

# Blockmaster™のタンパク質安定化効果およびそのメカニズム

## Study on Protein Stabilization Effect of Blockmaster™ and Its Mechanism

徐 盈佳\*<sup>1</sup> 新井 隆之\*<sup>2</sup> 宮路 正昭\*<sup>3</sup>  
Yingjia Xu Takayuki Arai Masaaki Miyaji

Blockmaster™ DB1130 and PA1080, which are water soluble synthetic polymers, exhibited drastic improvement of protein stability in our study. Addition of DB1130 or PA1080 maintained reactivity of pepsinogen (I) (II) at a high level after freeze-thaw cycles or thermal aging test. An excellent effect on suppressing thermal denaturation of prostate specific antigen (PSA) was also confirmed. The mechanism of protein stabilization was investigated by means of Quartz Crystal Microbalance (QCM), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Surface Plasmon Resonance (SPR) and it was clarified as follows: (a) Blockmaster™ prevented protein adsorption on vessel surface (b) Blockmaster™ provided proper interaction assisting protein folding in buffer solution. Blockmaster™ DB1130 and PA1080 are lot-to-lot consistent and virus/animal protein free, which are superior to biological products such as bovine serum albumin (BSA) or casein. They are expected as new choices of protein stabilizer for immunoassay, biological reagents, industrial enzymes and so on.

### 1 はじめに

タンパク質はいくつものアミノ酸が結合し構成される物質であり、そのアミノ酸配列によって高次構造が定められ、様々な機能を発現できるようになる<sup>1)</sup>。しかし、この高次構造の大部分がファンデルワールス力、水素結合、疎水性相互作用、静電相互作用などの弱い相互作用により成り立つため、温度、圧力、pHや塩濃度など僅かな環境変化で構造が変化し、タンパク質本来の機能を失うことが知られている。特に、体外診断薬や生物学的製剤に使われている抗原、抗体、ワクチンに含まれる弱毒化された細菌やウイルスおよび産業用酵素などの機能発現にタンパク質の高次構造維持が必須であり、その安定化技術は極めて重要である。

このような背景からタンパク質の変性を抑制するため、様々な安定化剤が用いられてきた。例えば、牛血清アルブミン (BSA)、糖、アミノ酸、酸化防止剤など挙げられる。

しかしながら従来のタンパク質安定化剤にはいくつかの課題があった。まず、それらを添加してもタンパク質が長期保存や凍結融解などの工程に耐えず、変性してしまうことが報告されている<sup>2)</sup>。また、BSAやカゼインなどには生物由来原料の汚染やロット間差があるなどのデメリットがある。

我々はBlockmaster™ DB1130およびPA1080を免疫診断分野におけるタンパク質や脂質の非特異吸着を防止するブロッキング剤として製品化してきた。Table 1にBlockmaster™の応用例とその特徴をまとめた。DB1130はラテックス試薬や化学発光試薬のブロッキング剤<sup>3,4)</sup>あるいはバックグラウンドを低減させるための添加剤として使用されている。一方、PA1080はプレートやメンブレンへのブロッキング剤として使用され、タンパク質の吸着防止や細胞接着防止に効果的であることが認められ、マイクロ流路<sup>5)</sup>や三次元培養<sup>6)</sup>にも展開されている。両製品は化学合成した水溶性ポリマーであるため、ウイルスやタンパク質の混入がない。更に、Figure 1(a)に示すように異なるロットのDB1130でブロッキングしても試薬の検量線は同一カーブ上にあるのに対し、異なるロットのBSAでブロッ

\*1 2011年入社 筑波研究所

\*2 2008年入社 筑波研究所

\*3 1995年入社 筑波研究所

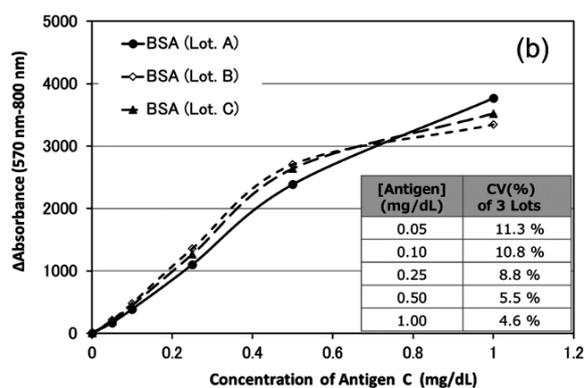
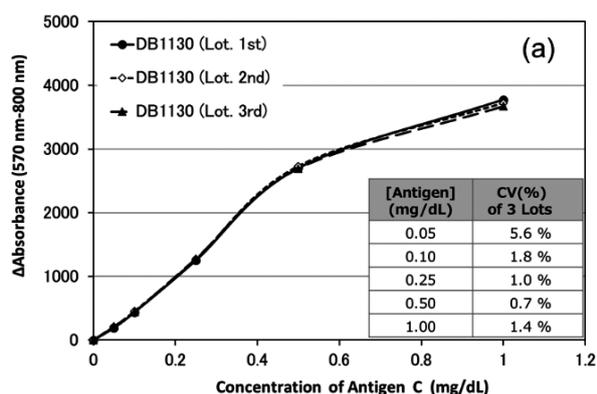


Figure 1 Dose-response curves of PoAb item C (latex immunoassay) (37 °C , 7 days). (a) Lot-to-lot consistency of DB1130 (b) Lot-to-lot variation of BSA.

Table 1 Application list of DB1130 and PA1080 in immunoassay

	DB1130	PA1080
Type of bonding with matrix	Physical adsorption	
Application		
Blocking reagent for latex beads	○	/
Blocking reagent for magnetic beads (CLEIA)	○	/
Additive in R1 or R2 to decreasing background (Latex, CLEIA)	○	/
Blocking reagent for western blotting or immunochromatography	/	○
Prevention of cell adhesion	/	○

○: Recommend /: No data

キングした試薬の検量線にはバラツキがあり、CV値(変動係数)が大きかった(Figure 2 (b)). すなわち、Blockmaster™の品質が安定している為ロット差も少ないという特徴があり、生物由来の製品より優れている<sup>3)</sup>.

最近、著者らはBlockmaster™ DB1130およびPA1080の新たな機能として「タンパク質安定化効果」を見出した。特に、免疫診断分野に使われている抗原(ペプシノーゲン(I)(II)、前立腺特異抗原)の安定化に有効であることが確認できた。更に、これらのタンパク質安定化メカニズムの解析を行ったので、本論文で報告する。

## 2 実験

### 2.1 材料

タンパク質安定化剤としてBlockmaster™ DB1130, PA1080を使用した。比較のために、ウシ血清アルブミン

(BSA, FractionV) (Sigma-Aldrich) とスクロース(富士フイルム和光純薬)を用いた。試験タンパク質はペプシノーゲン(Pepsinogen, PG) (I), (II)と前立腺特異抗原(Prostate Specific Antigen, PSA)を用いた。希釈用リン酸緩衝液はD-PBS (-) (富士フイルム和光純薬)を使用した。タンパク質の反応性を測定するため、自社で調製したラテックス試薬(PG (I), (II) 項目, PSA 項目)を使用した。タンパク質保存容器は低吸着ポリプロピレン(PP)チューブ 1.5 ml(住友ベークライト, MS-4265M), 汎用PPチューブ 1.5 ml(Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0030120086)およびガラスバイアル2.0 ml(東ソー)を使用した。

### 2.2 ペプシノーゲン(Pepsinogen, PG) (I), (II) 溶液の調製

低吸着PPチューブ 1.5 mlにBlockmaster™ 0.1 wt%のDB1130と0.1 wt% PA1080のPBS (-) 溶液をそれぞれ加えた。次に、PG (I), (II) を添加した。最終濃度をPG (I) = 250 ng/ml, PG (II) = 100 ng/mlに調製した。対照サンプルとして、低吸着PPチューブ 1.5 mlにBlockmaster™未添加でPG (I) (II) 溶液を加えた。サンプルを調製後から初期測定までに4 °Cで保存した。

### 2.3 前立腺特異抗原(PSA) 溶液調製

以下の手順で調整した。

(1) 汎用PPチューブにBlockmaster™ 0.1 wt%のDB1130と0.1 wt% PA1080のPBS (-) 溶液をそれぞれ加えた。次に、PSAを添加し、5つの濃度にした(0 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 80 ng/ml)。対照サンプルとして、汎用PPチューブ 1.5 mlにBlockmaster™未添加でPSA溶液を加えた。

(2) ガラスバイアルにPA1080の0.1 wt% PBS (-) 溶液を

入れ、PSAを添加し、最終濃度を80 ng/mlとした。

(3) 低吸着PP チューブに0.1 wt%のDB1130と0.1 wt% PA1080のPBS (-) 溶液をそれぞれ加えた。対照サンプルとして、同様なチューブにBlockmaster™未添加でPBS (-) 溶液を加えた。次に、3つのチューブにPSAを添加し、最終濃度を80 ng/mlとした。

## 2.4 抗原反応性評価試験

PBS (-) 中に存在する抗原(タンパク質)をラテックス粒子に固相化した抗体と反応させ、日立自動分析装置7180でラテックス粒子の凝集度合を測定した。得られた吸光度の変化( $\Delta$  Abs)が高いほど、溶液中の抗原反応性が高いと考えられる。また、反応性の変化により抗原の変性度合を判断した。初期測定はタンパク質溶液調製後から2時間以内実施した。加速試験は37℃加熱と同時に振とう(EYELA, FMC-1000)を実施し、経時で抗体反応性の変化を測定した。凍結融解試験はサンプルを-80℃で24時間以上凍結させた後、室温に静置し1時間以内に溶解、続けて素早く反応性評価を実施した。

## 2.5 基材への吸着および解離挙動評価

水晶発振子マイクロバランス法(QCM法)(アルバックAFFINIXQNPro, 型式: QCM2008-PRKIT)を用いてBlockmaster™ DB1130とPA1080のポリスチレン表面への吸着および解離挙動を評価した。1 wt%のBlockmaster™水溶液をポリスチレンでコートしたセンサーに滴下し、安定するまで1時間静置後に周波数変化を測定した。その後、PBS (-) バッファーで洗浄し、PBS (-) 中に2時間静置後、再度周波数を測定した。測定温度は25℃に設定した。

## 2.6 Blockmaster™ PA1080に含まれた水のDSC測定

示差走査熱量計(DSC, 日立ハイテック, DSC7000X)を用いて含水率7.9%および43.9%のPA1080サンプルを測定した。測定用アルミパンに3~5 mg程度のサンプルを入れ、液体窒素で-100℃付近まで冷却後5 degree/minで昇温した。PA1080の含水率は、「PA1080に含有している水の重量/サンプルの重量(PA1080+水)×100%」と定義した。

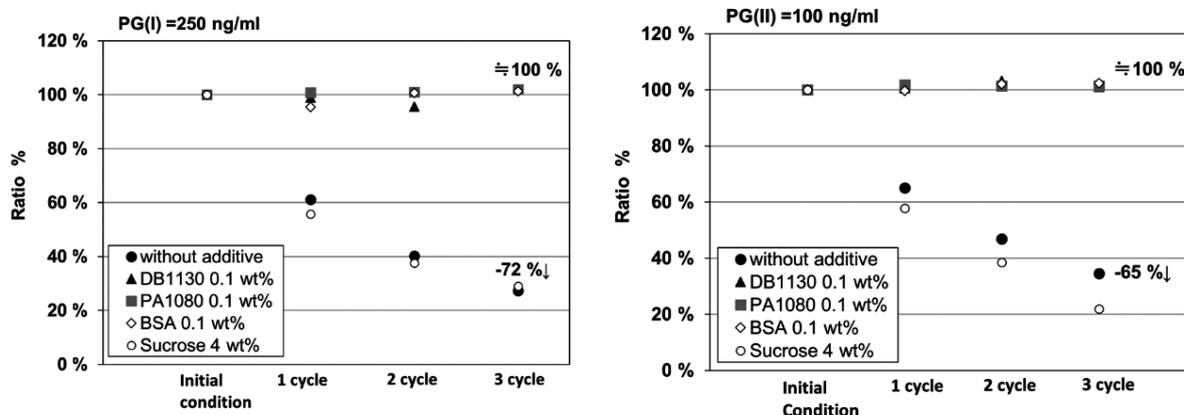
## 2.7 Blockmaster™ のタンパク質との相互作用の評価

表面プラズモン共鳴(SPR)装置(GEヘルスケア ライフサイエンス, BiacoreX100)を利用しBlockmaster™ DB1130とPA1080のタンパク質との相互作用を評価した。CM5センサーチップにはPSAをアミンカップリング法で固定化した(Target level: 1000RU)。異なる濃度(0.1 wt%~4 wt%)のDB1130とPA1080のPBS (-) 溶液を流動相とし、各溶液をPSAが固定化されたチップとリファレンスチップに流した。DB1130とPA1080のPBS (-) 溶液を流す前後のシグナル(RelResp.)変化を測定した(リファレンスシグナルを引いた値を使用した)。

## 3 結果と考察

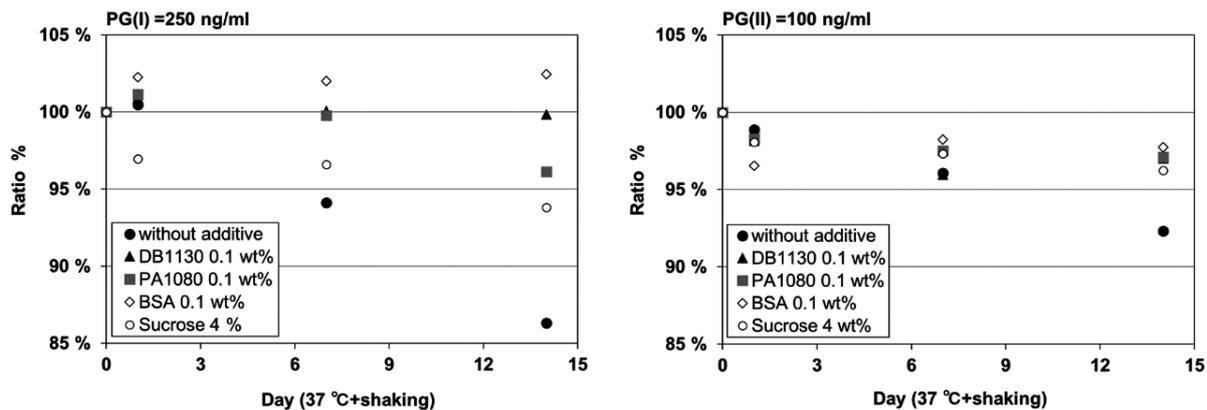
### 3.1 ペプシノーゲン (I), (II) への安定化効果

ペプシノーゲン (I), (II) を用いてBlockmaster™ DB1130, PA1080とBSAおよびスクロースの安定化効果を比較した。まず、凍結融解試験による反応性の変化をFigure 2に示す。添加剤なしサンプルでは、凍結融解試験1回後には試験前と比較し反応性が40%、3回後には



※Ratio (%) =  $\Delta$ Abs(After freeze-thaw)/ $\Delta$ Abs(Initial condition) × 100 %

Figure 2 Reactivity of PG (I) (II) after freeze-thaw 3 cycles in the presence of 0.1 wt% DB1130, 0.1 wt% PA1080, 0.1 wt% BSA and 4 wt% sucrose. PG (I) (II) were preserved in low adsorption tubes.



※Ratio (%) =  $\Delta\text{Abs}(\text{After thermal aging test}) / \Delta\text{Abs}(\text{Initial condition}) \times 100\%$

Figure 3 Reactivity of PG (I) (II) after thermal aging test in the presence of 0.1 wt% DB1130, 0.1 wt% PA1080, 0.1 wt% BSA and 4 wt% sucrose. PG (I) (II) were preserved in low adsorption tubes.

72%低下した。一方で、DB1130 (0.1 wt%) およびPA1080 (0.1 wt%) を添加した溶液では、凍結融解試験を3回繰り返した後も反応性が維持されたことが明らかとなった。この安定化効果はBSAと同等であった。一方、スクロース (4 wt%) を添加時は、未添加サンプルと同様に反応性が約70%低下し、本実験においては安定化効果が確認できなかった。

次に加速試験による反応性の変化をFigure 3に示す。PG (I) について、DB1130 (0.1 wt%) を添加した溶液では、0.1 wt%のBSA添加溶液と同様、2週間の加速試験後も反応性を高く維持できた。PA1080 (0.1 wt%) 添加の溶液は、2週間の加速試験で反応性は95%程度と若干低下しているが、スクロース添加や未添加時と比較して、安定性が向上していることが確認できた。PG (II) への安定化効果に

ついては、DB1130やPA1080の添加はBSA、スクロースの添加と同様であった。

### 3.2 材質の異なる容器におけるタンパク質安定化効果

タンパク質溶液の保存において、疎水性容器内壁への吸着やそれによる変性での活性低下が知られている。その対策として、吸着を抑制する低吸着PPチューブが利用されている。本研究では、汎用PPチューブやガラス容器であっても、DB1130やPA1080を添加することにより、容器内壁への吸着が抑制できることを確認した。

まず、実験項2.3で述べた方法により汎用PPチューブで保存した前立腺特異抗原 (PSA) (添加剤なし、0.1 wt% DB1130添加と0.1 wt% PA1080添加) の初期 (0日) 反応性を測定した。未添加サンプルに対して、0.1 wt% DB1130添加あるいは0.1 wt% PA1080添加の  $\Delta\text{Abs}$  は約4倍とな

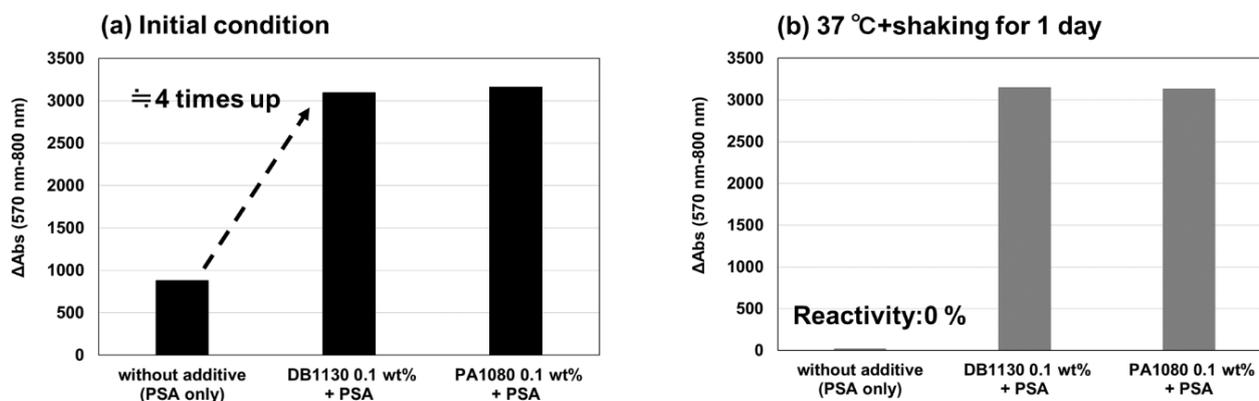


Figure 4 Reactivity of PSA (80 ng/ml) preserved in commercial PP tube with or without Blockmaster™ added. (a) initial condition (b) 37 °C with shaking for 1 day.

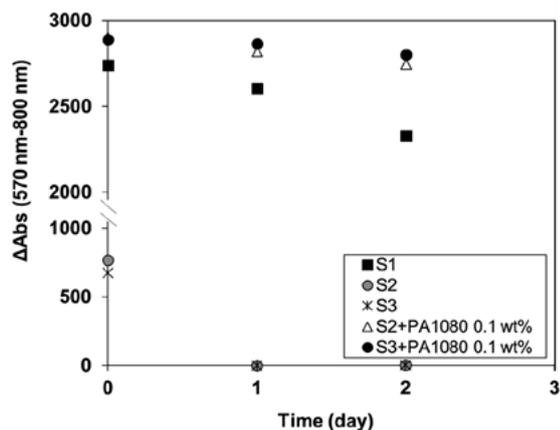


Figure 5 Reactivity change of PSA (80 ng/ml) during thermal aging test. PSA was preserved in different vessels respectively. (S1): low adsorption PP tube. (S2): commercial PP tube. (S3): glass vessel. Others: commercial PP tube with 0.1 wt% of PA1080 and glass vessel with 0.1 wt% of PA1080.

り、高い反応性を示した (Figure 4 (a)). ガラス容器でも同様の傾向が確認された。

次に、これらの試料の加速試験 (37 °C 振とう, 1 日間) を実施し、反応性を評価した。その結果、汎用 PP チューブやガラスバイアルであっても、DB1130 または PA1080 を添加すれば、反応活性はほとんど変化なく維持されることが明らかとなった (Figure 4 (b)). 添加剤を含まない試料では完全に失活したことに対し極めて対照的である。また、2 日間加速試験後の結果から、低吸着 PP チューブを用いた場合 (添加剤なし) より汎用 PP チューブやガラスバイアルに PA1080 を添加したサンプルの反応性が高いことが確認された (Figure 5)。DB1130 や PA1080 が容器の表面にコーティングされることにより、タンパク質の容器表面への吸着が抑制されるため、容器表面で起きるタンパク質の変性も抑制されたと示唆される。(詳細解析は 3.4 に述べる)。

### 3.3 前立腺特異抗原 (PSA) への安定化効果

汎用 PP チューブに保存した前立腺特異抗原 (PSA) を用いて DB1130, PA1080, BSA, およびスクロースの安定化効果を比較した。各濃度 (0 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 80 ng/ml) の PSA の初期反応性と加速試験 (37 °C 振とう 7 日間) 後の反応性を Figure 6 に示す。初期反応性では、前項 3.2 に述べたように未添加サンプルより DB1130 や PA1080 の添加系の反応性が高かった。スクロース (4 wt%) を添加しても反応性が低く未添加と同等だった。加速後の結果において、0.1 wt% DB1130 添加品の反応性は初期の反応性からほぼ低下せず、0.1 wt%

BSA 添加品と同等であった。0.1 wt% PA1080 添加品は約 8 % 低下したが、4 wt% スクロース添加品よりも安定化効果が高かった。

### 3.4 タンパク質安定化メカニズム解明

前項 3.1 ~ 3.3 の結果より、Blockmaster™ DB1130, PA1080 のタンパク質安定化メカニズムについて、下記の 2 つの仮説を立てた。仮説 1: Blockmaster™ がタンパク質の容器への吸着を抑制する。仮説 2: Blockmaster™ が溶液中のタンパク質表面との相互作用により、その高次構造を維持させる。

仮説 1 については、次のように考えた。Figure 7 に示すように PBS (-) 中のタンパク質は周囲を取り囲む水分子との相互作用 (水素結合) によって高次構造を保っている。しかし、容器の表面は疎水性が強く、タンパク質がそこに接触すると水和水の構造が乱れ、タンパク質の高次構造が壊れてしまい、変性が生じる。一方、Blockmaster™ を添加すると容器の疎水性表面にコートされ、タンパク質が容器の疎水性表面に直接に触れることを防ぐ。更に、Blockmaster™ は両親媒性のポリマーであり、豊富な中間水を保持することが予測され、タンパク質がポリマーと接触しても水和水の構造が壊れず、変性が起こりにくくなると考えられる。

仮説 1 を検証するため、まず、実験 2.5 に従い Blockmaster™ の疎水性基材に対する吸着および解離挙動を QCM で評価した。この測定では Figure 8 に示すように QCM センサー上に固定されたポリスチレン表面に対する Blockmaster™ の吸着量を評価でき、基材への吸着量は PA1080 が最も多かったことが明らかとなった (Figure 9 (a)). 一方、Control sample (他社水溶性ポリマー) は添加直後に基材へ少量吸着したが、時間経過とともに脱離が見られた。更に、全てのサンプルを緩衝液 PBS (-) で置換し、2 時間静置した結果、約 60 % の DB1130、約 80 % の PA1080 が基材に残存していることが明らかとなった (Figure 9 (b)). 以上の結果より、Blockmaster™ の疎水性基材に対する吸着効果が明らかとなった。また、DSC を用いて PA1080 中の水の構造を測定したところ、含水率 43.9 % の PA1080 サンプルにおいて昇温過程で -40 °C ~ -20 °C の間に低温結晶形成 (Cold crystallization) を示す特異な水の存在が観察された (Figure 10)。更に、ポリマーに含まれる中間水は 0 °C よりも低い温度で結晶形成し、0 °C よりも低い温度で融解することが知られている<sup>7),8)</sup>。この結果より、PA1080 は中間水を保持できることを明らかにした。以上から、疎水性基材に対して Blockmaster™ がコーティング

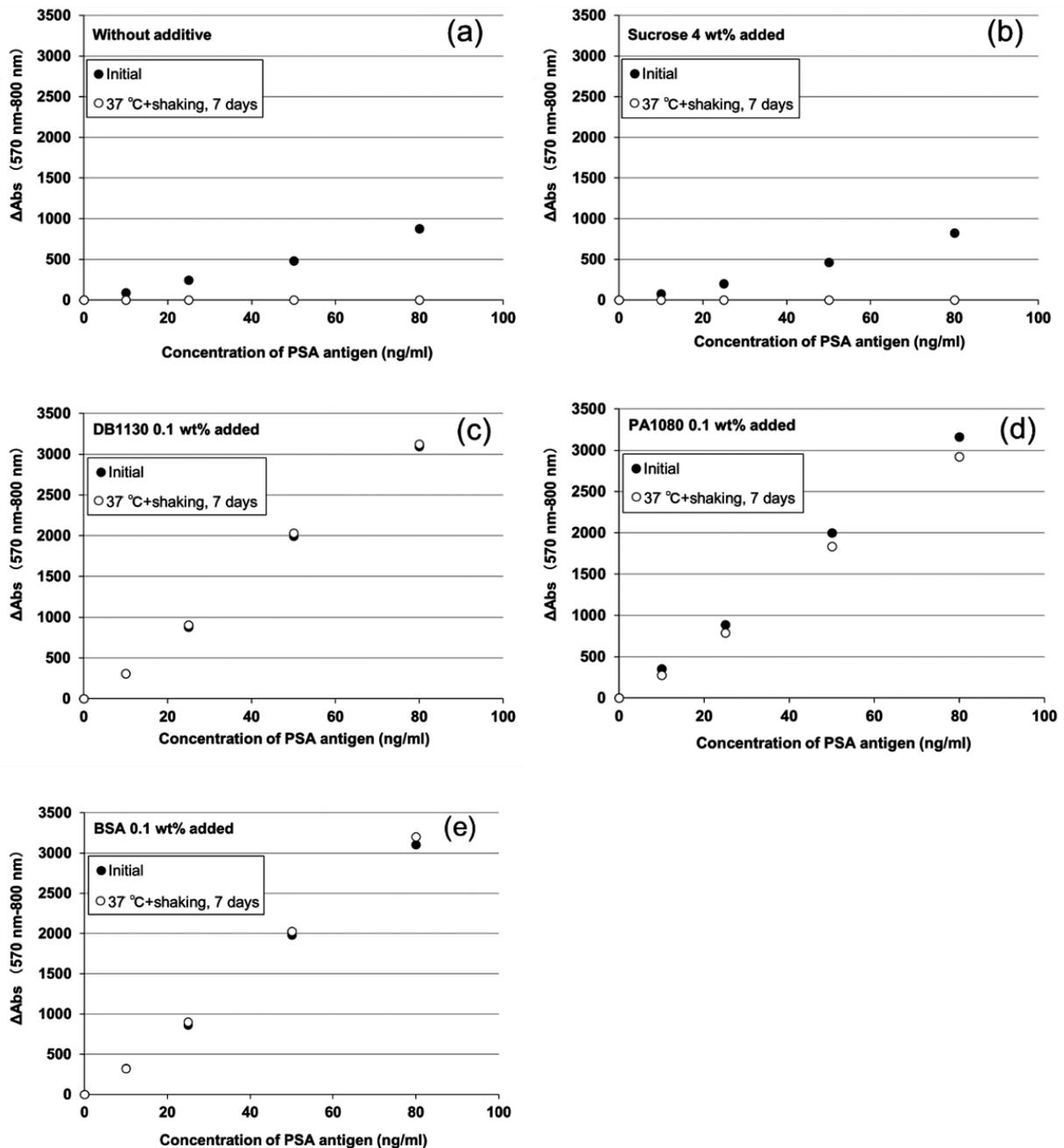


Figure 6 Reactivity of PSA with different concentrations in initial condition (●) and after thermal aging test (○). PSA was preserved in commercial PP tube with or without additives. (a) without additive (b) Sucrose 4 wt% added (c) DB1130 0.1 wt% added (d) PA1080 0.1 wt% added (e) BSA 0.1 wt% added.

され、この部分に中間水が存在することによりタンパク質の基材への吸着が抑制されることでタンパク質安定化効果を発現したと考えられる。

仮説2については、Ting Xuらがタンパク質とポリマーの相互作用が適切であれば、タンパク質の立体構造を安定化させられると提唱している<sup>9)</sup>。Blockmaster™においても、これらの疎水性セグメント、親水性セグメントがタンパク質表面にある疎水性部位、親水性部位と相互作用

することでタンパク質の高次構造維持を助けると推測した。そこでBlockmaster™とタンパク質との相互作用をSPR装置で検証したところ(実験2.7)、PSAが固定化されたセンサーチップにBlockmaster™のPBS(-)溶液を流す前後でのシグナル(RelResp.)変化が検出されたことから、ポリマーとタンパク質との相互作用が明らかとなった。また、Figure 11 (a)ではポリマー濃度の増加によりシグナル変化の上昇を確認した。更に、PSA-抗PSA抗体のよう

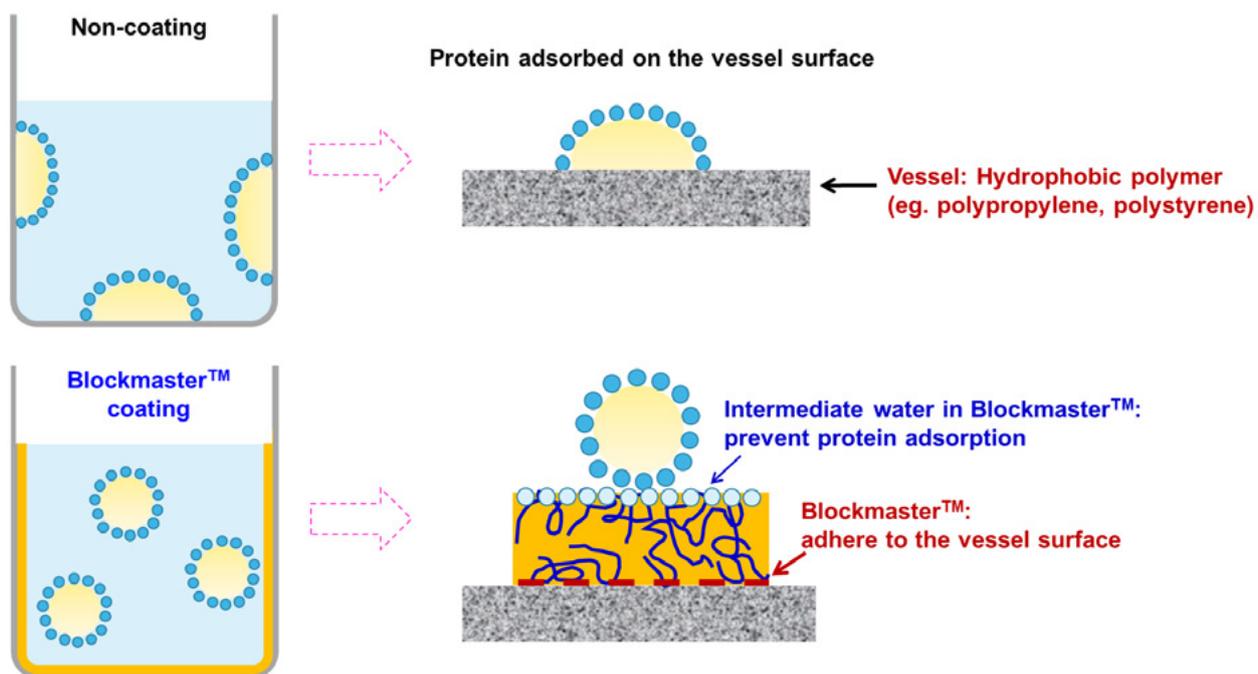


Figure 7 Illustrative images for protein adsorption prevention by Blockmaster™ DB1130 and PA1080 on vessel surface.

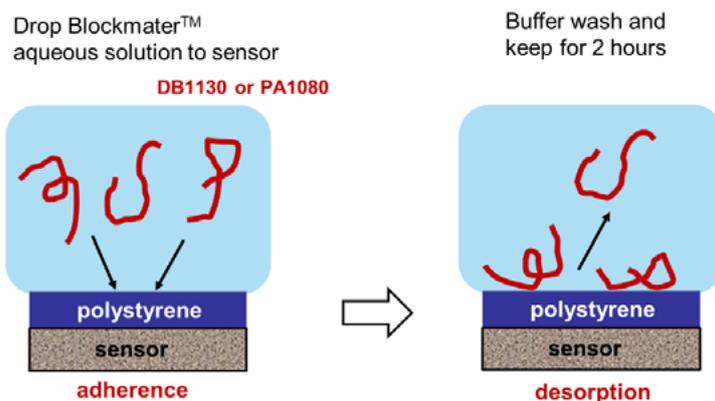


Figure 8 Schematic steps of QCM measurement.

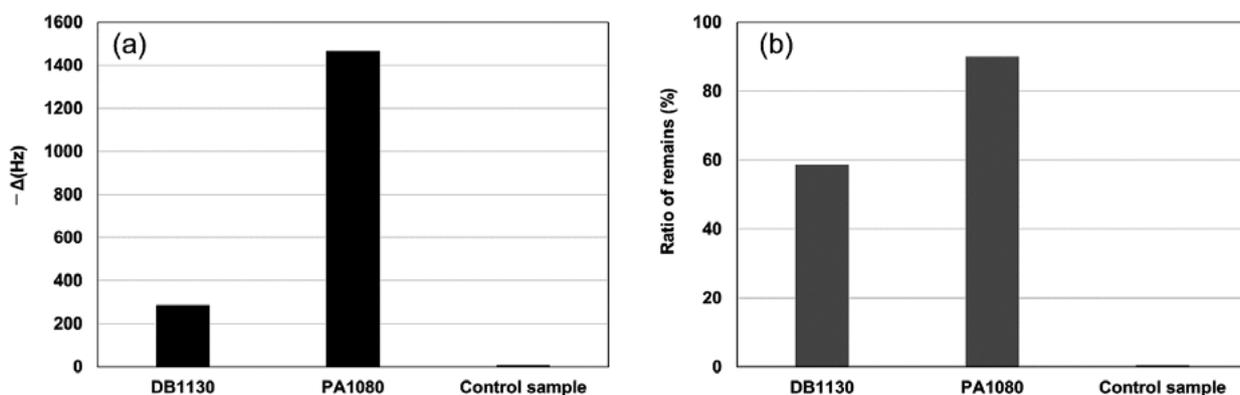


Figure 9 Evaluation of adhesion-desorption of Blockmaster™ and control sample by QCM measurement. (a) Adherence (b) Ratio of remains after washing.

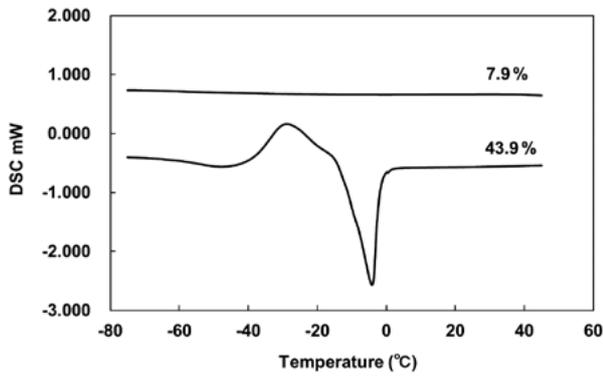


Figure 10 DSC curves for PA1080 with water content of 7.9 % and 43.9 %.

な抗原-抗体の相互作用と比較すると, Figure 11 (b) からわかるようにポリマーとPSAの相互作用は非常に弱かった. PSA-抗PSA抗体の結合は強固で非可逆的であり,

PBS(-)による洗浄でチップを再生できなかったのに対し, Blockmaster™とPSAとの吸着はPBS(-)での洗浄により脱離しチップを再生できたことから, バッファー中ポリマーとPSAは吸着-脱離の平衡状態であると推測される. ポリマーとPSAの共存状態のイメージ図をFigure 12に表す. PSAのシーケンス(2ZCL:Chain P)はProtein data bank から引用し, PSAの表面状態をPyMolでシミュレーションした.

更に, Figure 13より, 低吸着PPを使用したPG(I)とPSA評価系においてBlockmaster™の添加有無にかかわらず, 初期反応性はほぼ同等であったことからポリマーとタンパク質の弱い相互作用は抗原-抗体反応を阻害しないと考えられる. 以上より, タンパク質に対してBlockmaster™が弱く相互作用することで, 抗原-抗体反応を阻害することなくタンパク質の安定化に寄与していると結論付けた.

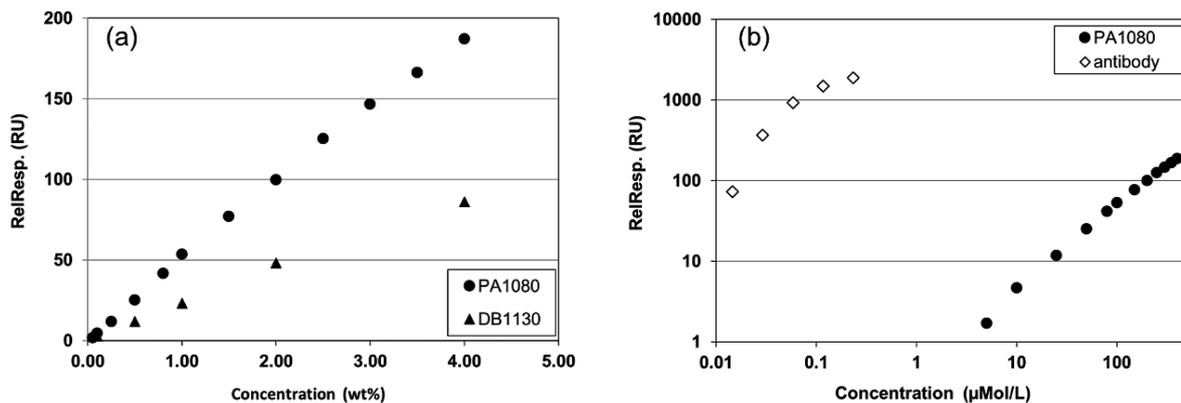


Figure 11 (a) Changes of relative response (RelResp.) on PSA immobilized chip against concentrations of PA1080 and DB1130. (b) Changes of RelResp. on PSA immobilized chip against concentration of PA1080 and antibody.

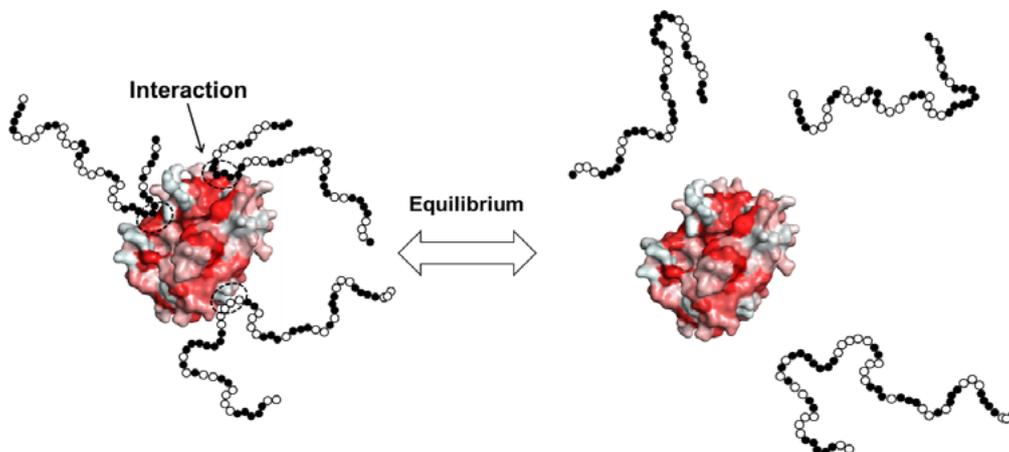


Figure 12 Equilibrium image of DB1130 or PA1080 with PSA in buffer solution. The darker red surface of PSA (2ZCL:Chain P) means higher hydrophobic property. Polymer consisted of hydrophilic segment (○) and hydrophobic segment (●).

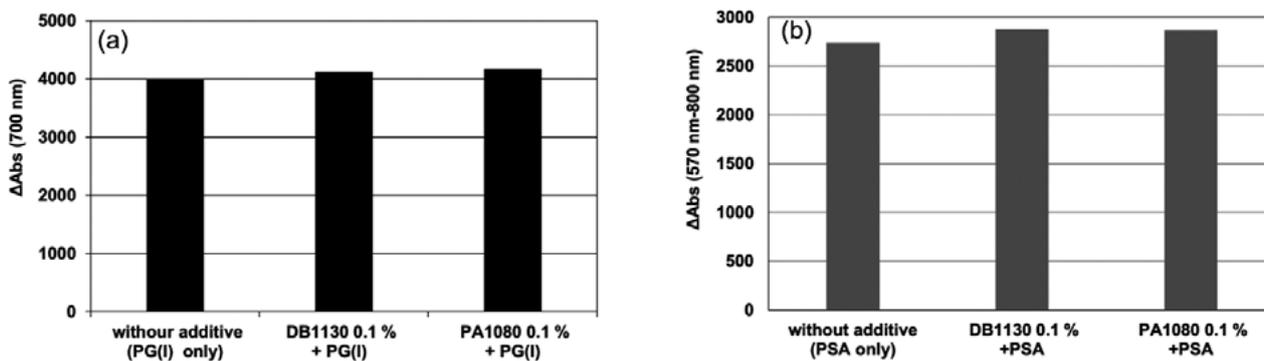


Figure 13 The addition of DB1130 or PA1080 didn't affect reactivity of antigen (a) PG (I): 250 ng/ml (b) PSA: 80 ng/ml in initial condition, which were preserved in low adsorption PP tubes.

#### 4 まとめ

Blockmaster™ DB1130と PA1080は免疫診断分野に使われている抗原(ペプシノーゲン (I) (II), 前立腺特異抗原)の安定化に極めて有効であり, そのタンパク質安定化効果は①タンパク質の容器への吸着抑制 ②タンパク質表面との相互作用によるタンパク質の高次構造の維持であると結論された. 完全化学合成品である本ポリマーは, ロット安定性に優れ生体由来の不純物も含まないことから, 診断薬用ブロッキング剤や添加剤などの用途をはじめ, 生物学的製剤, 産業用酵素など様々な生化学分野での応用が期待される.

#### 謝辞

本研究においてポリマー中の中間水の測定, 解析, ご指導を頂きました九州大学先導物質化学研究所の田中賢教授, 村上大樹助教, また, SPR装置を使用させて頂き, 測定のご指導頂きました物質・材料研究機構 分子・物質合成プラットフォームにこの場を借りて感謝の意を表します. 本研究を一貫してサポート頂きました医学生物学研究所 (MBL) と JSR ライフサイエンス事業部に心より感謝致します.

#### 参考文献

- 1) 丸山 工作, 丸山 敬: “生命科学入門”, 東京教学社, 東京 (2003), p.8-11.
- 2) R. Imamura, H. Mori: *Biomacromolecules*, **26**, 904 (2019).
- 3) 徐 盈佳, 澤井 時男, 磯 和宏, 飯沼 良介, 高瀬 勝行: 日本臨床検査自動化学会誌, **43** (4), p.528 (2018).
- 4) Yingjia Xu, Ryosuke Iinuma, Kazuhiro Iso, Katsuyuki Takase: 27<sup>th</sup> AACC International CPOCT Symposium, 2018.
- 5) T. Masubuchi, M. Endo, H. Sugiyama, T. Ueda, H. Tadakuma, et al.: *Nature Nanotechnology*, **13**, 933 (2018).
- 6) MBL ライフサイエンス: [https://ruo.mbl.co.jp/bio/product/blocking/blockmaster\\_pa.html](https://ruo.mbl.co.jp/bio/product/blocking/blockmaster_pa.html)
- 7) 田中 賢: 日本接着学会誌, **51** (9), p.423 (2015).
- 8) 中田 克, 石田 宏之: The TRC News, 201608-05 (2016).
- 9) B. Panganiban, B. Qiao, T. Jiang, T. Xu, et al.: *Science*, **359**, 1239 (2018).