

ペプチドから成るコアセルベートを用いた タンパク質分離精製法の開発

Development of a Protein Separation Method Using Peptoid-Based Coacervates

助成年度	令和 6 年度研究助成
助成番号	MZR2024004
研究期間	2024/04/01 ~ 2025/03/31
代表研究者	奥野 陽太 (Yota Okuno)
	関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科
キーワード	Peptoid, Coacervate, Liquid-liquid phase separation, thermoresponsive

1. 研究の背景と目的

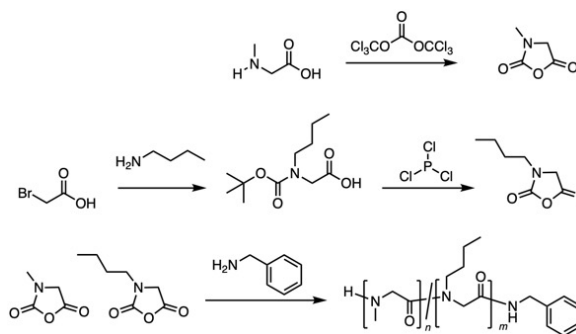
タンパク質はバイオ医薬品をはじめとして多くの分野で応用が期待される天然の機能性分子である。例えば大腸菌にタンパク質を産生させる場合、得られるタンパク質水溶液の濃度は数百 mg/L と極めて希薄である。この溶液からタンパク質を抽出・濃縮する際には硫酸沈殿法が汎用されるが、タンパク質の活性維持率は 20% 未満と低い。タンパク質の実質回収率は、回収率×活性維持率で考えられるため活性を維持しながら高効率でタンパク質を回収する必要がある。

本研究では、人工アミノ酸である *N*-置換グリシンの重合体（ペプチド）が形成する温度応答性コアセルベートを用いて、タンパク質希薄水溶液から活性を維持してタンパク質を回収する手法の構築を目指した。温度応答性コアセルベートは水中に溶解したポリマーが、加熱や冷却などの温度刺激に応答して自発的に形成する高分子の濃厚液滴である。コアセルベート内部には比較的多量の水分が存在し、タンパク質を取り込めるこ

とが知られている。この性質を用いて、タンパク質の活性を失わない温和な条件で高効率回収するシステムの構築を目的とした。

2. 研究の内容・方法

本研究では、温度応答性コアセルベートを形成する材料としてペプチドを選択した。ペプチドはポリアミド主鎖を有しているため、タンパク質に近い水和構造を持ち、タンパク質を高効率で濃縮するものと推察された。具体的には poly(*N*-butyl glycine) と poly(*N*-methyl glycine) の共重合体を (PNBG-co-PNMG) 設計した（スキーム 1）。



スキーム 1. PNBG-co-PNMG の合成経路。

タンパク質が安定に存在できる温度は一般的には高々40℃であり、この温度以下で当該ペプチドはコアセルベートを形成する必要がある。本検討においてはこの条件を満たすため先行研究を参考に、共重合比中 poly(*N*-butyl glycine)の割合を 60-65%にすることとした。¹ この設計により相転移温度を 15-25℃の温和な条件とできるものと推察し実験を実施した。

回収実験に際しては、実際の大腸菌タンパク質合成系を模倣して 10-100 mg/L の範囲でタンパク質水溶液を作製し、ここに合成した PNBG-co-PNMG を添加した後、緩やかに加熱した。本試験に用いるタンパク質の一部は予め蛍光修飾を行っておき、分離回収効率を蛍光検出装置付の排除体積カラムクロマトグラフィー及び恒温遠心分離機を用いて評価した。

3. 研究の成果

(1) ペプチドの合成

はじめにスキーム 1 に則って PNBG-co-PNMG を合成した。コアセルベート形成温度の調査のため、重合度は 200 に固定しながら poly(*N*-butyl glycine)の割合を 60-65%の範囲で変化させた分子を並行して合成した。合成の確認は核磁気共鳴法とゲル浸透クロマトグラフィーを用いて行い、いずれの分子も数平均重合度 200 で分散指数が 1.1 と狭小な分子量分布を持つ目的物を得た。なお研究計画当初は全く予想していなかったのだが、上記合成実験の中で重合時の濃度を変化させることで poly(*N*-butyl glycine)と poly(*N*-methyl glycine)のランダム性を制御できる発見があった。すなわち、モノマーである *N*-butyl glycine *N*-carboxy anhydride と *N*-methyl glycine *N*-carboxy anhydride の重合時仕込み割合によって得られる共重合ペプチド中の poly(*N*-butyl glycine)の割合が決定するが、この重合時のモノマー濃度によって共重合ペプチド中の poly(*N*-butyl glycine)と poly(*N*-methyl glycine)の配列が異なっていた。

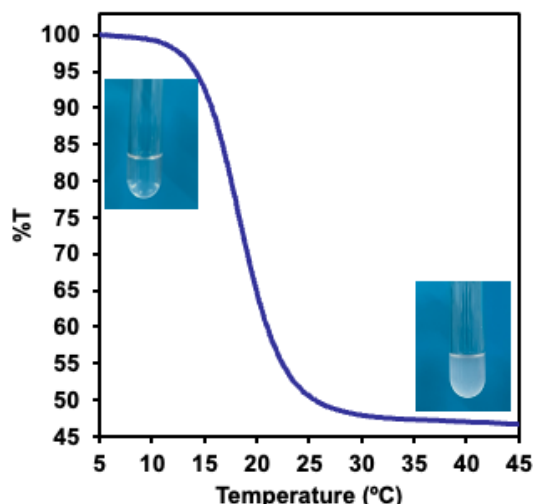


図 1. PNBG-co-PNMG の相転移挙動。昇温に伴って水溶液は白濁し、可視光透過性が低下した。

このような報告はこれまでに例がなく、高分子合成において先進的な発見であると考えられる。本発見は本研究内容の主題ではないため詳述しないが、この発見があったため重合時はモノマー濃度を一定にして合成を行った。

(2) 得られたペプチドの加温によるコアセルベート形成の確認

さて得られたペプチドの温度応答性を評価するため、ペプチドを 1.0 mg mL⁻¹ の濃度でリン酸緩衝液に溶解し、加温しながら可視光 (500 nm) の透過率を測定することで相転移挙動を追跡した。図 1 に示すように poly(*N*-butyl glycine)の割合が 65%のとき濁度から求められる相転移温度 T_{cp} が 19℃となり、当初の予定どおりタンパク質にとって優しい条件で温度相転移するペプチドを創出した。

図 1 に示したように、加温することで得られた白濁がコアセルベートの形成によるものであることを確認するため、微分干渉顕微鏡による観察を行った。一般的なコアセルベートでは本手法を用いることで液滴を確認できるが、今回は視野に何も写らなかった。この結果を受けて形成しているコアセルベートは光学顕微鏡で確認出来ない

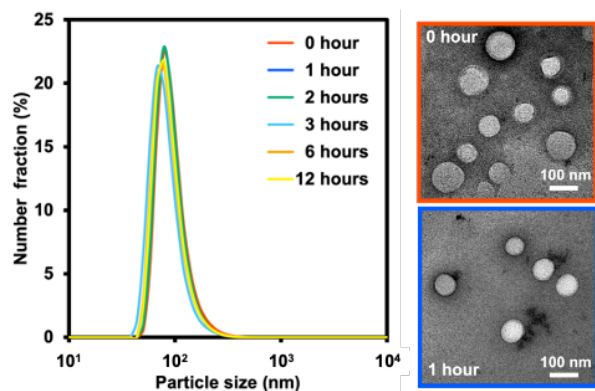


図 2. 加温によって PNBG-co-PNMG が形成したコアセルベートの動的光散乱測定（左）と、コアセルベート形成から 0 時間後、1 時間後の透過型電子顕微鏡像。12 時間以上にわたリコアセルベートが合一等していないことがわかる。

程度に微小であると考え、30 °C で形成した白濁を透過型電子顕微鏡で観察した（図 2）。観察結果から粒径 100 nm 程度の微小な液滴であることがわかった。そこで動的光散乱法によって流体力学的サイズを確認したところ、透過型電子顕微鏡の結果と一致していた。また、この液滴は 30 °C 下 12 時間以上にわたって安定であった。さらなるキャラクタリゼーションのため、SPRing-8 にて放射光小角 X 線散乱測定を行った結果、白濁は球状のコアセルベートであることが示唆された。これらの一連の測定を踏まえて、合成したペプチドは加温に伴って微小なコアセルベートを形成することを明らかにした。

(3) コアセルベートによるタンパク質の分離

ここまでの結果を踏まえて、コアセルベートを用いてタンパク質の希薄水溶液からタンパク質の分離を試みた。モデルタンパク質としてフルオレセインを修飾したウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。4 °C に冷却したリン酸緩衝液中に BSA を 10–100 mg/L の濃度で添加し、ここに合成したペプチドを添加し、所定の温度まで昇温したのち 30 分間静置してコアセルベート内に濃縮されたタンパク質量を遠心分離および排除体積カラ

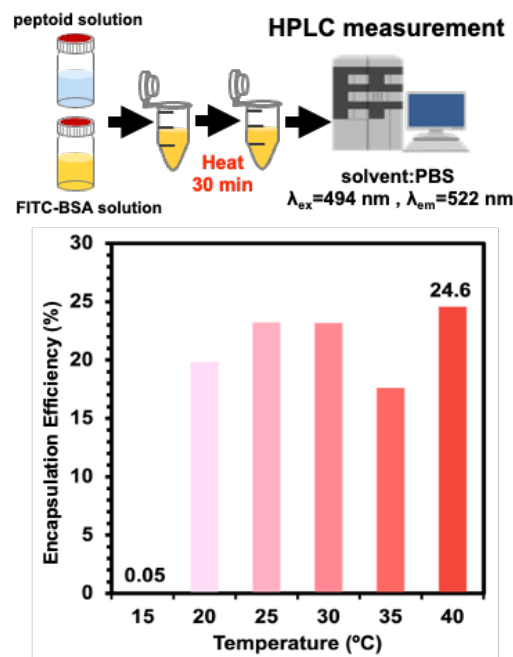


図 3. タンパク質の分離効率評価手法の概念図（上）と各温度での分離効率（下）。

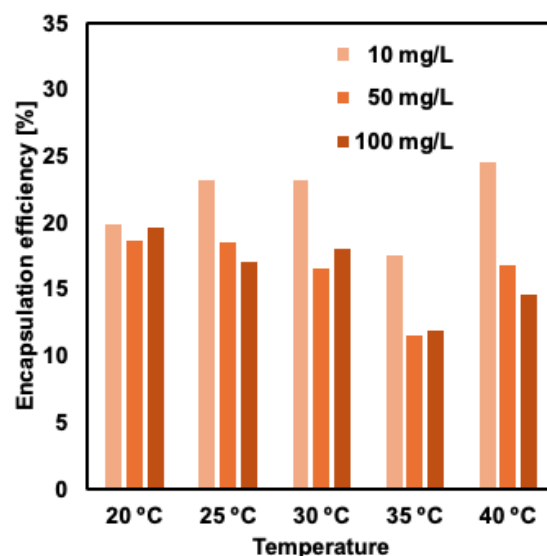


図 4. 各温度でのタンパク質の分離効率。10 mg/L と極めて希薄な水溶液からも比較的高い効率で分離出来ていることがわかる。

ムクロマトグラフィーで定量した（図 3）。図 3 に示す通り、ペプチドの相転移温度以上でのみタンパク質がコアセルベート内に取り込まれることが示された。図 1 に示したように相転移が完全に完了する 30 °C 時の内包効率は 24% であった。意外にも温度を上げれば内包効率が上昇するわ

けではないことがわかる。すなわちペプチドが形成するコアセルベート内へのタンパク質取り込みは、昇温過程においてペプチドがコアセルベートを形成する際のみ起こると推察され、今後取り込み効率を向上させるためには昇温速度など取り込みプロセスの最適化が必要であると考えられる。

同様の手法で 10, 50, 100 mg/L での取り込み効率の評価を行った（図 4）。その結果、10 mg/L のタンパク質が希薄な条件で良好な回収率が認められた。形成しているコアセルベート内のポリマー濃度を 50 wt%と仮定すると、10 mg/L の条件下でコアセルベート内には 125 mg/L 程度までタンパク質が濃縮していると推算される。

最後にタンパク質の分離回収においては、タンパク質をコアセルベート内に濃縮するのみならず、コアセルベートから濃縮したタンパク質を取り出す必要がある。本システムでは回収したコアセルベートを相転移温度以下の 4 °C まで冷却したところ、コアセルベート内に濃縮されていたタンパク質のほぼ全てを回収できることが明らかとなった。

4. 結び

本研究では、温度応答性を示すペプチドを用いてタンパク質の希薄水溶液からのタンパク質分離回収システムの構築に取り組んだ。設計したペプチドは狙い通りタンパク質が安定に存在できる 20 度以下で相転移し、100 nm 程度の微細なコアセルベートを形成することを確認した。実際のタンパク質回収のモデル実験として BSA の希薄溶液を作製し、そこに合成したペプチドを添加したのち 30 °C まで昇温するだけの簡便な方法で 10 mg/L と極めて希薄なタンパク質も 25%と比較的高い効率で分離できた。さらに分離したタンパク質を含むコアセルベートを 4 °C まで冷却すると内部のタンパク質を放出することが明らかとなった。本研究により温度応答性ペプチド

による温和な条件下でのタンパク質分離回収のコンセプトを実証した。

5. 今後の研究方向性・課題

結びで述べたように基本的なコンセプトの確認はできたものの、本システムを実際に活用するにあたっては、以下の点をより慎重に考える必要がある。

1. 他のタンパク質でも同様に分離回収できるか
2. 添加したペプチドの回収方法

1 について、本研究ではモデルタンパク質として BSA を用いたが、実際のタンパク質精製においては多様なタンパク質を回収する必要がある。したがって BSA 以外のタンパク質でも同様に分離回収可能かの検討が必要である。さらには、なぜ本システムでタンパク質が分離できるのかを分子論的に解明することが応用のうえで好ましい。

2 について、本研究ではペプチドを添加している。コアセルベート内に濃縮されたタンパク質は冷却によってコアセルベートが崩壊し取り出すことができるものの、依然としてペプチドが混在している。このペプチドはタンパク質に比べて分子量が小さいので透析等の手法を用いられるが、より簡便にはペプチドに His タグのような特異構造を導入して簡便に取り除けるようにするのが好ましい。

上記のような課題がある一方で、ごく最近温度応答性コアセルベートがシャペロン活性を示すとの報告が成された。² 本検討で用いたペプチドが形成するコアセルベートでも予備的な検討ではあるものの一定の熱凝集抑制能があることが示された。本システムではタンパク質を回収すると同時に変性したタンパク質を巻き戻せる可能性があり極めて興味深い。ここまで得られた知見を基盤に、さらに研究を進めていく。

6. 参考文献

1. T. Xinfeng et al., *Polym. Chem.* **2015**, 6, 3164-3174.
2. X. Zheng et al., *J. Mater Chem B.*, **2025**, 13, 2520–2532.

5. 論文・発表

1. Encapsulation of multiple enzymes within a microgel via water-in-water emulsions for enzymatic cascade reactor, Yota Okuno, Yasuhiko Iwasaki, 2024 KSBM Fall Meeting and Tutorial Symposium
2. 温度応答性グラジエント型ペプチドが形成する分子集合体とその特性, 安田朱里, 奥野陽太, 西村智貴, 岩崎泰彦, 日本化学会第105 春季年会

6. その他

特に無し。