17112

ナノカーボン表面上での蛋白質コロナの形成機構の解明

Mechanistic Insight into Protein Corona Formation
on Nanocarbon Materials

研究代表者 Research leader: 平野 篤 Atsushi HIRANO

産業技術総合研究所ナノ材料研究部門 主任研究員

Nanomaterials Research Institute, Advanced Industrial Science and Technology,

Senior Researcher

E-mail: hirano-a@aist.go.jp

抄 録

カーボンナノチューブ (CNT) などのナノ材料は生体内への取り込み過程の初期段階において蛋白質によって速やかに覆われることが知られている。このようなナノ材料表面の蛋白質の吸着層は蛋白質コロナと呼ばれており、ナノ材料の生体内動態や有害性などに影響を与える。しかし、蛋白質コロナ形成過程におけるナノ材料と蛋白質の相互作用については現時点では不明な点も多い。本研究では、CNT が表面に高密度の蛋白質吸着層を形成し、かつ、吸着した蛋白質を酸化させる作用を有することを明らかにした。この酸化機構はナノ材料の生体内動態に関する基礎知見として役立つと期待される。

ABSTRACT

Nanomaterials, including carbon nanotubes (CNTs), are coated by proteins in early stages of their uptake into biological systems. The protein layers around the nanomaterial surfaces are called protein corona, which determines the fate pathways and biological impacts of the nanomaterials. However, little is known about interactions of proteins with the nanomaterials during protein corona formation. In this work, we discovered that CNTs form thick and dense protein layers on their surfaces and induce oxidative stress on the proteins. The proposed protein oxidation mechanism will advance the fundamental understanding of the biological safety and toxicity of nanomaterials.

研究背景と目的

ナノ材料は生体内に取り込まれると、その表面は速やかに蛋白質によって覆われ、蛋白質コロナと呼ばれる層が形成される (Ge C. et al.,

2011)。蛋白質コロナは材料の生体内動態に極めて大きな影響を与え、安全性や有害性と深く関連している。たとえ同一の材料であっても蛋白質コロナの組成や構造が異なると、細胞への取り込み経路が変わることが報告されている

(Albanese et al., 2014).

本研究では、ナノ材料の安全性の担保や対策への貢献を目的に、蛋白質コロナの形成機構の解明を目指した。研究対象のナノ材料としては、カーボンナノチューブ (CNT) を使用した。

研 究 方 法

1. CNT-蛋白質複合体の酸化還元反応

CNT 周囲の蛋白質吸着層の緻密性を評価するために、蛋白質のひとつであるウシ血清アルブミン (BSA) を吸着させた CNT の水溶液中での酸化還元反応を赤外光吸収スペクトル測定によって観察した。酸化還元反応には主として pH 変化を利用した。一般に、酸性ほど溶存酸素による CNT の酸化が進み、CNT の E₁₁ バンドに相当する赤外光吸収スペクトル強度の低下が生じる。なお、本研究で使用した CNT は HiPco 法によって合成されたものである。

2. CNT と蛋白質の酸化還元反応

CNT と蛋白質 (あるいはアミノ酸) の間に生じる酸化還元反応を赤外光吸収スペクトル測定によって観察した。一般に、蛋白質から CNT に電子が受け渡されることによって、CNT の E₁₁ バンドに相当する赤外光吸収スペクトル強度の増加が生じる。この強度変化を経時的に測定することで、酸化還元反応の進行度を調べた。なお、共存する CNT 試料由来の鉄イオンの影響を調べるために、鉄イオンの補足剤 (キレート剤) であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の添加の効果も調べた。

研 究 成 果

1. CNT-蛋白質複合体の酸化還元反応

CNT は水溶液中で式 (1) の酸化還元反応を示す (Zheng, M. and Diner, B.A., 2004)。

この反応には溶存酸素とプロトンが関与するため、反応の進行度は pH に大きく影響する。たとえば、pH が低い酸性ほど CNT は電子 (e⁻) を奪われる。一般に、表面の電子の受け渡しは吸着分子の存在によって抑制されるため、蛋白質吸着の緻密性を CNT の酸化還元反応の反応性の変化という視点から定性的に評価した (Nakayama et al., 2018)。

図 1 は BSA および界面活性剤のひとつであるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を吸着させた CNT の分散溶液 (それぞれ CNT-BSA と CNT-SDS) の赤外光吸収スペクトルを示している。両分散液においても pH の低下とともに E₁₁ バンド (940–1350 nm) のピーク強度が低下し、CNT の酸化が確認された。注目すべきは、CNT-SDS に比べて CNT-BSA のピーク強度の低下が小さい点である。比較のために、図 1(a, b) に見られるピーク I–III の pH 依存性を図 1(c–e) にプロットした。CNT-BSA は反応中点が pH 3 付近に観察されたのに対し、CNT-SDS は pH 5 付近であり、BSA が CNT の酸化反応を効果的に抑制していることが明らかになった。

CNT はバンドル化する過程で赤外光吸収スペクトルのブロード化が進む。ところが、CNT-BSA はエタノール添加によって凝集させた後も、E₁₁ バンドのスペクトルのピーク強度を十分に保持することが確認された (Nakayama et al., 2018)。この結果からも、BSA は CNT 表面に強固に吸着することが示唆される。

2. CNT と蛋白質の酸化還元反応

上記の実験によって、蛋白質は CNT の表面に吸着し、CNT と溶媒の間の酸化還元反応を抑制する効果をもつことが明らかになった。しかしながら、CNT と吸着蛋白質の間の化学反応については未知な点も多い。研究代表者は以前に、下記の式 (2) に従って、蛋白質のシステイン (Cys) 残基のスルフヒドリル基 (RSH 基) が CNT により酸化されることを示している (Hirano et al., 2017a; 2017b)。

Fig. 1 pH dependence of the absorbance spectra of SWCNT-BSA (a) and SWCNT-SDS (b), which were normalized to the absorbance at 625 nm. Normalized absorbances of SWCNT-BSA and SWCNT-SDS at peaks I (c), II (d), and III (e) as a function of pH. (Nakayama et al., 2018).

一方で、SH基の酸化は共存する遷移金属イオンによって進行することも知られており、CNTの合成時に利用される遷移金属触媒由来の残留遷移金属イオンが上記の反応に関与することが予測された。そこで、金属イオンのキレート剤であるEDTAを利用し、CNTとSH基の酸化還元反応における遷移金属イオンの効果を検証した (Hirano et al., 2019)。SH基を持つ化合物としては、アミノ酸のひとつであるL-システイン (Cys) を利用した。なお、使用したHiPco法のCNTは、触媒として鉄が利用されているため、鉄イオンが夾雑物として共存している。

図2にはCNT-SDSの分散溶液に、CysやEDTAのほか、人為的に鉄イオン (Fe^{3+} と Fe^{2+}) を添加した際の、1800 s後の赤外光吸収スペクトルを示す。無添加 (no additive) に比べ、Cys添加時にはスペクトルの E_{11} バンドのピーク強度の回復が観察された。これはCNTの還元(同時にCysの酸化)を示している。ところが、

CysとEDTAを同時に添加した際のピーク強度の回復は相対的に弱かった。この結果は、夾雑する鉄イオンが反応に関与していることを示唆している。一方、CysとEDTAと共に FeCl_3 を加えた際には、ピーク強度はCysのみの場合と同程度に回復した。しかしながら、容易に予想できるように、酸化剤である FeCl_3 (+EDTA) のみではピーク強度は著しく低下し、還元剤である FeCl_2 (+EDTA) のみではピーク強度は高い値を示した。

図2(b)には、1250 nm付近のピークの相対強度 (θ_{CNT}) の経時変化を示す (θ_{CNT} は全CNTに対する還元型CNTの割合に相当)。Cysのみに比べ、CysとEDTAを同時に添加した際には、 θ_{CNT} 値の回復速度が著しく低下することが明らかとなった。特に注目すべきは、CysとEDTAと共に FeCl_3 を加えた際の結果である。 θ_{CNT} 値は観測できないほどの短時間で0.1付近まで低下したのち、1000 sほどで0.9付近まで急激に回復した。この結果は、反応初期には Fe^{3+} がCNTを酸化させる反応が優先されるものの、一部の Fe^{3+} はCysを酸化させ、 Fe^{2+} に変化し、それがCNTを還元させたことを示唆

Fig. 2 Redox reaction of the CNTs with Cys. (a) Representative absorption spectra of the CNTs in the S_{11} and S_{22} regions under different conditions more than 1800 s after sample preparation. The concentrations of Cys, FeCl₃, FeCl₂, and EDTA used in this experiment were 100 μM , 50 μM , 50 μM , and 10 μM , respectively. (b) Time courses of fractional concentrations of the reduced CNTs (θ_{CNT}). The fractional concentration of the reduced CNTs (θ_{CNT}) was defined as the equation $\theta_{\text{CNT}} = [\text{CNT}]/([\text{CNT}] + [\text{CNT}^+])$. The concentrations of the additives were identical to those used in the experiment described in panel a. (c) Time courses of the value of θ_{CNT} in the different concentrations of Cys along with 50 μM FeCl₃. Reprinted with permission from (Hirano et al. (2019)). Copyright 2019 American Chemical Society.

Fig. 3 Numerical simulation of the redox reaction of Cys with CNTs mediated by iron ions. The redox reaction of CNTs via the $\text{O}_2, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ couple was ignored in the simulations because the change in pH in the experiments was insignificant. (a) A suggested reaction scheme described with the reaction rate parameters (k) of the elementary processes, where the values of k are as follows: $k_0 = 5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_1 = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, and $k_3 = 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (b) Time courses of the values of θ_{CNT} obtained from the numerical simulations under the different initial conditions described in the legend. The initial value of θ_{CNT} was set to 0.6. (c) Time courses of the values of θ_{CNT} under different initial conditions with the initial concentration of 50 μM Fe³⁺, as described in the legend. (d) Time courses of the concentration of each component obtained from the numerical simulation under the initial condition of 100 μM Cys and 50 μM Fe³⁺. (e) Time courses of the values of θ_{CNT} under different initial conditions with the initial concentration of 100 μM Cys, as described in the legend. (f) Time courses of the values of θ_{CNT} using the modified values of k described in the legend. Note that the data using $k_3 = 0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ almost overlapped with the data using the default value throughout the time period. Reprinted with permission from (Hirano et al. (2019)). Copyright 2019 American Chemical Society.

している。このような Cys が仲介した反応の妥当性は図 2(c) に示した θ_{CNT} 値の回復の Cys 濃度依存性からも支持される。

そこで、図 3(a) に示す反応モデルを想定した。なお、反応速度については各素反応の観測により決定した。その結果、図 3(b, c) に示すように、図 2(b, c) の実験結果を十分に再現する結果が得られた。この結果をもとに、反応物と生成物の濃度の経時変化を抽出した結果、当初の予想通り、 Fe^{3+} の濃度の低下と共に Cys の濃度が低下し、一方で Fe^{2+} と Cys の酸化物であるシスチン (Cys–Cys) の濃度が増加することが示された (図 3(d))。 Fe^{3+} の触媒効果は、 Fe^{3+} の濃度依存性の結果からも明確であり (図 3(e))、 Fe^{3+} の共存によって Cys による CNT の還元が著しく早まることが明らかになった。なお、 Fe^{3+} 添加時に見られる反応初期の CNT の酸化は Fe^{3+} による直接的な反応であるため、反応速度 (k_1, k_2) に大きく依存する一方、その後の CNT の還元は Cys を介した間接的な反応であるため、反応速度 (k_0) に大きく依存する (図 3(f))。

以上のような CNT と Cys の酸化還元反応は Cys 残基を有するモデル蛋白質においても観測された (Hirano et al., 2019)。このように、CNT と蛋白質の酸化還元反応は従来提案されていた直接的な電子移動のほかに、残留遷移金属イオンの触媒反応に起因するものが存在することが明らかになった (図 4)。そのほかに、CNT による蛋白質の酸化反応は、夾雑する遷移金属によって発生する活性酸素種 (ROS) に起因することも提案されており (Ge C. et al., 2012)、これらの反応が並行して蛋白質の酸化を進めることが想定される。

3. まとめ

生体内に取り込まれた CNT は速やかに蛋白質に覆われ、蛋白質コロナを形成するが、蛋白質コロナ形成による CNT や蛋白質そのものの物性変化については、これまで不明な点が多かった。今回の成果によって、蛋白質は CNT

Fig. 4 A scheme of redox reactions of the CNTs with proteins. The reactions include iron-mediated redox reaction, direct electron transfer and ROS-mediated redox reaction via the Fenton reaction. Reprinted with permission from (Hirano et al., 2019). Copyright 2019 American Chemical Society.

の表面全体に密に吸着し、CNT への溶媒のアクセスを抑制する効果があること、さらには、蛋白質の Cys 残基は共存する遷移金属イオンの媒介によって CNT の還元を効果的に進めると同時に Cys 残基の酸化が進むことが明らかになった。これらの知見は、ナノ材料の生体内動態に関する基礎知見として大いに役立つと期待される。

参考文献

- Albanese A., Walkey C.D., Olsen J.B., Guo H., Emili A., Chan W.C.W., Secreted biomolecules alter the biological identity and cellular interactions of nanoparticles, *ACS Nano*, 8 (2014) 5515–5526.
<https://doi.org/10.1021/nn4061012>
- Ge C., Du J., Zhao L., Wang L., Liu, Y., Li D., Yang Y., Zhou R., Zhao Y., Chai Z., Chen C., Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 16968–16973.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1105270108>
- Ge C., Li Y., Yin J.-J., Liu Y., Wang L., Zhao Y., Chen C., The contributions of metal impurities and tube structure

- to the toxicity of carbon nanotube materials, NPG Asia Materials, 4 (2012) e32.
<https://doi.org/10.1038/am.2012.60>
- Hirano A., Kameda T., Sakuraba S., Wada M., Tanaka T., Kataura H., Disulfide bond formation of thiols by using carbon nanotubes, Nanoscale, 9 (2017a) 5389–5393.
<https://doi.org/10.1039/c7nr01001j>
- Hirano A., Kameda T., Wada M., Tanaka T., Kataura H., Carbon nanotubes facilitate oxidation of cysteine residues of proteins, The Journal of Physical Chemistry Letters, 8 (2017b) 5216–5221.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.7b02157>
- Hirano A., Wada M., Tanaka T., Kataura H., Oxidative stress of carbon nanotubes on proteins is mediated by metals originating from the catalyst remains, ACS Nano, 13 (2019) 1805–1816.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07936>
- Nakayama T., Tanaka T., Shiraki K., Hase M., Hirano A., Suppression of single-wall carbon nanotube redox reaction by adsorbed proteins, Applied Physics Express, 11 (2018) 075101 (5pp).
<https://doi.org/10.7567/APEX.11.075101>
- Zheng M., Diner B.A., Solution redox chemistry of carbon nanotubes, Journal of the American Chemical Society, 126 (2004) 15490–15494.
<https://doi.org/10.1021/ja0457967>

外部発表成果

論文発表

1. Hirano A., Wada M., Tanaka T., Kataura H., Oxidative stress of carbon nanotubes on proteins is mediated by metals originating from the catalyst remains, ACS Nano, 13 (2019) 1805–1816.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07936>
2. Nakayama T., Tanaka T., Shiraki K., Hase M., Hirano A., Suppression of single-wall carbon nanotube redox reaction by adsorbed proteins,

Applied Physics Express, 11 (2018) 075101 (5pp). <https://doi.org/10.7567/APEX.11.075101>

口頭・ポスター発表

1. 平野 篤, 和田 百代, 田中 丈士, 片浦 弘道, “カーボンナノチューブによるタンパク質の酸化反応における触媒由来金属の効果”, 第55回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム (Sendai, Sept. 11, 2018) 1-1.