  
混合



The PIC Family

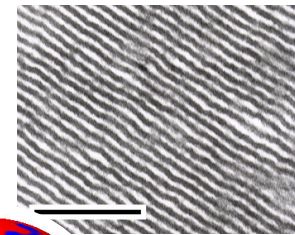
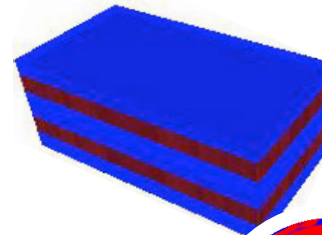
ナノ  
構造体

PICsome  
(ベシクル)

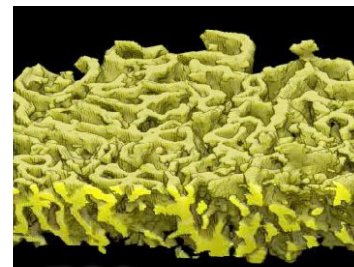


PICミセル

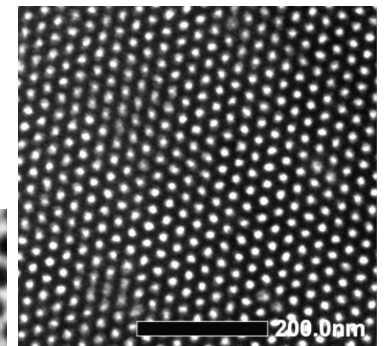
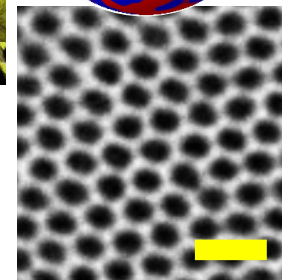
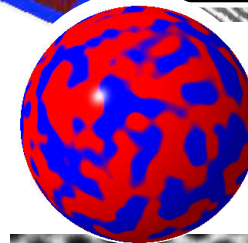
コアセルベート



Multi-  
lamellar

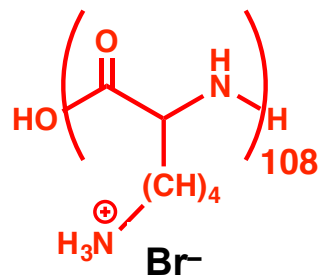


PIC-sponge



Nano-  
structured  
PICs

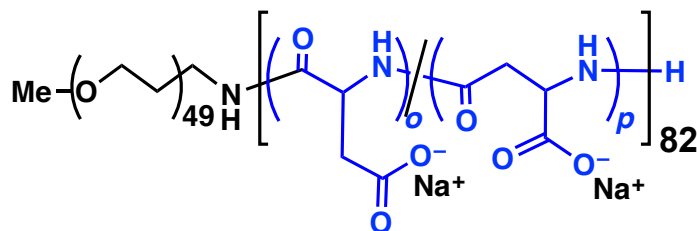
## カチオン性 ポリマー



Poly-L-Lysine  
(PLL)

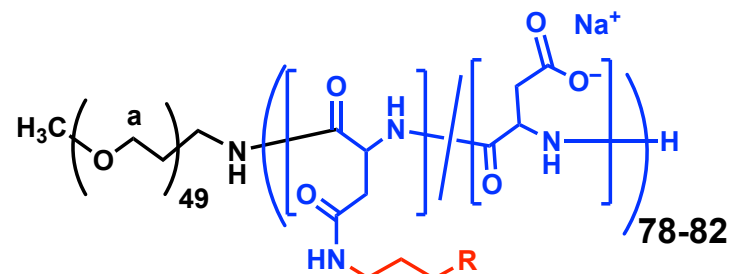
MW = 22,470

## アニオン性ポリマー



Poly(ethylene glycol)-  
b-Poly(L-Aspartate)  
(PEG-PAsp)

MW = 14,020

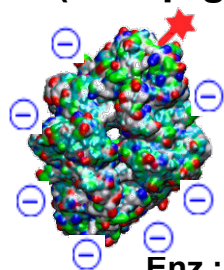


PEG-P(Asp-R) 30%

R = -Pr-OH, -Pr-Me

特願2019-138044

Rhodamine B labelled  
β-galactosidase  
(Rho-β-gal)



Enz : Dye = 1:0.15

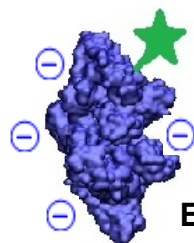
MW: 540KDa

pI: ~4.6

Homotetrameric

~-160e-/mer at pH 7

FITC labelled  
Bovine Serum Albumin  
(FITC-BSA)



Enz : Dye = 1:3

MW: 66.5KDa

pI: ~5.2

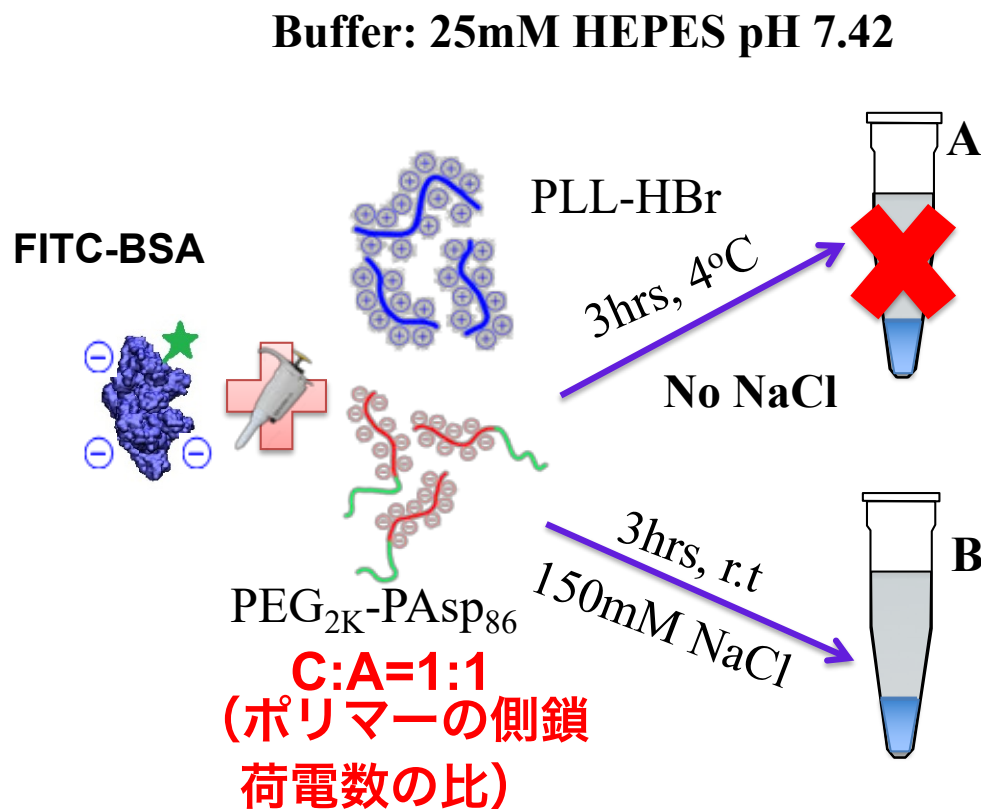
-18e- at pH 7

### Conditions:

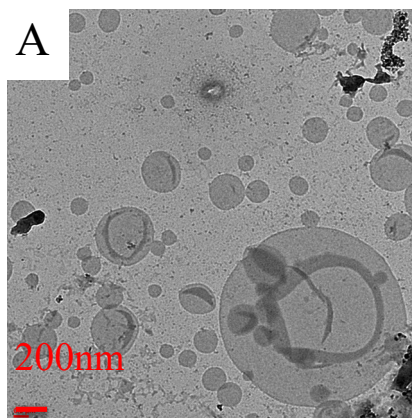
- 25mM HEPES buffer, pH 7.4
- Polymer Concentration: 5mg/ mL in buffer
- Protein Concentration : 1mg/ mL in buffer

# 従来型のコアセルベートはタンパク質取り込みに積極的でない

- アニオン性タンパク質に対して、効果的なコアセルベート内への取り込みは確認できなかった。

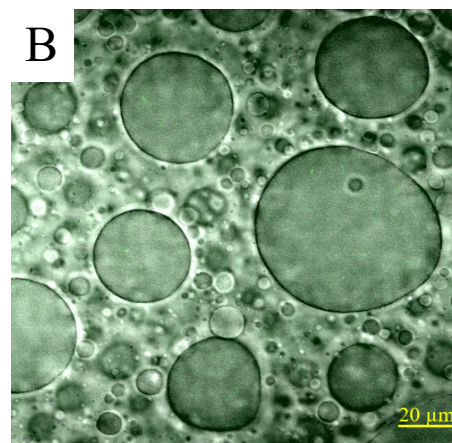


## TEM 観察



粒径500 nm前後の巨大ベシクルが形成。  
⇒先行研究で仕込み量の1%程度しか取り込まれない。

## 共焦点顕微鏡 (CLSM) 観察



タンパク質の積極的な取り込みは起こらず。

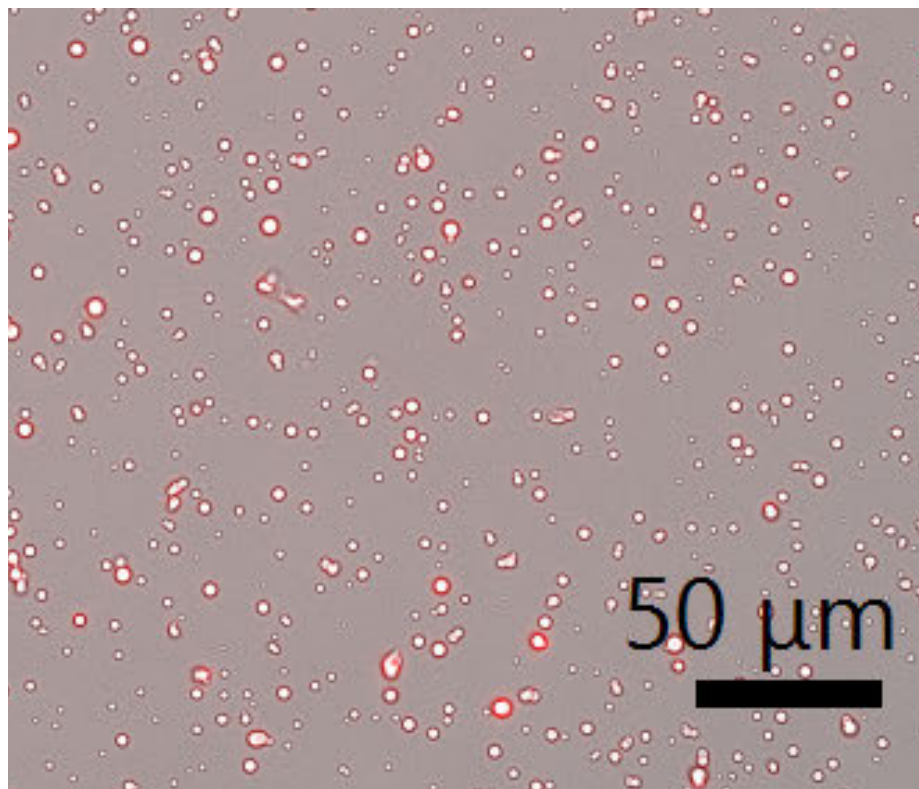


# ポリカチオン過剰条件でタンパク質は取り込まれるが安定に保持されない

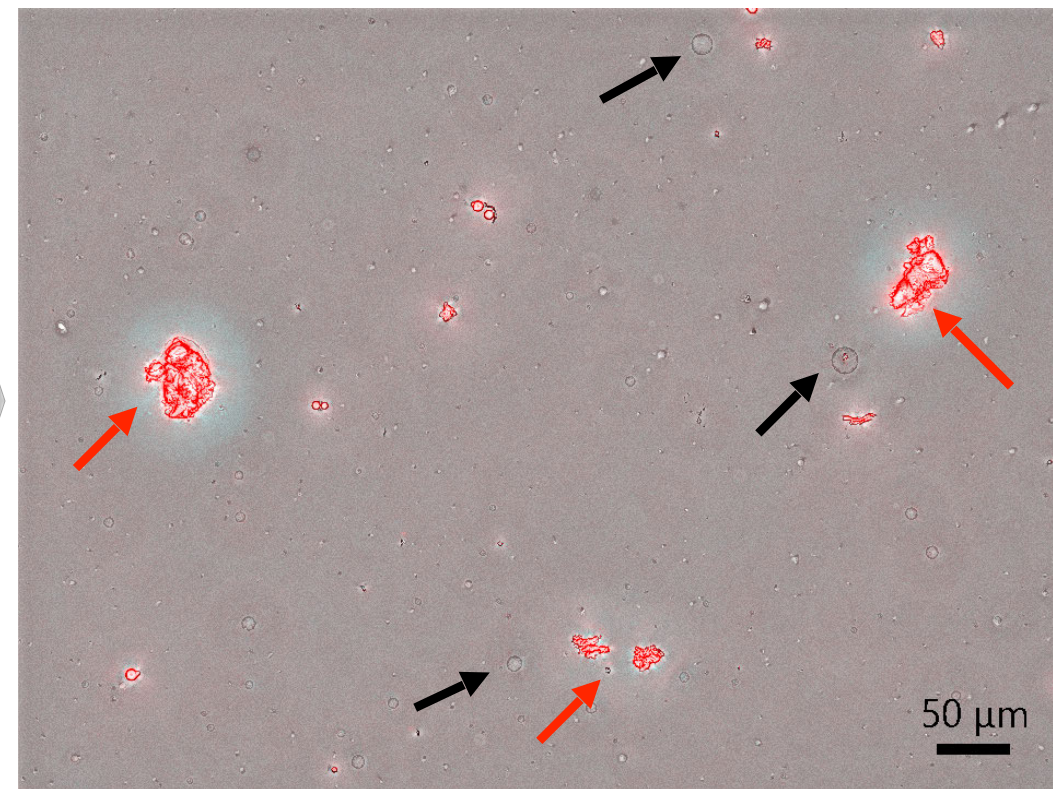


調製直後は液滴にタンパク質(b-gal)が取り込まれたが、時間が経つと（3日後）保持されていなかった。

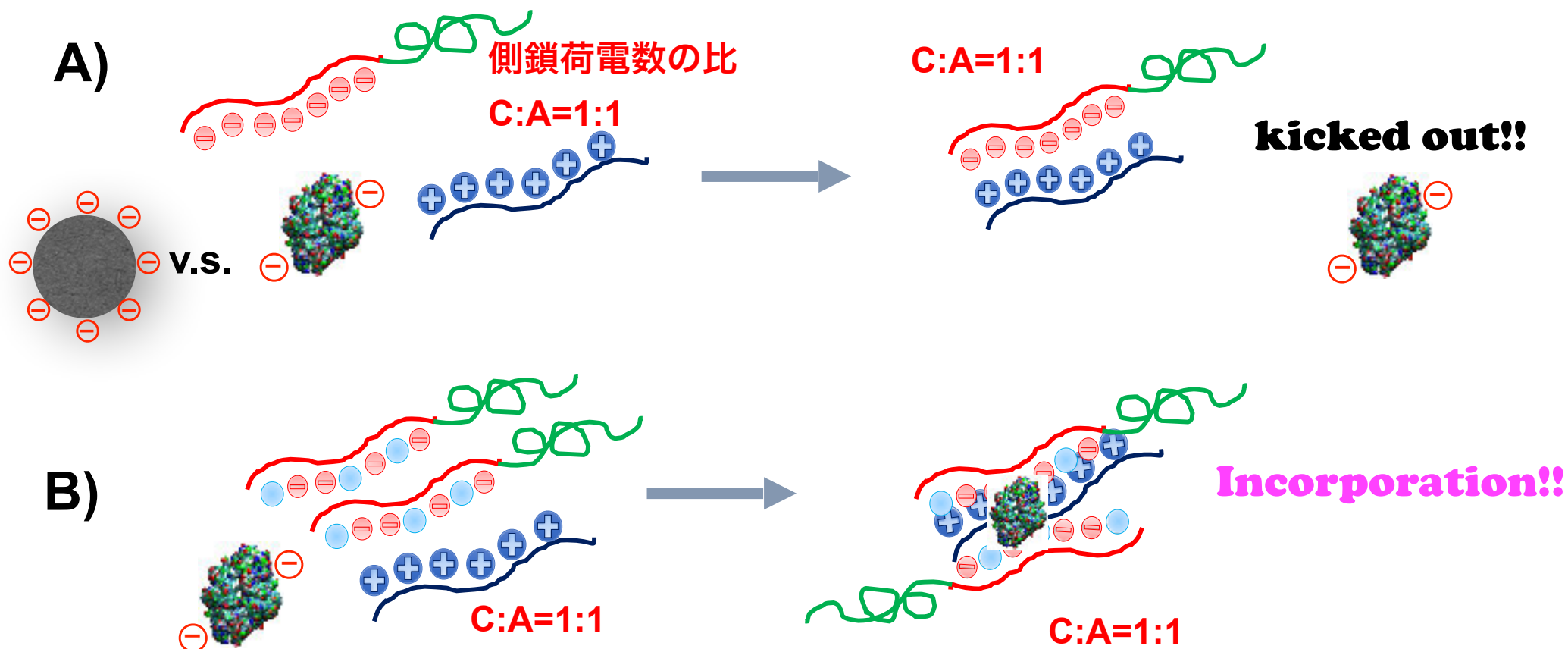
After 3 h , r.t



After 3 days, r.t

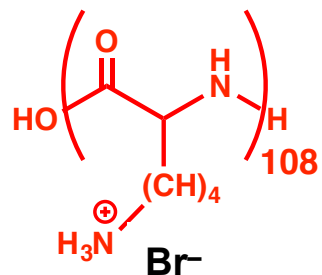


- ❖ カチオン性ポリマーとアニオン性ポリマーの相互作用が強すぎ、タンパク質が入り込めない可能性がある (タンパク質の荷電密度が低い)



- ❖ アニオン性ポリマー上の荷電密度を低くすることで、マイナス荷電を多く持つタンパク質を取り込めるようにならないか？

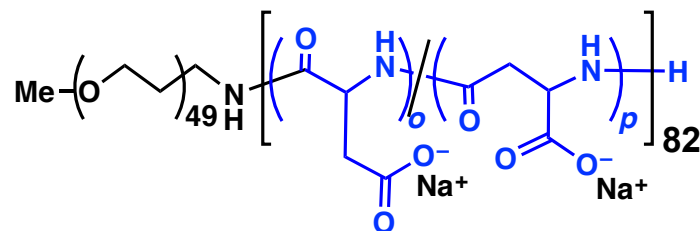
## カチオン性 ポリマー



Poly-L-Lysine  
(PLL)

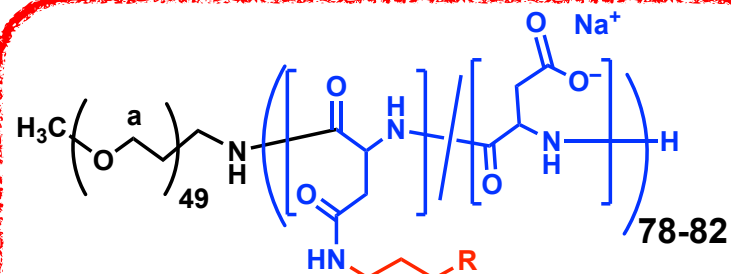
MW = 22,470

## アニオン性ポリマー



Poly(ethylene glycol)-  
b-Poly(L-Aspartate)  
(PEG-PAsp)

MW = 14,020

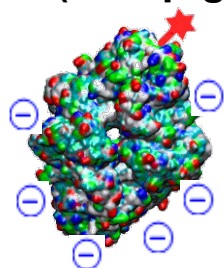


PEG-P(Asp-R) 30%

R = -Pr-OH, -Pr-Me

特願2019-138044

Rhodamine B labelled  
 $\beta$ -galactosidase  
(Rho- $\beta$ -gal)



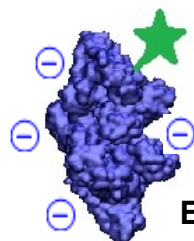
Enz : Dye = 1:0.15

MW: 540KDa

pI: ~4.6

Homotetrameric  
~-160e-/mer at pH 7

FITC labelled  
Bovine Serum Albumin  
(FITC-BSA)



Enz : Dye = 1:3

MW: 66.5KDa

pI: ~5.2

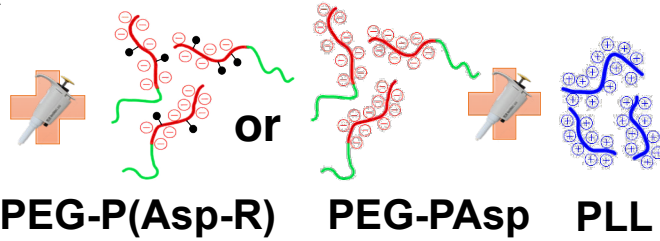
-18e- at pH 7

### Conditions:

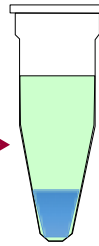
- 25mM HEPES buffer, pH 7.4
- Polymer Concentration: 5mg/ mL in buffer
- Protein Concentration : 1mg/ mL in buffer

FITC-BSA

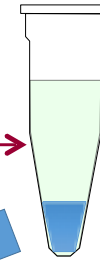
側鎖荷電数の比 A:C=1:1



50 mM NaCl  
Overnight@RT

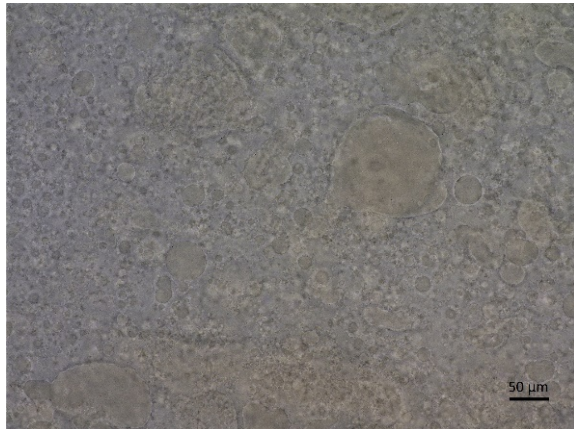


200  $\mu$ L Buffer change  
Centrifugation 300 G,  
10min

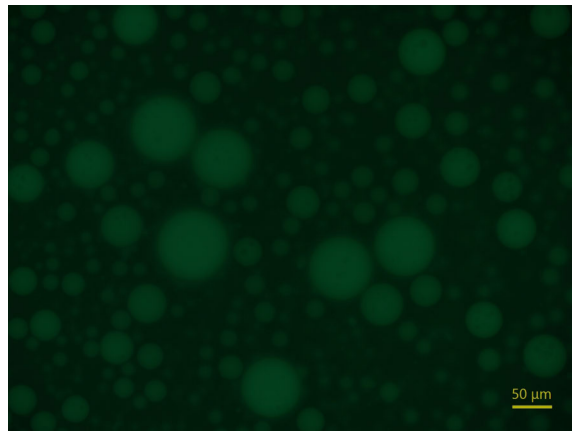
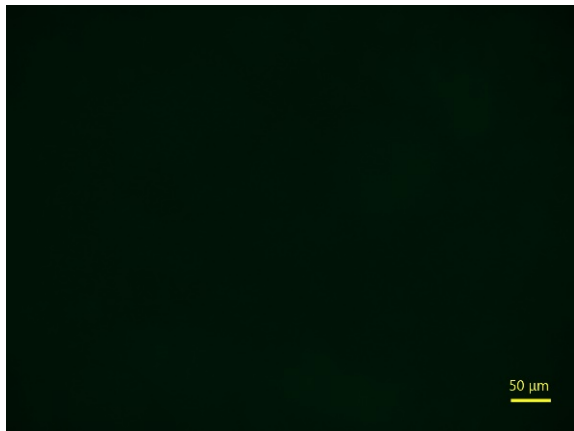
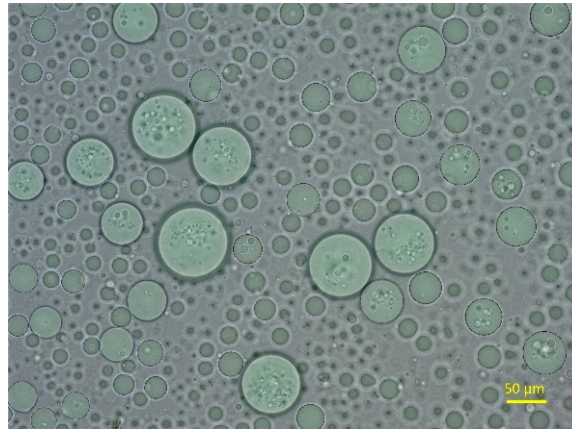


Optical and  
Fluorescence  
Observation

PEG-PAsp



PEG-P(Asp-Pr-Me)



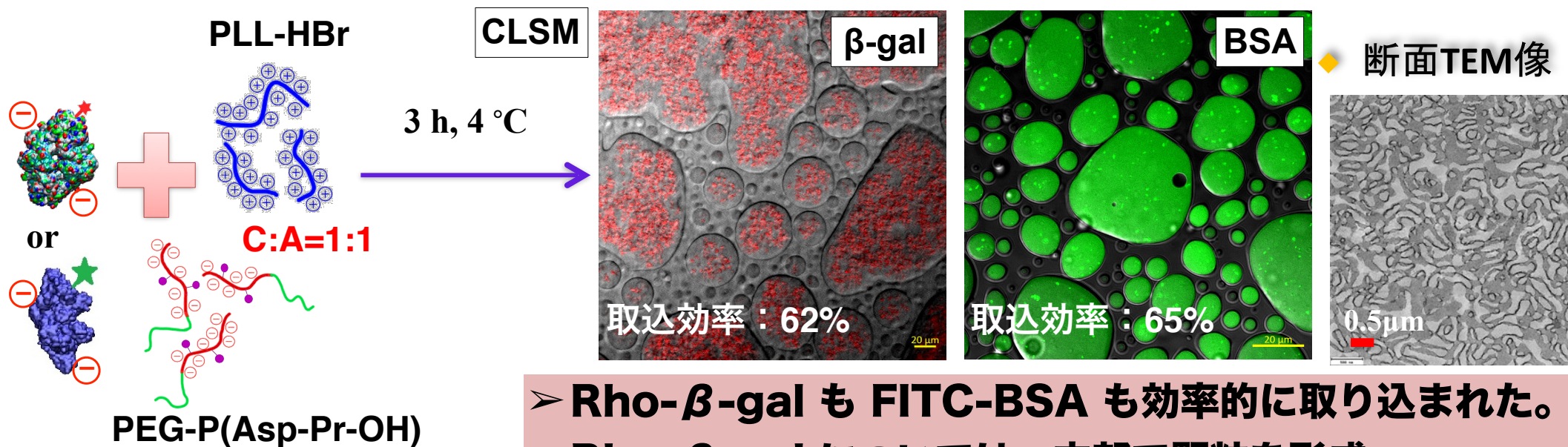
➤ 双方コアセルベートを与える条件において、化学修飾をしたポリマーのみが液滴内へのタンパク質の取り込みを示した。

❖ この結果から、構成ポリマーの荷電密度を下げることでタンパク質取り込みが向上することが示唆された。

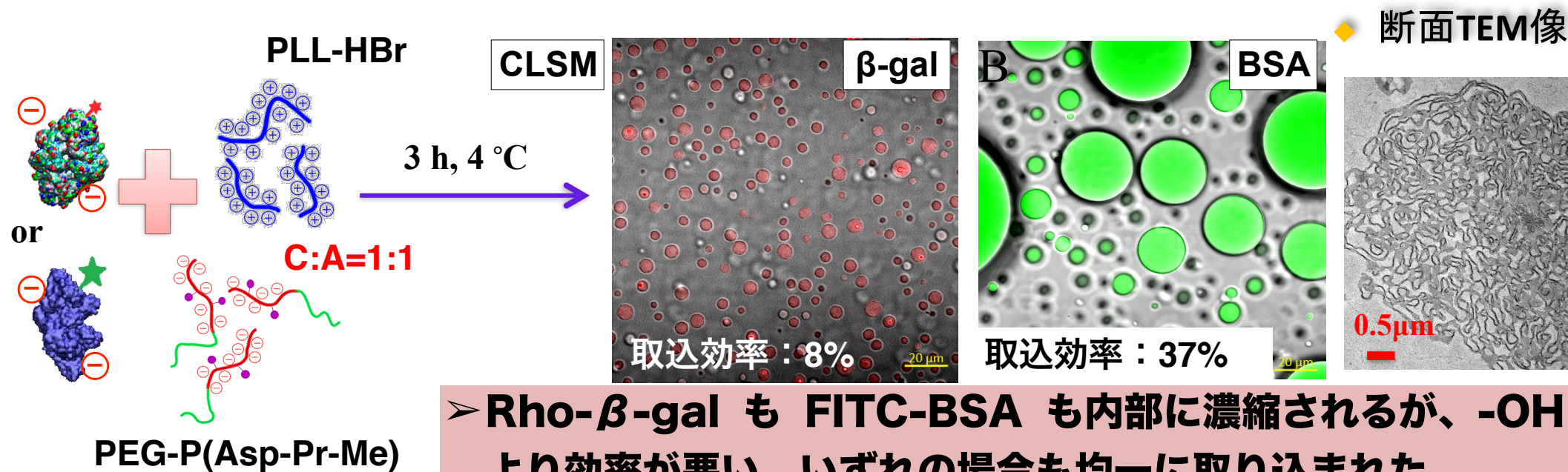
コンセプトの実証に成功。

❖ 荷電比1:1でもタンパク質を取り込むようになり、化学構造で差が出た。

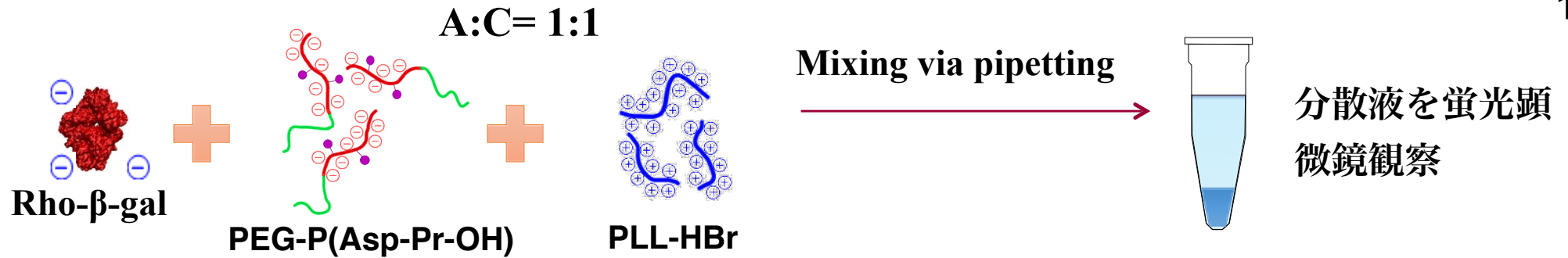
13



- Rho-β-gal も FITC-BSA も効率的に取り込まれた。
- Rho-β-gal については、内部で顆粒を形成。

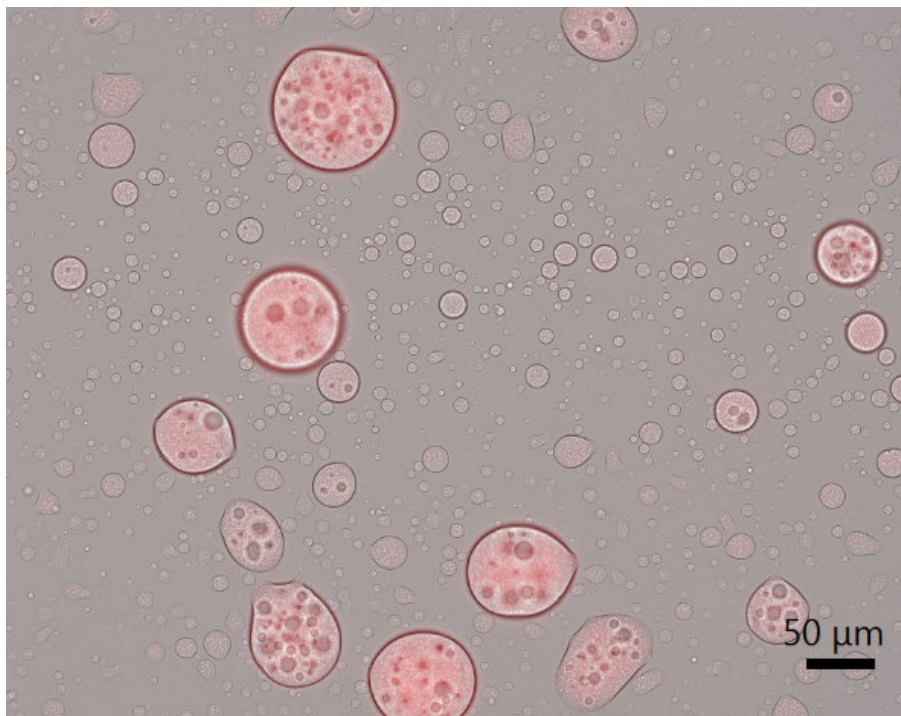


- Rho-β-gal も FITC-BSA も内部に濃縮されるが、-OH より効率が悪い。いずれの場合も均一に取り込まれた。

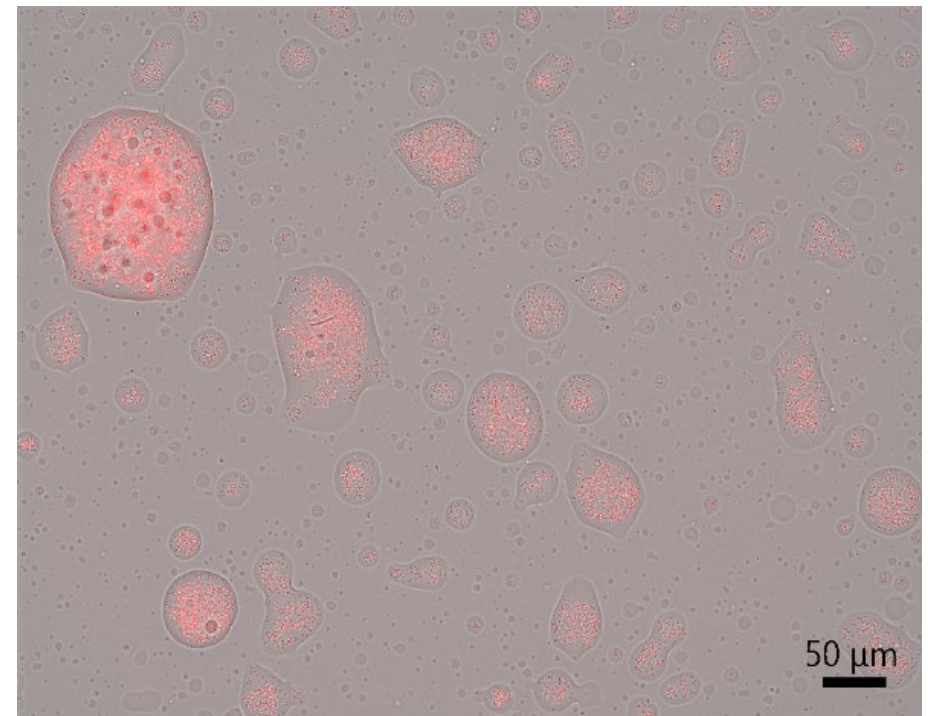


3日後でもタンパク質を保持していた。

After 3 h , r.t

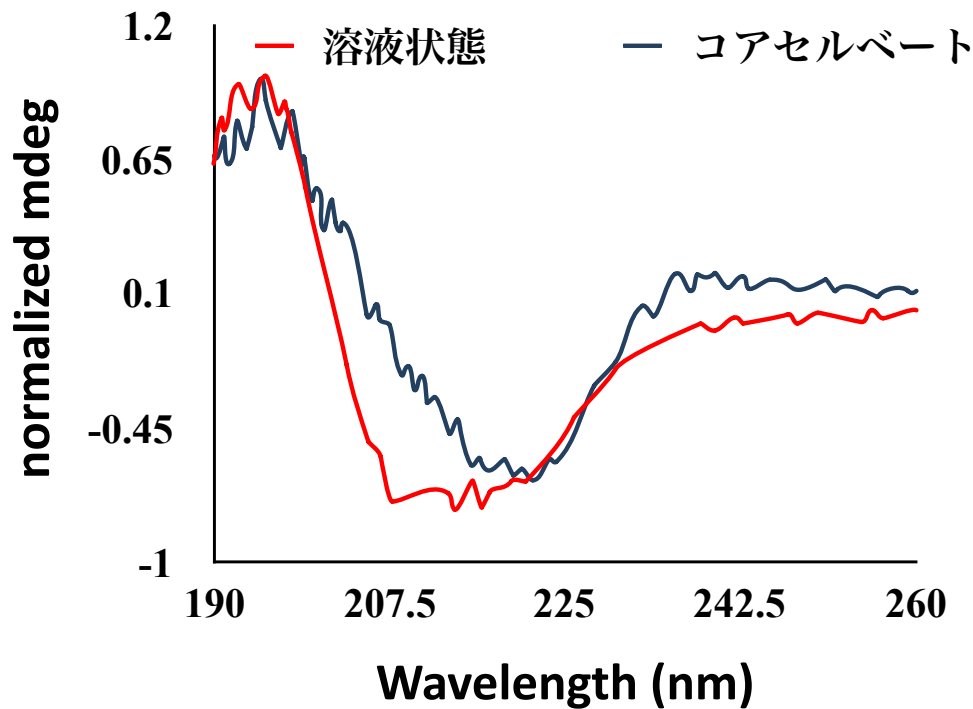


After 3 days, r.t



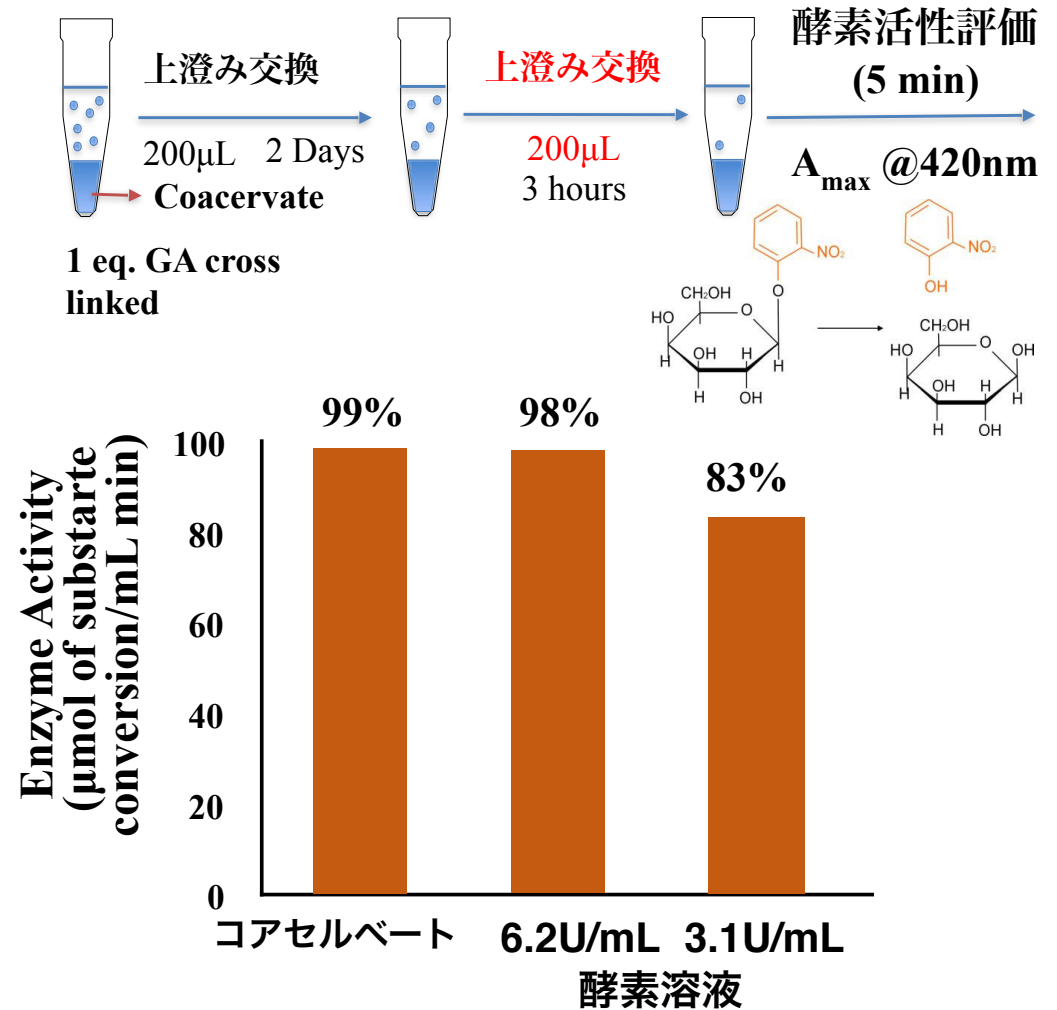
PEG-P(Asp-Pr-OH)/Rho-β-gal

◆コアセルベートのCDスペクトル測定



❖ タンパク質の二次構造はコアセルベート取り込み後も維持された。

◆rho-β-gal含有コアセルベートの酵素活性評価

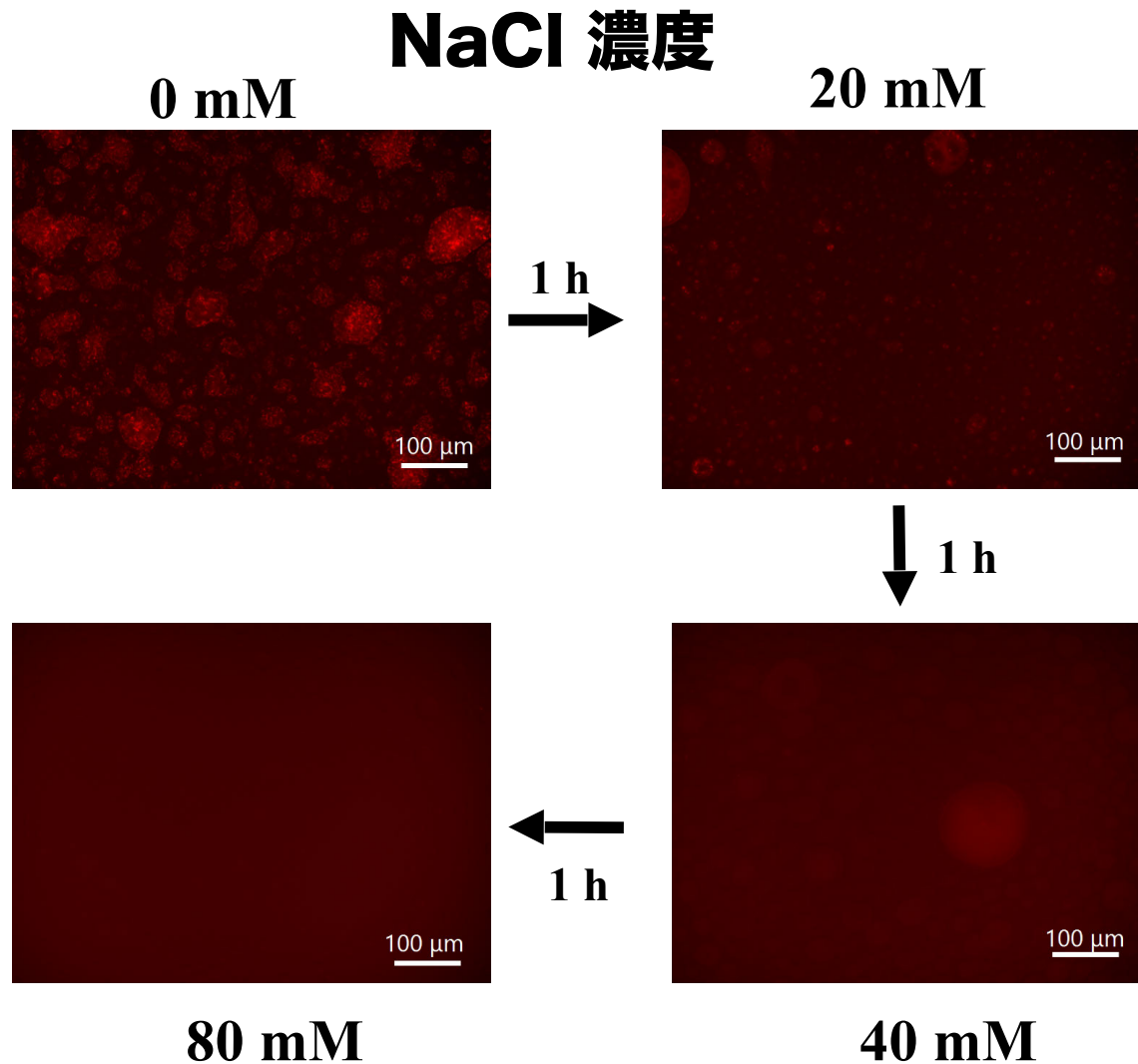


❖ コアセルベートは3.1 U/mL以上の活性を示した。(当初溶液は7.0 U/mL)

➤ 酵素の機能は損なわれていないことを示唆。

# 塩濃度 (NaCl) の放出促進効果(1)

PEG-P(Asp-Pr-OH) + PLL + Rho- $\beta$ -galの組み合わせ  
に、NaClを段階的に添加。



➤ NaClの添加によりRho- $\beta$ -galが放出されていることがわかる。

⇒塩を添加することにより荷電が静電遮蔽され、静電相互作用に基づくポリオンコンプレックス形成が阻害された。

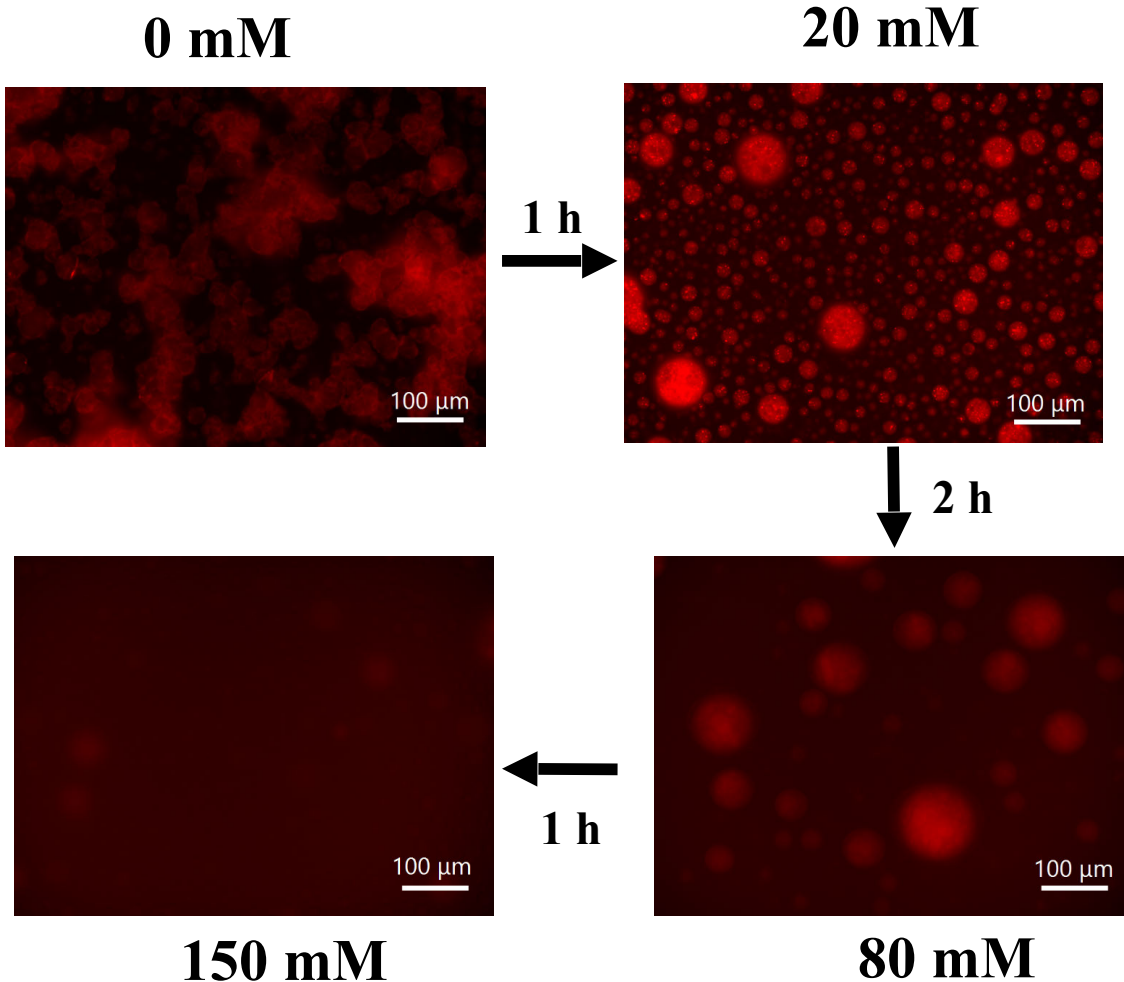
⇒取り込まれたタンパク質が非特異的に沈殿を形成して取り込まれたわけではなく、**可逆的に取り込まれている**ことがわかる。



# 塩濃度 (NaCl) の放出促進効果(2)

PEG-P(Asp-Pr-Me) + PLL + Rho- $\beta$ -galの組み合わせに、  
NaClを段階的に添加。

## NaCl 濃度



➤ NaClの添加によりRho- $\beta$ -galが放出されていることがわかる。

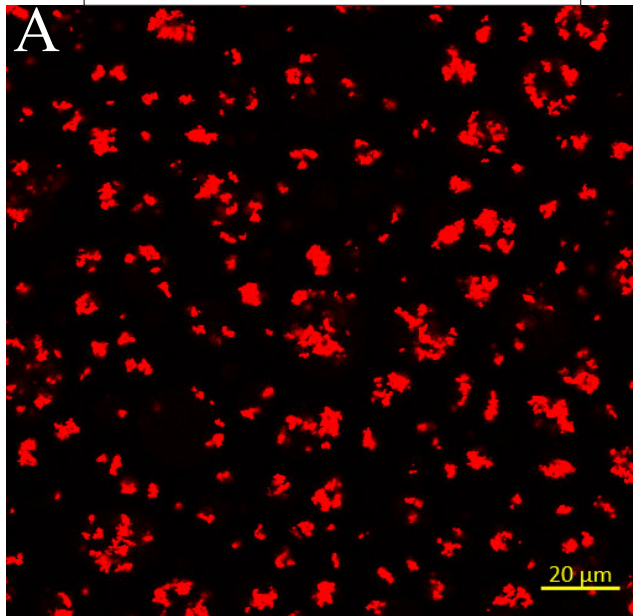
⇒塩を添加することにより荷電が静電遮蔽されることに基づくと思われるが、PEG-PAsp-OHと比較して、タンパク質保持能が高いように見受けられた。

⇒側鎖の化学的性質の差（疎水性の上昇）により、コアセルベート内の環境制御の可能性を示唆

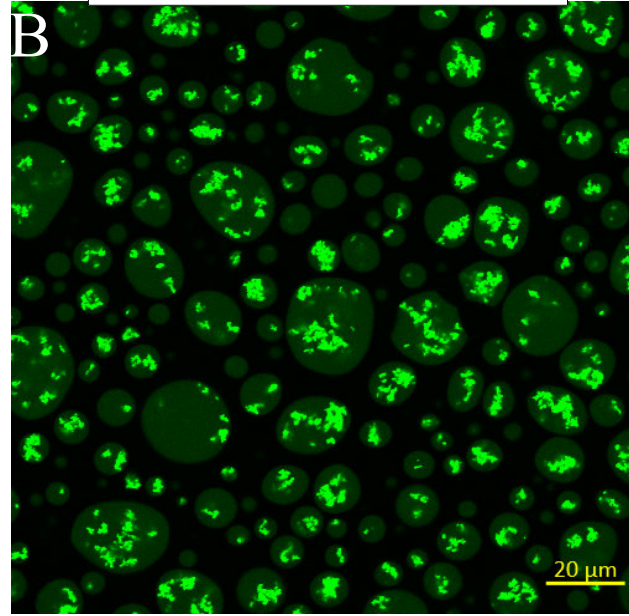
# BSAとb-galの同時取り込み

Weighted Co-encapsulation coefficient in region of interest (n= 23)  
FITC = 0.99, Rhodamine = 0.70

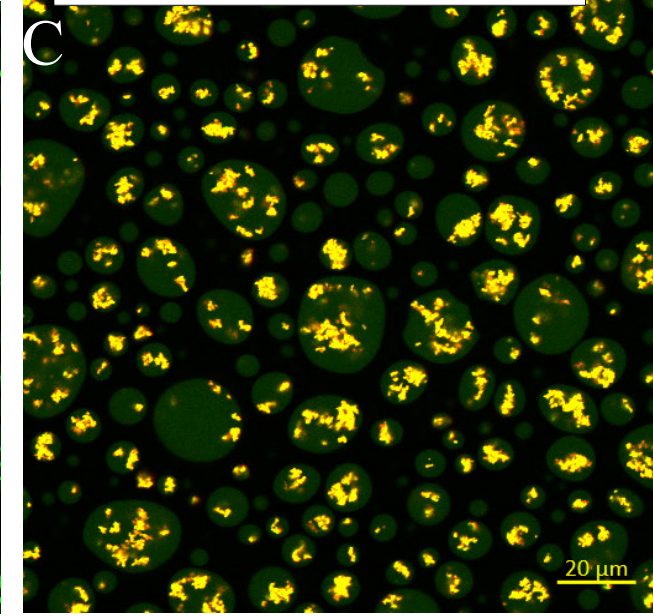
Rho- $\beta$ -gal/CLSM画像



BSA/CLSM画像



Merge/CLSM画像



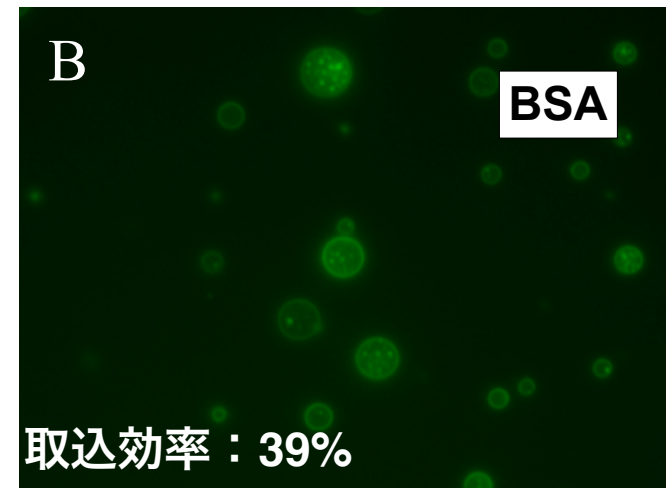
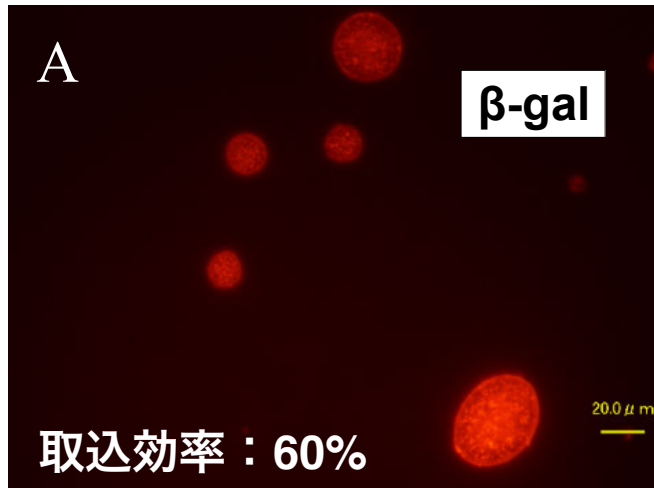
- ❖ Both proteins were encapsulated within coacervate phase.
- ❖ Rho- $\beta$ -gal is almost all concentrated in high fluorescent complex, while FITC-BSA was distributed uniformly.

- 複数種のタンパク質を同時に取り込むことも可能であった。
- タンパク質を取り込む細胞質様の溶媒がデザイン可能。

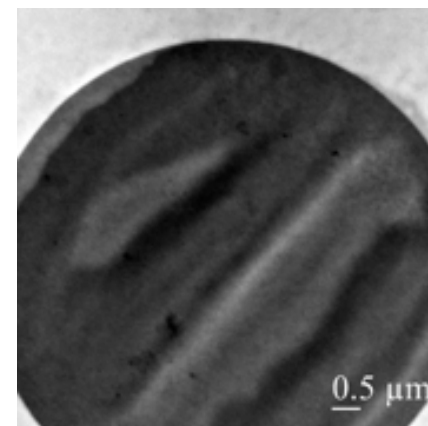
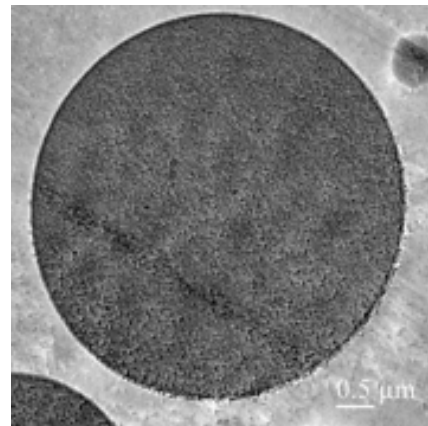
# PEGの無いポリマー homo-P(Asp-Pr-OH を)用いた場合

側鎖修飾率は52%

25 mM HEPES, pH 7.4, 0 mM NaCl, 4 °C



◆ 断面TEM像



➤ BSAに対して、取り込み効率が低下した。

➤ ナノ微細構造が消失した。

⇒ 微細構造化が取り込み挙動や酵素活性に与える影響を今後評価予定。

## 想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、タンパク質の安定化や長期保存、長期使用に関連する用途に適用することが有望と考えられる。
  - 化粧品、医薬品、食料品への応用
  - 酵素固定担体などの産業応用
- 上記以外に、本技術をさらに発展させることで、タンパク質の分離、抽出にも有効な技術となることも期待される。

# 実用化に向けた課題

- 現在、塩濃度変化などの環境変化に応答して、タンパク質を放出できることが明らかとなっている。しかし、細かいチューニングについては未解決である。また、生理環境での安定性についても要検討である。
- 今後、ヒトの抗体について実験データを取得し、抗体の製剤化に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 包埋した酵素の活性についても、活性があることの確認はできているが、厳密な定量ができていないため、さらなる検討を進める。
- 複数酵素の導入とその連携（カスケード反応）について検討を進める。
- ポリアミノ酸以外の高分子電解質への展開が不十分。  
（核酸は適用可能と類推。）

## 企業への期待

- ポリアミノ酸以外の産業上有用な高分子電解質への展開。
- 抗体製造や酵素製造の技術、バイオリアクター開発技術を持つ企業との共同研究を希望。
- また、タンパク質のナノ・マイクロカプセル化技術を開発中の企業、ナノメディシンやバイオリアクター分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

# 本技術に関する知的財産権

発明の名称：合成高分子を用いたタンパク質濃縮液体

出願番号：特願2019-138044

出願人：九州大学

発明者：岸村 顕広、K C Bioplab

# お問い合わせ先

九州大学学術研究・産学官連携本部  
知的財産グループ

TEL 092-802-5137

FAX 092-802-5145

e-mail [transfer@airimaq.kyushu-u.ac.jp](mailto:transfer@airimaq.kyushu-u.ac.jp)