B822

フェリチンによるニッケルコア作製時における炭酸イオンの重要性

○奥田 充宏¹、山下一郎^{2,3}、吉村 英恭¹ (¹ 明治大学物理、² 松下電器先端研、³ 科学技術振興事業団)

ナノオーダー超微粒子は物理、化学的方法で主に試みられているが、我々は生物学的方法、特にタンパク質を用いたナノ粒子作製技術の確立を目指している。球状タンパク質フェリチンは直径約13(12)nm、中心部に直径約6nmの空洞があり、生体内ではこの空洞に酸化鉄もしくは水酸化鉄のコアを形成し、鉄の貯蔵を行っている。フェリチンの鉄取り込み機構は、概ね解明されているが完全ではない。そこでフェリチン空洞内に鉄以外の無機物を内包することにより、このバイオミネラルゼーションの機構を明らかにすると同時に、工学的応用を考えている。前回までにニッケル、コバルト、マンガン、クロム、銅、タングステン等をフェリチン空洞内に取りこむ条件を示した。フェリチン空洞内へのニッケルの導入は溶液中で行われ、コア形成は緩衝液でpHを制御しながら、沈殿条件にすることによりコア形成が可能となるが、溶存二酸化炭素の存在が必須であった。緩衝液であるHEPES、CAPSOがコア形成に関与している可能性もあったので、今回は、緩衝液を用いずに炭酸イオンのみでニッケルコア作製を試み、緩衝液は不要であることを確認した。ニッケル作製条件は0.1mg/mL apoferritin、1mM 硫酸ニッケルアンモニウム(II)六水和物、300mM 炭酸水素ナトリウムとした溶液条件で、23℃で24時間放置し、コア形成を透過型電子顕微鏡(TEM)で確認した。TEM観察の結果、炭酸水素ナトリウムを加えた溶液中で、30%のフェリチンにコアを確認した。このことにより、ニッケルコア形成にHEPESなどの緩衝液は必須ではなく、炭酸イオンが重要であることがわかった。今後、全てのアポフェリチンの空洞内に無機物質ナノ粒子を形成させ、二次元結晶を作製することにより、デバイスに応用することを考えている。

M.Okuda, I.Yamashita and H.Yoshimura: Indispensable carbonate ion for Nickel core fabrication in ferritin

B824

リコンビナントフェリチンへの金属導入における電荷の影響

○慶澤 景子²、岩堀 健治²、山下一郎^{1,2} (¹ 松下電器・先端研、² 科技団・CREST)

【背景】これまでに私たちはナノ電子デバイスの作製に必要な均一サイズの無機材料ナノ粒子の作製を目指して、バイオミネラルゼーションによりフェリチンたんぱく質の空洞内に様々な金属化合物の導入を行ってきた。しかしながら、バイオミネラルゼーション機構については未だ解明されておらず、現在の重要な研究課題である。そこでフェリチン空洞内部や表面の電荷を遺伝子工学的に変異させた各種リコンビナントフェリチンを用いて鉄およびコバルトのバイオミネラルゼーションを行い、それぞれのコア形成能を比較検討することにより、メカニズムについて考察した。【実験】水酸化鉄コア形成条件;各種リコンビナントフェリチンおよび市販アポフェリチン(シグマ)、NaCl、硫酸アンモニウム鉄、HEPESpH7.0またはMESpH6.5の溶液を室温または40℃で一晩放置後TEMで観察した。水酸化コバルト形成条件;各種リコンビナントフェリチンおよび市販アポフェリチン(シグマ)、硫酸アンモニウム、硫酸アンモニウム鉄、HEPESpH8.3の溶液を40℃で一晩放置後TEMで観察した。【結果と考察】水酸化コバルトコア形成については、フェリチン空洞内をプラス電荷に変異させたリコンビナントフェリチンにおいてコア形成はほとんど見られなかった。水酸化鉄コア形成については、HEPESpH7.0を用いたときは各種フェリチンによるコア形成能に顕著な差は見られなかった。しかしMESpH6.5を用いたとき、特に40℃で反応を行ったものでは、4回対称外側にプラスの電荷をもつリコンビナントフェリチンでのコア形成能が著しく低かった。以上より、フェリチン空洞内部や表面の電荷がコア形成に影響を与えることを確認した。フェリチンが持つ電荷を制御することができれば、今までコア形成が難しいとされてきた貴金属類によるコア形成も可能になると考えられる。

K.Yoshizawa, K.Iwahori, I.Yamashita: The effect of surface charge on the introduction of metal core into recombinant ferritin cage

B823

蛋白質の三次元配置化法

○平塚 祐一^{1,2}、多田 哲也³、上田 太郎¹ (¹ 産総研・ジーン、² 学振・科技特、³ 産総研・次世代半導体)

蛋白質は細胞内で適材適所に配置(局在)されることによりその機能を発揮する。特に細胞運動などに関与する蛋白質群は、細胞内の局在によりその細胞の移動方向を決定する。そこでわれわれは、細胞と同程度の大きさ(数から数十μm)の微小物体の特定の領域に蛋白質を配置することで運動性の微小素子の創製を試みている。

昨年の本年会で、われわれは大きさ数μmのSiO₂製の直方体の特定の面に蛋白質を固定する方法を報告した。本会ではこの方法をさらに発展させ、下図のような大きさ80μm、厚さ2μmのSiO₂製の十字型「ローター」をSi基板上に作製し、それぞれの羽根の片側に蛋白質を局所的に配置することに成功したので、その方法について報告する。このローターは超音波によりSi基板から取り出すことができ、固定する蛋白質を工夫することでこのローターに回転運動させられると期待している。

固定する蛋白質の候補としてウレアーゼやカタラーゼを考えている。これら蛋白質の酵素反応熱によりローター内に非対称な熱振動が生じ、結果として回転運動が生じると予想している。また、蛋白質のかわりに鞭毛運動能をもったバクテリア等を固定して、バクテリアの推進力により回転運動させることも検討している。

Y.Hiratsuka, T.Tada and TQP.Uyeda: Patterned Immobilization of Protein Molecules onto 3D Micro Structures.

B825

顕微観察による細胞微細構造情報に基づく非侵襲オンチップセルソーターの開発

○高橋 一憲、服部 明弘、鈴木 郁郎、安田 賢二(東大院・総合文化)

【目的】特定の細胞を細胞集団から取り出し、細胞数や配置を制御して培養を行うことはセロミクス研究において重要である。近年、特定の細胞のみを選別して分取する装置=セルソーターが開発されているが、扱える細胞サイズの制限、超音波による試料へのダメージ、散乱光や蛍光による間接観察等、個々の細胞を一細胞単位で非侵襲的にソーティングできる実際的なシステムはまだ実現されていない。そこで我々は、微細加工技術を用いたチップ上に製作した微細流路を流れる細胞を顕微観察し、回収する細胞はそのまま流路を層流中で滑らかに通過させ、破棄する細胞にのみ外力を作用させて取り除くという非侵襲的手法に基づいたオンチップセルソーターを開発した。昨年の本会では、セルソーターの形状と動作条件を報告したが、今回は昨年度の装置に改良を加え実用に足る要素を組み込んだシステムとした。本会では、改良型セルソーターの形状とこれを用いた分離→回収→培養の成果を中心に報告する。【方法】セルソーターチップは微細加工技術を用いて、光学的な透過性を有する高分子樹脂(PDMS)基板内に微細な流路、容器、導電性アガロースゲル電極部を形成し、これをガラス基板と接着することで作製した。細胞の識別は顕微観察による微細構造情報を元に行い、必要に応じて自動的に電圧を印加することでソーティングを行った。また、顕微鏡に連結してある光学系を工夫して細胞の位相差像と複数の蛍光像を同時に処理・解析する手法も開発した。【結果】流路中に毎秒1個のスピードで細胞を流し、細胞をその光学的指標によって自動的に分離することに成功した。また、この分離精製した細胞を最終的に培養することにも成功した。さらに、画像情報とは別に誘電泳動力を用いた細胞の識別の検討も行った。結果等詳しくは本会にて報告する。

K. Takahashi, A. Hattori, I. Suzuki, K. Yasuda: Development of on-chip cell sorter system based on the information on fine structure of cell with microscopic observation