

カーボンナノチューブとタンパク質の相互作用

岩下 和輝*・亀田 倫史・白木賢太郎

はじめに

カーボンナノチューブ (CNT) はユニークな光学的・電気的特性を示すため、治療や診断などへの新しい応用が期待されている。しかし、CNTの生体内での動態に関しては現在でも不明な部分が多く、生体内輸送の制御や安全性などの観点から、その全容解明が求められている。ここ10年の研究によって、生体内環境に暴露されたCNTなどのナノ粒子はタンパク質によって速やかに覆われることがわかり、このタンパク質の吸着層がナノ粒子の生体内動態を決定する重要な因子であることが明らかになってきている¹⁾。したがって、CNTの生体内動態を理解するためには、CNTとタンパク質の相互作用の原子レベルでの理解が必要であると考えている。

本稿では、まず、タンパク質の構成要素であるアミノ酸とCNTの相互作用を実験的に測定する手法を紹介する。さらに、分子動力学などのシミュレーションを用いた研究例についても紹介する。最後に、これらの相互作用の理解によって明らかになってきたCNTに対するタンパク質の吸着現象の原理について考察したい。

芳香族アミノ酸

タンパク質の表面は形状や性質が不均質で、他の分子との吸着には水素結合や静電相互作用、疎水性相互作用、ファンデルワールス力などのさまざまな因子が関連する。これらの相互作用はもとをたどるとタンパク質を構成する20種類のアミノ酸が担っているため、CNTとタンパク質との相互作用を理解するために、アミノ酸レベルでの分析が一つの手段になるだろう。

CNTは不溶性であるため、水溶液中でCNTとアミノ酸を分析するためには、分散剤 (界面活性剤など) の添加や化学修飾によってCNT表面を親水化する必要がある。しかし、このような処理によってアミノ酸とCNTとの本来の相互作用は変化する可能性がある。そこで筆者らは、分散剤を用いない分析系として、カラムクロマトグラフィの利用を考えた²⁾。具体的には、CNTをカラム充填剤であるシリカ担体の表面に固定し、このCNTカラムにアミノ酸を流すことでアミノ酸とCNTとの相互作用を分析した (図1A)³⁾。なお、CNTはシリカ表面

に非共有結合で固定されるため、CNT本来の特性を保持させることができる。

CNTカラムとCNTを固定していないカラムを用いて、L-アミノ酸の保持係数を比較した (図1B)。保持係数が大きいほど、アミノ酸とカラム充填剤との相互作用が強いことを意味する。芳香族アミノ酸 (Trp, Tyr, Phe) は対角線から外れており、その他の疎水性アミノ酸に比べてCNTと強く相互作用することが明らかになった。CNTに対する親和性の高さはTrp > Tyr > Pheの順であった。これらのアミノ酸は、側鎖に芳香環を有するため、CNTとの相互作用の主な駆動力は π - π 相互作用であると考えられる。一方、脂肪族側鎖を持つアミノ酸では、両カラム間での保持係数の差がなかったことから、CNT表面に対するアルキル鎖の疎水性相互作用の寄与は小さいといえる。

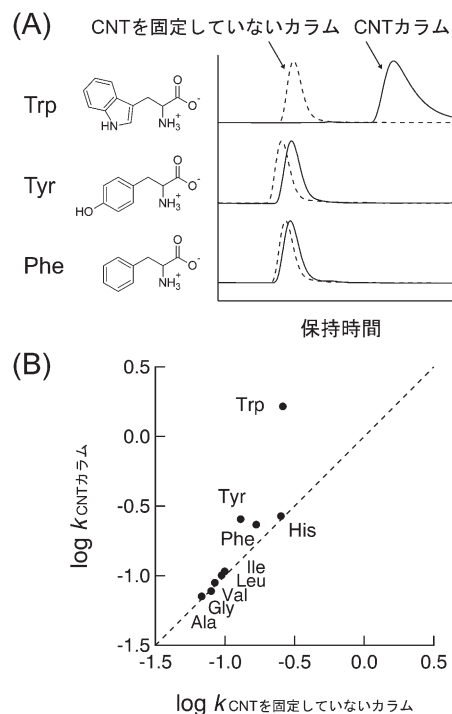


図1. CNTカラムを用いたクロマトグラフィによるCNTと疎水性アミノ酸の相互作用の分析。(A) 芳香族アミノ酸の構造とクロマトグラム。(B) 疎水性アミノ酸の保持係数 (k) の相関。対角線上にあるアミノ酸は、CNTに対して相互作用しないことを表す³⁾。

*著者紹介 筑波大学大学院数理物質科学研究科 ((独) 日本学術振興会特別研究員) E-mail: s1630103@s.tsukuba.ac.jp

以上のような実験による分析のほかに、最近では全原子シミュレーションを用いた相互作用の精密な調査も行われている。HeとZhouは、20種類のアミノ酸に関して、水溶液中のCNTに対する相互作用エネルギーを分子動力学シミュレーションで調べた⁴⁾。この結果でも実験と同様に、芳香族アミノ酸が水溶液中でCNTに対して強い親和性を持つことが再現されている。芳香族アミノ酸側鎖はCNT表面と平行に配向して相互作用しており、CNT表面への強い吸着は π - π 相互作用によると考えられる。

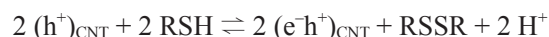
荷電性アミノ酸

CNTと荷電性アミノ酸側鎖との相互作用を調べるための、ホモポリペプチド（ポリ-L-Arg, ポリ-L-Lys, ポリ-L-Glu）によるCNTの分散の結果が報告されている⁵⁾。水溶液中への分散量を比較したところ、ポリ-L-Argがポリ-L-Lysやポリ-L-Gluよりも高い分散効果を示すことがわかった。ポリ-L-Argはたった5残基であってもCNTに対する一定の分散力を示したのは興味深い。分子動力学シミュレーションの結果によると、Arg側鎖のグアニジニウム基が π 電子による相互作用（ π - π , カチオン- π ）あるいは疎水性相互作用によってCNT表面と強く相互作用していた（図2）。一方、Lys側鎖はアルキル鎖を介してCNT表面と疎水性相互作用しており、側鎖末端のアミノ基は溶媒に配向していた。HeとZhouらの分子動力学シミュレーションによる研究でも、Argは他の芳香族アミノ酸と同様にCNTに対して強い結合力を持つことが明らかになっている⁴⁾。すなわち、Argは親水性が高

いにもかかわらず、芳香族性および疎水性が高いCNTに結合するという、他のアミノ酸には見られない特徴を持つ。CNTとタンパク質の相互作用の研究では、CNTと π - π 相互作用できる芳香族アミノ酸が注目される傾向にあるが、塩基性アミノ酸であるArg側鎖のグアニジニウム基は特にCNTに強く結合できるのだらう。

システイン

先述の物理的な吸着だけでなく、化学反応もCNTとタンパク質の相互作用の重要な因子になる。平野らは、CNTカラムを用いて、Cysのオンカラム酸化還元反応を測定した⁶⁾。CysをCNTカラムに流し、溶出物を分析した結果、溶出物はCysの酸化型であるシスチン（Cys-Cys）であることが質量分析や吸光スペクトルによって明らかになった。チオール（RSH）の酸化が抑制される酸性条件下でさえ、CNT表面ではチオールの分子間にジスルフィド結合（RSSR）が形成されるのは興味深い。この酸化還元反応は次のように表される。



ここで、 h^+ と e^- はそれぞれCNT中の正孔（ホール）と電子を意味する。

ところで、Cysは一般的な希薄水溶液中でCNTと化学的に反応する唯一の天然アミノ酸だと考えられている。実際に、8つの遊離Cys残基を持つ還元型のニワトリ卵白リゾチームはCNTを還元することが報告されている⁶⁾。つまり、CNTは生体内に入ると遊離Cys残基を有するタンパク質の化学構造に影響を与える可能性がある。

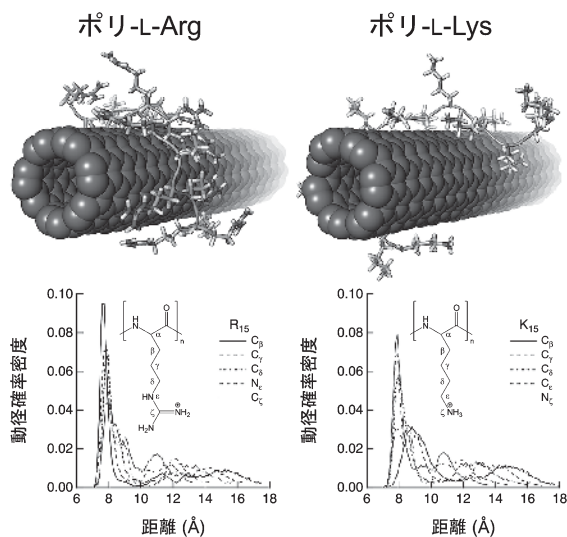


図2. CNTに吸着した15残基のポリペプチドの構造と動径分布関数。左、ポリ-L-Arg。右、ポリ-L-Lys⁵⁾。

リゾチーム

ニワトリ卵白リゾチーム（以下リゾチーム）はCNTを水溶液に効率よく分散させるタンパク質として知られている。水溶液中でCNTとともに超音波で処理すると、リゾチームは擾乱と熱によって一時的に変性する。その結果、リゾチームは露出した疎水性アミノ酸側鎖を介してCNTに不可逆に吸着する^{7,8)}。天然状態のリゾチームの内部には、Trp28, Trp108, Trp111, Tyr23, Met105からなる疎水性コアがあり、これらがCNTと相互作用していると考えられる⁹⁾。

疎水性アミノ酸のほかに、塩基性アミノ酸もリゾチームのCNTへの吸着に重要な役割を担っているようである。リゾチームはその分子表面に11個のArgを持っていて。上述したように、ArgはCNTに対して強く相互作用するので、リゾチーム表面のArg残基もCNTへの

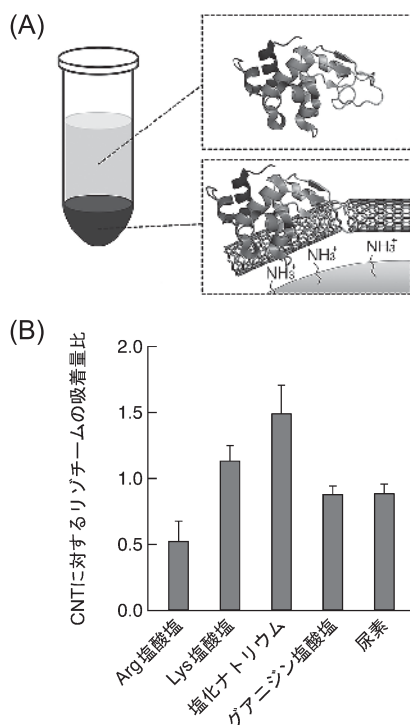


図3. CNTを固定した担体を用いたリゾチムの吸着試験。(A) バッチ法. CNTを固定した担体に対するタンパク質の上澄み濃度を測定し, 吸着量を見積もった。(B) 1 Mの添加剤を含む溶液中のCNTに対するリゾチムの吸着量. 添加剤を含まない溶液中の吸着量で規格化した¹²⁾.

吸着に寄与すると考えられる. 実際, 分子動力学シミュレーションによると, リゾチム表面のArg21とArg112がCNTを「ピンセット」のように挟み込む描像が報告されている¹⁰⁾. 他にも, NepalとGeckelerは, リゾチム表面にあるArgやLysが, 酸化したCNT表面に存在するカルボキシ基と静電相互作用することを報告している^{8,11)}.

このような議論を踏まえると, 過剰のArgを溶液に添加することで, リゾチムとCNTの相互作用を阻害することもできるだろう. そこで筆者らは, Arg水溶液中でCNTに対するリゾチムの吸着量が減少するのを実験的に調べた(図3)¹²⁾. 1 MのArgをあらかじめ含む水溶液にCNTを固定した担体を懸濁させておき, リゾチムを加えて攪拌した. その後, 遠心分離によって得られた上澄み溶液のタンパク質濃度から吸着量を見積もった(図3A). Argを添加しない溶液と比べて, 1 M Argを含む溶液ではCNTに対するリゾチムの吸着量は約半分に低下した(図3B). 興味深いことに, こ

のような効果は, 同じ塩基性アミノ酸のLysでは得られず, 変性剤として知られる Guanidiniumや尿素よりも優れていた. ArgはCNT表面だけでなく, 芳香族化合物全般と相互作用することが知られている¹³⁾. したがって, 添加したArgはCNT表面だけでなくリゾチムの芳香族アミノ酸残基にも結合することで, CNTとリゾチム間の相互作用を効果的に抑制したと考えられる.

おわりに

本稿では, CNTとタンパク質との相互作用について, CNTカラムによる実験的な側面と, 分子動力学シミュレーションによる理論的な側面を中心に紹介した. CNTに対するタンパク質の吸着の主な推進力は, 芳香族アミノ酸側鎖とArg側鎖を介した疎水性相互作用や, π - π 相互作用, カチオン- π 相互作用であると考えられる.

本稿で紹介した研究の動機は, CNTに対するタンパク質の吸着反応の原理を解明することであった. このような基礎的な相互作用を明らかにしていくことで, 産業的に価値の高い技術を生み出すこともできるだろう. たとえば, 本稿で紹介したような, CNTからタンパク質を溶出するためにArg水溶液を利用するような着想は, その典型である. その他に, 今回紹介したCNTカラムを利用した新たなバイオテクノロジー応用も実現するだろう. たとえば, 芳香族アミノ酸を表面に豊富に含むタンパク質をCNTカラムで特異的に分離したり, CNT表面でのCys側鎖の酸化還元反応を利用してタンパク質の構造をオンカラムで制御したりするなど, タンパク質の分離や精製に利用できると考えている.

文 献

- 1) Hadjidemetriou, M. and Kostarelou, K.: *Nat. Nanotechnol.*, **12**, 288 (2017).
- 2) Fujigaya, T. *et al.*: *Carbon*, **49**, 468 (2011).
- 3) Iwashita, K. *et al.*: *Langmuir*, **31**, 8923 (2015).
- 4) He, Z. and Zhou, J. *et al.*: *Carbon*, **78**, 500 (2014).
- 5) Hirano, A. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **20**, 4922 (2014).
- 6) Hirano, A. *et al.*: *Nanoscale*, **9**, 5389 (2017).
- 7) Matsuura, K. *et al.*: *Chem. Phys. Lett.*, **429**, 497 (2006).
- 8) Nepal, D. and Geckeler, K. E.: *Small*, **2**, 406 (2006).
- 9) Horn, D. W. *et al.*: *J. Phys. Chem. C*, **116**, 10341 (2012).
- 10) Calvaresi, M. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **18**, 4308 (2012).
- 11) Nepal, D. and Geckeler, K. E.: *Small*, **3**, 1259 (2007).
- 12) Iwashita, K. *et al.*: *Chem. Lett.*, **45**, 952 (2016).
- 13) Hirano, A. *et al.*: *J. Phys. Chem. B*, **114**, 13455 (2010).