

# 生命科学用の場としての 水和イオン液体

Perspective of Hydrated Ionic Liquids in Life Science

藤田 恭子  
Kyoko Fujita

東京薬科大学 薬学部(講師)  
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences (Senior Assistant Professor)

KEYWORD ▶ 自由水 束縛水 イオン構造 構造形成

## はじめに

## 01

細胞内はタンパク質や種々の高分子が高濃度溶解している混み合いの状況(分子クラウディング環境)であるとの考え方が広く認識されている。また近年、細胞内相分離現象をはじめ、細胞内における生体分子、その他の高分子による時空間的なドラスティックな変化が多彩な機能発現や反応の進行に大きく関与していることが多数報告されている<sup>1)</sup>。このような細胞内の機能発現や諸反応のいずれにも深く関与している水分子は、通常の試験管内で用いる希薄溶液(自由水)ではなく細胞内の混み合いにより周囲から様々な影響を受けた束縛水として存在すると考えられる。試験管内実験においても細胞内環境を再現するような水分子を含む場の制御が望まれるが、その方法は未だ確立されていない。

一方、融点の低い塩であるイオン液体は構造を選択することで溶媒特性をチューニング可能である。水や有機溶媒では実現できない特性を持つ溶媒として注目され、基礎研究や社会実装まで幅広い分野で発展してきた<sup>2)</sup>。バイオ関連では酵素反応<sup>3)</sup>や抽出場<sup>4)</sup>、医薬品有効成分の溶解性改善<sup>5)</sup>や輸送技術<sup>6)</sup>、薬物のイオン液体化<sup>7)</sup>などがイオン液体としての特性を活かした展開だろう。一方、水溶液中にイオン液体を添加したり、低濃度で用いる報告はイオン液体としての特性は期待できないものの、水溶液中で有機塩が生体分子に及ぼす影響も非常に興味深い。本解説ではイオン液体に添加した水分子が束縛水として存在する混み合い環境ともいえる“水和イオン液体”を場として観測される「生体分子の挙動」について紹介したい。

## 水和イオン液体

## 02

水和イオン液体はイオン液体にわずかな水を添加したものであり、自由水として振る舞う水分子はほぼ存在しないものと定義して検討を行ってきた(図1)。そのため、水和イオン液体は開放系で室温放置していても、ほとんど蒸発せず、長期間安定な液体として取り扱える。これまでに様々なイオン構造からなるイオン液体について、水の添加量を変化させて水分活性測定を行った。水と混和する親水性のイオン液体は構成イオンの大きさや極性に関わらず1イオンペアに対して水7分子程度までは、自由水はほぼ存在しない結果を得ている<sup>8)</sup>。イオン液体は添加する水の量を制御することで1イオンペアに対する水分子数を連続的に制御でき、さらに自由水/束縛水比も調整可能になる。また、1イオンペアに対する水分子数の数が同じであっても、水和イオン液体の構成イオンによって水分子の特性は変化する。例えば、後述するような生体分子の高次構造を保持した状態で直接溶解し、さら

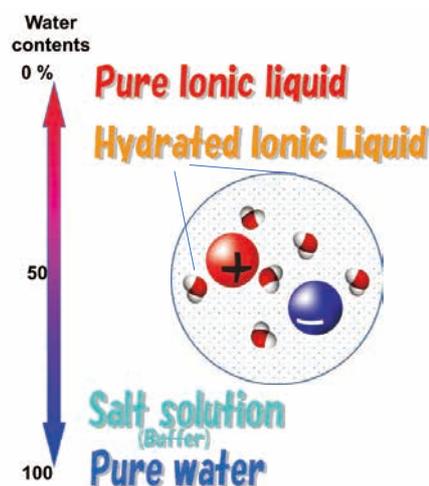


図1 水和イオン液体の概念図

に安定性の向上を示すイオン液体中では、束縛水の中でも「中間水」と呼ばれるような水が存在する解析結果が得られている。中間水は生体親和性材料の表面に存在し、材料と弱く相互作用する水に分類される<sup>9)</sup>。中間水が存在するような材料はタンパク質の吸着などが抑制され、中間水のない材料に比べて血栓の発生など抑えられることが報告されている。中間水の有無に関する評価法として示差走査熱量測定(DSC)が知られている。これまでに様々なイオン構造のイオン液体について、含水率を変化させながらこの中間水の有無についてDSC測定で検討を行ってきた<sup>10)</sup>。中間水が存在するイオン液体は水の構造形成能の高いコスモトロピックなイオンで構成される場合が多く、中間水の存在を示す水の低温結晶形成に由来する発熱挙動が観測される水分子数はイオン構造によって変化した。また、イオン液体の場合、報告されている生体適合性高分子と異なり発熱挙動はごく限られた水分子数でのみ観測された(図2)。水和イオン液体でも生体分子との親和性を評価するうえで、中間水の有無は大きな指標となることを示した。また、この中間水が存在するか否かを判断する方法としてNMR測定も有効な手段といえる結果が得られている<sup>11)</sup>。中間水が観測される水和イオン液体中の水分子ピークは自由水に比べて低磁場側にシフトして観測された。

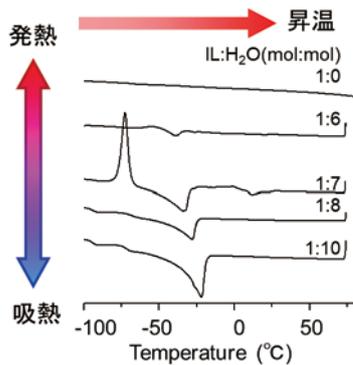


図2 イオン液体の1イオンペアに対する水分子数を変化させ示差走査熱量測定を行った結果

しかし、構成イオンによる影響は大きく、水の構造形成能が高いコスモトロピックなイオンを構成イオンにした水和イオン液体の場合、タンパク質や酵素の溶解が可能になるが、そうでない場合の多くはわずかな水分子の添加では生体分子は溶解しない。これまでに各種タンパク質や酵素、グアニン四重鎖(G4)構造を形成する核酸などの高次構造を保持したまま溶解するイオン液体として、コリニウムカチオン([ch])とリン酸二水素アニオン([dhp])からなるイオン液体を用いて、様々な報告をしてきた。このイオンの組み合わせはリン脂質膜の親水部の構造に一致しており、生命の進化の過程で選ばれてきた組み合わせが示す生体分子との親和性の高さには説得力がある。水和[ch][dhp]に高次構造を保持したまま溶解したタンパク質や核酸は熱安定性や経時的安定性が水溶液中に比べて飛躍的に向上した<sup>13)</sup>。また、存在する水分子数を調整することで、水和[ch][dhp]中での酵素反応の進行も確認されている<sup>14)</sup>。さらに、東京農工大学 池袋一典先生との共同研究でG4構造を形成する核酸アプタマーを用いた検討では、水和[ch][dhp]中で水溶液中と類似構造を形成するが、水分子数のわずかな変化でG4構造のトポロジーが変化することを分光学的に観測している。さらにトポロジーが異なることで、標的分子との相互作用が水溶液中に比べて強くなった結果も得られている(図3)<sup>15)</sup>。

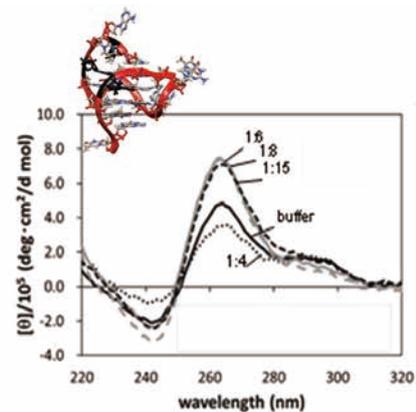


図3 1イオンペアに対する水分子数を変化させた水和[ch][dhp]中に溶解した核酸アプタマーのCD測定結果 ref15, Fig.3を改編

## 生体分子の溶解

# 03

イオン液体への生体分子の直接溶解は困難である。無理に溶解すると高次構造は変化してしまう。イオン液体と親和性の高い高分子などを生体分子の表面に化学修飾することで直接溶解が可能となり、溶解後は安定性の向上などが確認されている<sup>12)</sup>。しかし、化学修飾は煩雑な操作が必要であり、また、制御も難しい。そこで提案したのがイオン液体にわずかな水分子を混合した水和イオン液体である。

### 水溶性タンパク質、核酸

水和イオン液体中には自由水は存在しないが、水分子の存在により水素結合を形成して生体分子の溶解促進が期待できる。

### 膜タンパク質

最近、大阪大学 溝端栄一先生と名古屋工業大学 古谷祐詞先生との共同研究により、水和イオン液体の膜タンパク質の安定化溶媒としての可能性について検討を進めている。膜タンパク質は細胞膜に存在し、細胞膜内外の物質輸送や細胞間の相互作用などに関与している。しかし、その取扱いの難しさから水溶性タンパク質に比べて研究が遅れている。創薬研究ではターゲットの6割が膜タンパク質と言われ、膜タンパク質の不安定さや調整の困難さを克服する技術が望まれている。検討では、モデルタンパク質として、構造解析がされている $\alpha$ ヘリックス貫通型膜タンパク質2種を用いた。アニオントランスポーターで10回膜貫通型膜タンパク質であるTehAと光駆動プロトンポンプである7回

膜貫通型膜タンパク質のバクテリオロドプシン(bR)を用いた(図4)。様々な構成イオンからなる水和イオン液体を調整して膜タンパク質を混合すると、いくつかの水和イオン液体中で二次構造を保持した溶解が確認された。イオン構造や水分子数による影響は水溶性タンパク質や後述の凝集体の溶解とは少し異なった。TehA のCD測定では $\alpha$ ヘリックス構造とその含有量が水溶液中と類似であることが確認され、さらにbRでは7本の $\alpha$ ヘリックス構造の内部に存在する発光団レチナールが水和イオン液体中に溶解後も水溶液中と類似状態で存在していることが分光学的に確認できた。さらに、光照射に伴うレチナールの異性化とそれに続くプロトン輸送に伴う構造変化も水和イオン液体中でも同様に観測された。また、TehA、bRのいずれも水和イオン液体中に溶解することで、水溶液中に比べて熱変性温度が20°C以上向上し、bRに関しては連続した光照射による光退色も抑制されることが確認されている。

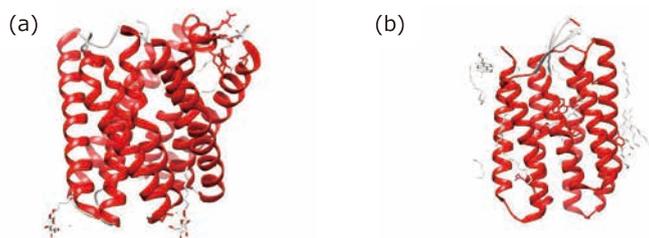


図4 TehA (a)およびbR (b)の立体構造(PDBエントリー:3M71、5B35)

### タンパク質凝集体

次にタンパク質凝集体の溶解について紹介する。タンパク質は熱や化学的な因子により容易に変性、凝集する。また、大腸菌などを宿主としたリコンビナントタンパク質の発現は汎用技術であるが、高い確率で凝集体を形成する。このような凝集体はタンパク質本来の構造を失っているため不活性である。このような凝集体の活性の再生は一般的に高濃度変性剤を用いた可溶化後、長時間の希釈・透析により変性剤を取り除きながらリフォールディングを行うが、再生が難しい場合も多い。このような再生過程は希薄水溶液中(自由水中)で進められる。一方、細胞内ではタンパク質の再生環境は全く異なり、疎水的環境であるシャペロン内部で進行する。水和イオン液体は構成イオンと混合する水分子数の調整により、自由水が存在しない疎水的環境でありながら、水素結合を形成する疑似シャペロン環境を実現する場になると期待される。実際に、熱凝集タンパク質やリコンビナントタンパク質凝集体を変性剤を使用することなく直接溶解し、溶解後にはリフォールディング挙動の誘起を観測している。ここでは凝集タンパク質の溶解について紹介し、その後のリフォールディング挙動については次章に記載したい。

糖鎖認識タンパク質であるコンカナバリンA(Con A)の熱凝集体はCon Aを水溶液に溶解して70 °Cで10分間インキュベートすることで白色固体として得られる。遠心分離によって回収し

た白色固体を1イオンペアに水3分子になるよう調整した各種水和イオン液体中に混合し、遠心分離後の上清について蛍光測定により溶解性を評価した。また、リコンビナントタンパク質凝集体として大腸菌で発現したセルラーゼ6A(CcCel6A)凝集体は大腸菌破碎後に遠心分離によって回収し、Con Aと同様、調整した各種水和イオン液体と混合した。凝集体の溶解を検討するイオン液体にはアルキル鎖長の異なるホスホニウムカチオン、アンモニウムカチオンや、環構造の効果の有無についてイミダズリウムカチオンやピロリジニウムカチオンを用いた。アニオンはブロマイドかクロライドに統一することで、カチオンの影響について検討した(図5)。その結果、カチオンのアルキル鎖の総炭素鎖数と凝集体の溶解性に興味深い相関が得られた。凝集体は一般的にタンパク質内部の疎水性残基が表面に現れ、疎水性部分同士が集合して水溶液中で固体を形成している。そのため、疎水性環境の方が溶解性が上がると想像できるが、場の疎水性が高ければ高いほど溶解性が上がるわけではなく、疎水性が高くなりすぎると溶解度は下がる結果となった。溶解性に効果的であったのはアンモニウムやホスホニウムカチオンでアルキル鎖の総炭素数が16付近のものであった<sup>16)</sup>。カチオンの環構造による顕著な影響は確認されず、水溶性タンパク質の高次構造を保持した溶解に有効であったコリニウムカチオンも溶解性は低かった。一方、アニオンの影響としてブロマイド、クロライドアニオンをコスモトロピックな[dhp] アニオンに交換した結果、溶解性は向上した。さらに含水量の影響として、1イオンペアに対する水分子数が増えると溶解度は低下する結果がいずれの水和イオン液体でも得られた。このような凝集体の溶解に関する傾向は熱変性タンパク質凝集体でも大腸菌を宿主として得られたリコンビナントタンパク質凝集体でも同様であった<sup>17)</sup>。タンパク質凝集体の溶解には、水溶性タンパク質や膜タンパク質とはまた異なる視点からのイオン構造の選択が有効であった。

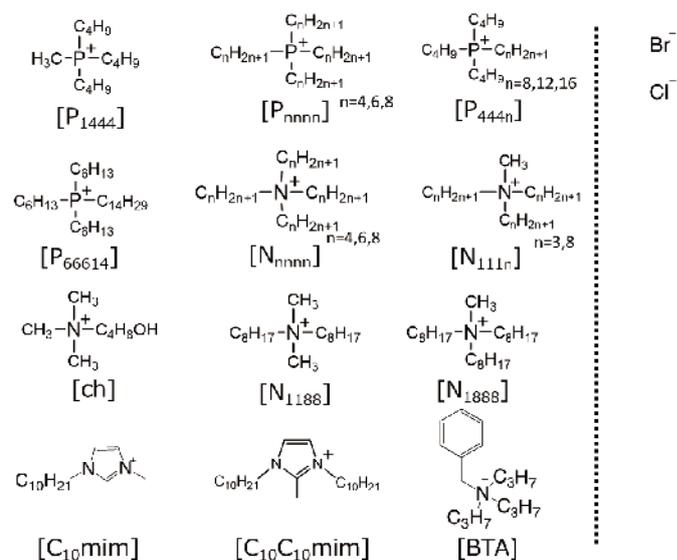


図5 凝集体溶解の検討で用いたイオン液体の構造 ref16、Fig.1を改編

## リフォールディング挙動

04

前章では水和イオン液体を用いた溶解の中でタンパク質凝集体の溶解について紹介した。本章では水和イオン液体に溶解後のリフォールディング挙動について記載するが、その前に凝集体ではないが凍結乾燥サンプルを用いたリフォールディングの検討結果について紹介する。凍結乾燥は長期間保存が可能な汎用技術であり、タンパク質の凍結乾燥品の販売もある。しかし、タンパク質を凍結乾燥させる過程で活性が低下するようなダメージを受ける可能性は否めない。例えば、凍結乾燥したCon Aは緩衝液に溶解してグルコースが担持されたカラムを通すと吸着せず溶出してしまう成分が確認できる。Con Aはマンノースとグルコースを選択的に吸着するが、その結合係数はマンノースの方が3倍程度高い。グルコース担持カラムに吸着しなかった成分と、カラムに吸着後にマンノース溶出液で溶出・回収した成分について、同濃度でマンノース結合強度を比較すると前者は後者の半分以下であった。それぞれの成分を水和イオン液体に溶解し、その後、マンノース結合強度を測定した結果、いずれの成分も結合強度が増加し、さらに両成分とも同程度の結合強度となった(図6)。これは糖鎖認識能が低下していた凍結乾燥Con Aを水和イオン液体中に溶解することでリフォールディングが誘起され、糖鎖認識能が向上したためと示唆される。また、興味深いことに水和イオン液体の含水率によって糖鎖認識能の増加程度が異なった。1イオンペアに対して水3、7、15分子となるよう調整した水和イオン液体に溶解したマンノース結合能は緩衝液に直接溶解したものに比べてそれぞれ約2、1、0.5倍となった。水和イオン液体中の水分子数が多くなり自由水が存在し始めるとリフォールディングの効果はなくなることが結果から示唆された<sup>18)</sup>。

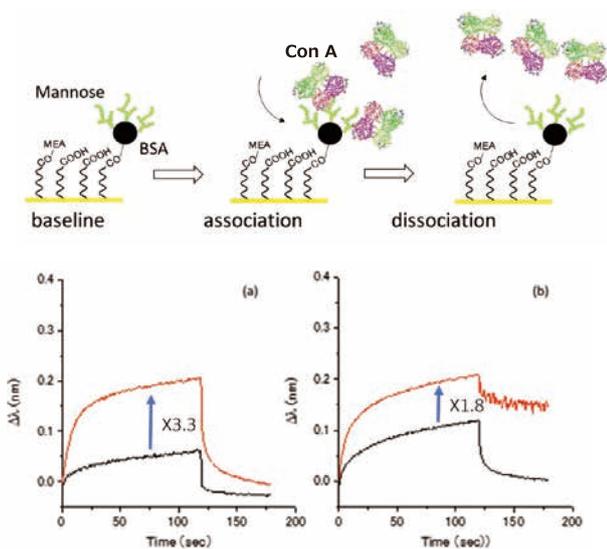


図6 水和イオン液体で処理前後のマンノース結合センサーグラム(黒ライン処理前、赤ライン処理後)  
(a) グルコースカラムに吸着しなかったConA、  
(b) グルコースカラムに吸着したConA  
Ref18、Fig.4を改編

熱凝集Con Aについては、前述のように構成イオンと含水量を選択した水和イオン液体に高濃度に溶解する(12 mg/mL)。溶解後のCon Aについて、緩衝液で希釈後にマンノース結合能を測定した結果、結合強度の回復が確認されている<sup>16)</sup>。また、リコンビナント凝集CcCel6Aを用いて、水和イオン液体に溶解後の構造について蛍光スペクトル測定を行った。蛍光スペクトルではスペクトルのピーク位置によって溶解状態が予測でき、335nm付近がネイティブ類似状態、長波長シフトはアンフォールド状況、短波長シフトは凝集状態を示唆する。図7に溶解後CcCel6Aの構造が構成イオンによって大きく異なること示すスペクトルを示した。凝集CcCel6Aの高い溶解性を示したテトラブチルアンモニウムブロマイド([N4444][Br])は、溶解後も凝集体様の状態であることがスペクトルから示唆された。これに対して、[dhp]アニオンからなるイオン液体の場合、溶解後にネイティブ(water-soluble)と類似構造へリフォールディングを示唆するスペクトルが得られた。水素結合を形成しやすい[dhp]をアニオンとすることで、溶解後のリフォールディングが誘起されたと考えられる。同様に水和イオン液体中に溶解後、リフォールディングが示唆されたCcCel6Aの活性回復について検討するため、疎水性カラムを用いてCcCel6Aを緩衝液中に溶出した。回収したCcCel6Aのセルラーゼ活性について検討を行ったところ、ばらつきがあるもののネイティブと比較しても高い活性が得られた<sup>17)</sup>。以上のように、構成イオンを選択した水和イオン液体を用いることで凝集タンパク質の溶解とリフォールディングが可能になる結果を得ている。従来法とは異なるメカニズムによる凝集タンパク質の再生法の発展に寄与できればと期待する。

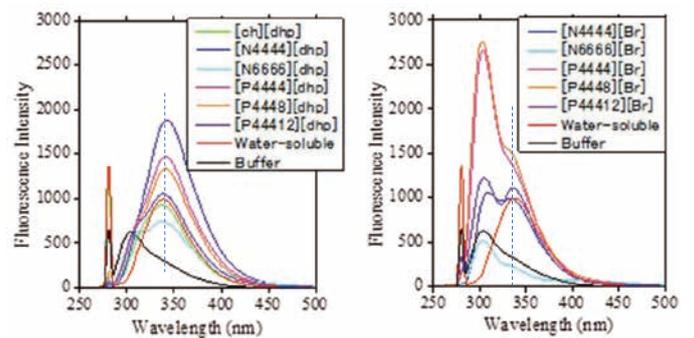


図7 リコンビナント凝集CcCel6Aを各種水和イオン液体溶解後の蛍光スペクトル  
Ref17、Fig.2を改編

## おわりに

05

生命科学研究用の“場”として水和イオン液体を用いる可能性について紹介した。水溶性タンパク質だけでなく膜タンパク質や核酸の構造を保持した溶解が可能であり、溶解後にはリフォールディング挙動や安定性の向上などが観測されている。また、

水和イオン液体中の水分子の数を制御することで、DNAアプタマーのトポロジー変化や分子間相互作用が変化する結果も得られている。さらに今回は割愛したが、イオン構造のデザインにより親・疎水性を調整することで温度によって水と二相分離挙動を示すイオン液体が知られているが、生体分子と高い親和性を示す水和イオン液体でもこのような挙動を示すものがある。水分子数や温度のわずかな変化により引き起こされる液相形成などの環境の変化は、時空間的にドラスティックに変化する細胞内を連想させる。水和イオン液体を制御することで細胞内の状況をシンプルに模倣するような場の形成ができないだろうか。水和イオン液体を生命科学研究用の場として、生体分子の反応や構造に大きく影響を及ぼす水分子の振り舞いを制御しながら得られる結果について理解を進めることで、細胞内の挙動理解につながることを期待したい。

## 参考文献

1. S. Boeynaems, S. Alberti, N. L. Fawzi, T. Mittag, M. Polymenidou, F. Rousseau, J. Schymkowitz, J. Shorter, B. Wolozin, L. Van Den Bosch, P. Tompa and M. Fuxreiter. Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 2018, 28, 420-435.
2. M. Armand, F. Endres, D. R. MacFarlane, H. Ohno and B. Scrosati. Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Nat. Mater.* 2009, 8, 621-629.
3. T. Itoh. Ionic Liquids as Tool to Improve Enzymatic Organic Synthesis. *Chem. Rev.* 2017, 117, 10567-10607.
4. S. P. M. Ventura, F. A. e Silva, M. V. Quental, D. Mondal, M. G. Freire and J. A. P. Coutinho. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chem. Rev.* 2017, 117, 6984-7052.
5. R. Md Moshikur and M. Goto. Pharmaceutical Applications of Ionic Liquids : A Personal Account. *Chem. Rec.* 2023, 23, e202300026.
6. B. Lu, T. Liu, H. Wang, C. Wu, H. Chen, Z. Liu and J. Zhang. Ionic liquid transdermal delivery system: Progress prospects, and challenges. *J. Mol. Liq.* 2022, 351, 118643.
7. K. S. Egorova, E. G. Gordeev and V. P. Ananikov. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chem. Rev.* 2017, 117, 7132-7189.
8. H. Ohno, K. Fujita and Y. Kohno. Is seven the minimum number of water molecules per ion pair for assured biological activity in ionic liquid-water mixtures?. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, 17, 14454-14460.
9. M. Tanaka and A. Mochizuki. Effect of water structure on blood compatibility - thermal analysis of water in poly(meth)acrylate. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2004, 68A, 684-695.
10. K. Fujita, Y. Nikawa and H. Ohno. Cold crystallisation behaviour of water molecules in ionic liquids as a screening method to evaluate biocompatibility of the hydrated ionic liquids. *Chem. Commun.* 2013, 49, 3257-3259.
11. Y. Nikawa, K. Fujita and H. Ohno. Quantitative assessment of kosmotropicity of hydrated ionic liquids by nuclear magnetic resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017, 19, 8148-8151.
12. H. Ohno, C. Suzuki, K. Fukumoto, M. Yoshizawa and K. Fujita. Electron transfer process of poly(ethylene oxide)-modified cytochrome c in imidazolium type ionic liquid. *Chem. Lett.* 2003, 32, 450-451.
13. K. Fujita and H. Ohno. Hydrated Ionic Liquids: Perspective for Bioscience. *Chem. Rec.* 2023, 23, e202200282.
14. K. Fujita and H. Ohno. Enzymatic activity and thermal stability of metallo proteins in hydrated ionic liquids. *Biopolymers.* 2010, 93, 1093-1099.
15. K. Fujita, T. Honda, K. Tsukakoshi, H. Ohno and K. Ikebukuro. The state of water molecules induces changes in the topologies and interactions of G-quadruplex DNA aptamers in hydrated ionic liquid. *J. Mol. Liq.* 2022, 366, 120175.
16. K. Fujita, R. Nakano, R. Nakaba, N. Nakamura and H. Ohno. Hydrated ionic liquids enable both solubilisation and refolding of aggregated concanavalin A. *Chem. Comm.* 2019, 55, 3578-3581.
17. K. Fujita, K. Kobayashi, A. Ito, S. Yanagisawa, K. Ichida, K. Takeda, N. Nakamura and H. Ohno. Improved renaturation process of aggregated recombinant proteins through the design of hydrated ionic liquids. *J. Mol. Liq.* 2023, 377, 121440.
18. K. Fujita, R. Fujii and K. Ichida. Renaturation of Lyophilized Concanavalin a Treated in Water Content Controlled Hydrated Ionic Liquids. *Appl. Sci.* 2021, 11, 57.