3P325

温感性ハイドロゲルを用いた多分岐マイクロソーターの開発

○杉野 弘和¹、白崎 善隆¹、辰岡 正康¹、筒井 謙²、水野 潤³、庄子 智一³、船津 高志^{1,4,5} (¹早大院・生命理工、²早大・ナノ理工学研究機構、³早大院・ナノ理工、⁴東大・院薬、⁵JST CREST)

現在、基礎研究を始めとする創薬や再生医療などの各分野で特定の細胞の分離回収が大変重要な意味を持っている。だが、FACS等のセルソーターは装置が高価で大掛かりである他、複数種の細胞を同時に分離するのが困難であるという欠点がある。そこで我々は1入力5出力型流路(深さ: 5 mm or 20 mm、幅: 20 mm)を持つマイクロチップを使って分離を行うシステムを開発した。オンチップ分離で試料汚染の可能性の低下、前処理時間の短縮、検出感度の向上など様々な利点が期待できる。また、FACSでは分離の原理上、4種類以上の分離を行うことが困難であるが、我々の開発したソーターの場合は回収用の流路を複数組み込むことで多くの種類の分離が可能になる。さらに、試料の蛍光スペクトル解析を行うことにより、分離対象の識別精度が上がる。これにより、複数の抗体染色をした細胞を分離する場合、存在比率の少ない細胞も検出可能となる。我々の開発したソーターによる分離方法は以下の通りである。試料溶液に温感性ハイドロゲルを混ぜておき、1入力5出力型流路に流す。赤外レーザーにより分岐点を局所加熱することでゾル状態の温感性ハイドロゲルに相転移を起こし、部分的にゲルを作りバルブとして機能させる。分岐流路の4つをゲルバルブで閉めておき、廃棄用の流路へと溶液を流す。試料が流れてくると、その種類に応じてゲルバルブの開閉を行い、試料を特定の回収用流路へ分離する。本研究では、音響光学素子を用いてレーザーを約40 kHzで走査し、複数のゲルバルブを同時生成し5分岐制御に成功した。生体試料を識別するため波長500 - 800 nmの蛍光を分光して16チャンネルの光電子増倍管で測定した。このソーターを用いて、大きさや蛍光特性の異なる4種類の蛍光ビーズを別々の分岐へと自動分離することに成功した。

H.Sugino, Y.Shirasaki, M.Tatsuoka, K.Tsutsui, J.Mizuno, S.Shoji, and T.Funatsu : Developments of a multi branching fluid channel sorter using thermosensitive hydrogel

3P327

半導体からの電荷キャリア注入によるタンパク質の機能制御

○小田 将人、中山 隆史 (千葉大理)

生体高分子であるタンパク質は、生体中で起こる化学反応のほぼすべてにかかわる重要な触媒機能を持っている。そこで近年ナノテクノロジーの発展に伴って、医療、工業など、さまざまな分野でタンパク質の触媒機能をデバイスとして利用しようと、様々な研究がなされている。本研究ではタンパクの触媒機能を電気的にコントロールする新しいデバイスの提案をする。図に示すように、タンパク質と半導体表面を接合することによって、pH変化に伴うプロトン移動による電荷の変化を、半導体中のキャリア移動による電荷変化と考えることによって、アミノ酸のイオン・中性状態を制御し、静電相互作用を変化させ、タンパク質の活性・不活性状態をコントロールすることができれば、タンパク質の触媒機能をデバイスとして利用できる可能性がある。講演では、上記デバイスの実現に向け、第一段階としてシリコンからアミノ酸への電荷キャリア注入について電子状態から議論する。図(a):アミノ酸にキャリアを注入する前の不活性状態(b):キャリア注入をすることによって、静電相互作用が発生する(c):静電相互作用によってタンパクが折りたたまって活性状態になる。

M. Oda and T. Nakayama : Control of protein function by injecting carriers from semiconductor

3P326

E. coli 由来 Dps の機能発現における N 末端残基の影響

○三島 由美子¹、山根 みどり¹、山下一郎^{1,2,3} (¹JST・CREST、²松下電器 先端研、³奈良先端大・物質)

我々は生体高分子を利用したナノ構造体の構築を目的とし、そのモデルタンパク質として Dps (DNA-binding proteins from starved cells) の機能・構造解析を行っている。Dps family は、12 subunit から成る外径約 9 nm、内径約 4.5 nm の球殻状タンパク質であり、細胞が酸化ストレス下におかれると、DNA と複合体を形成 (自己組織化)、あるいは内部空間に金属を導入し、ナノ粒子を形成・貯蔵 (バイオミネラリゼーション) して Fenton 反応を阻害する、という 2 種類の 방법으로 DNA を保護することが知られている。Dps family の立体構造は非常によく保持されているが、N 末端の Loop の長さは様々であり、その違いが機能の多様性に影響していると考えられている。我々はこの点に着目し、*E. coli* 由来 Dps の機能発現における N 末端残基の関与を明らかにすることを試みた。

E. coli 由来 Dps について数種類の N 末端アミノ酸残基欠損体を作製し、諸性質について解析を行ったところ、欠損体の DNA 結合能は低下し、あるいは欠失した。さらに N 末端の Loop に存在する Lys 残基を Ala 残基に置換した変異体においても DNA 結合活性が低下したことから、一般的な DNA 結合タンパク質と同様に Lys 残基が DNA との結合に関与すると考えられた。一方、バイオミネラリゼーション能は保存されており、自己組織化とバイオミネラリゼーションとの間に直接的な相関は認められなかった。本発表においては機能解析並びに X 線結晶構造解析によって得られた知見について報告する。

Y.Mishima, M.Yamane and I.Yamashita : Effect of the N-terminus of *E. coli* Dps on its function

3P328

ウマ脾臓由来フェリチン変異体の機能・構造解析

三島 由美子¹、岩堀 健治¹、朴 三用²、Hedde Jonathan²、Tame Jeremy R.H.²、○山下一郎^{1,3,4} (¹JST・CREST、²横浜市大・総合理、³松下電器 先端研、⁴奈良先端大・物質)

[目的・方法] 我々はタンパク質を利用したナノ構造体の作製を目指しており、そのモデルタンパク質であるウマ脾臓由来 L-フェリチンについてバイオミネラリゼーションと自己組織化のメカニズムの解明を試みている。フェリチンは 24 量体から成る球殻状タンパク質であり、内部空間に鉄やニッケルなどの金属コアを形成する性質を有する。その際、3 回対称チャネルと呼ばれる酸性残基の集中した部位を通じて金属を内部に取り込むとされている。これまでにチャネルを構成する残基の変異体について様々な解析が行われてきたが、未だにメカニズムの解明には至っていない。そこで我々はチャネル外部表面の周辺に位置し、特に flexibility が高いと考えられる N 末端の Loop に注目した。その影響を明らかにするために、N 末端の 4 残基あるいは 8 残基を欠損させた変異体 (Fer4, Fer8) を作製し、機能・構造解析を行った。

[結果・考察] L-フェリチンの N 末端欠損体は Native 体に比べ、熱・pH に対する安定性は低下したが、金属コアの形成効率が上昇した。X 線結晶構造解析により得られた欠損体の立体構造においては、コア形成に直接関与するとされるチャネル部位とフェリチン内表面の nucleation center の構造が完全に保存されていたことから、欠損体においては金属イオンによる aggregation が抑制されることにより、コア形成効率が上昇したと考えられる。一方、欠損体では多量体構造を保持するサブユニット間の水素結合数が減少しており、このサブユニット間相互作用の変化が安定性の低下に影響していると考えられる。本発表においては機能・構造両面の解析によって得られた知見について詳しく報告する。

Y.Mishima, K.Iwahori, S.-Y.Park, J.Hedde, J.R.H.Tame and I.Yamashita : Functional and structural analysis of recombinant Horse Spleen ferritin with N-terminal amino-acid deletion.