3P329

リボソームの表面固定化とタンパク質生合成のモニタリング

○松浦 俊彦^{1,2}、田中 裕行¹、松本 卓也¹、川合 知二¹ (¹阪大・産研、²(株)島津製作所・基盤研)

リボソームを用いて、タンパク質を生合成するバイオチップを構築した。まず、タンパク質を合成するリボソームを固体基板上に固定するために、表面結合部位を有するリボソームを作製した。結合部位として、ヒスチジンタグが小サブユニットのリボソームタンパク質のC末端に導入された。リボソームは大腸菌から抽出され、ウェスタンブロットによって結合部位が導入されていることを確認した。次に、このリボソームに対する結合部位を有した有機薄膜を金基板上に作製した。薄膜分子として、硫黄原子とNTAを有するNTA-disulfideを用いた。硫黄原子は金基板上に自発的に化学吸着する。NTA末端は金属錯体形成を介したリボソームの結合部位として働く。この分子を溶解させた溶液に金基板を浸漬させることで、自発的に高集積された自己組織化単分子膜を作製することができた。表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて、NTA修飾金基板上にヒスタグを有するリボソームが固定化されることを調べた。その結果、NTA-disulfide膜の被覆率が高いほうが、リボソームの固定量が少ないことがわかった。これは、NTA-disulfide膜によってリボソームが金に非特異的に吸着するのを防いだためと考えられる。固定されたリボソームにmRNAと翻訳に必要なtRNAやエネルギー源などを加えることにより、タンパク質を生合成することができた。これは、生物活性を保持したままリボソームを固体基板上に固定できたことを意味する。さらに、タンパク質生合成過程をSPRによりモニターすることに成功した。得られたSPRシグナルは、リボソームの活性情報が含まれているため、タンパク質の合成状況を把握できる。本システムは、タンパク質工学やペプチドドラッグなどの創薬研究などへの応用が期待できる。本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) からの助成を受けて行われた。

T. Matsuura, H. Tanaka, T. Matsumoto and T. Kawai : Immobilization of ribosomes on surface and SPR monitoring of protein biosynthesis

3P331

バイオミネラリゼーションに及ぼすフェリチンのN末端残基の影響

○慶澤 景子¹、岩堀 健治¹、山下一郎^{1,2,3} (¹JST・CREST、²松下電器 先端研、³奈良先端大)

現在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、フェリチンタンパク質の空洞内に様々な金属の導入を行ってきた。しかしながら、バイオミネラリゼーション機構については未だ詳細に解明されておらず、現在の重要な課題となっている。フェリチンは24個のサブユニットからなる球殻状構造をとり、そのサブユニットは5つのヘリックス (A-E) とBCヘリックスを結ぶループ、フェリチン表面に位置する非ヘリックス部分のN末端で構成される。リコンビナントL-フェリチン (Fer0) のN末端8残基欠損体であるFer8はFer0よりも酸安定性が低下する。これはN末端8残基がサブユニット内及びサブユニット間相互作用に大きく影響をあたえており、24量体構造の安定化に寄与していることが原因である。また、フェリチンのN末端残基は3回対称外表面に位置しているため、3回対称外表面付近における金属の挙動に影響を及ぼしている可能性がある。そこで今回はバイオミネラリゼーションに及ぼすN末端残基の影響を検討した。Fer0、Fer8溶液に、水溶液中でプラス電荷を持つFeイオンもしくはマイナス電荷を持つAuイオンを添加し、TEM測定及びスペクトル測定によりタンパク濃度と金属粒子形成量を測定した。Feイオンを添加したところ、Fer0及びFer8同様にフェリチン空洞内にバイオミネラリゼーションが起こった。Fer0ではAuイオンを添加したところ、フェリチン外溶液でナノ粒子形成が促進された。以上よりN末端残基が外溶液中の金属イオンに対して相互作用を持ち、バイオミネラリゼーションに影響を与えていることが明らかになった。

K.Yoshizawa, K.Iwahori and I.Yamashita : The effect of N-terminal residue of L-chain apoferritin on the biomineralization

3P330

過酸化水素水を用いたフェリチンへの酸化亜鉛導入

○奥田 充宏、西尾 和晃、松川 望、山下一郎 (松下電器・先端研)

タンパク質の中には構造内に空間を有するタンパク質が数多く見られる。また、タンパク質の中にはバイオミネラリゼーションと呼ばれる、無機物からなる構造物を形成する機能を有するものがある。我々はこのような生体物質の機能と構造を用いた電子デバイス作製方法「バイオナオプロセス」を利用することで、デバイスの作製に取り組んでいる。空洞を保有するタンパク質の一つにフェリチンと呼ばれる球状を構成するタンパク質がある。フェリチンは外径12 nmの球状タンパク質で、中心部に内径7 nmの空洞を持つ。生体中では中心部の空洞に酸化鉄のコアを形成し、鉄の貯蔵を行なう役割を持つ。このフェリチンの鉄取り込み機能を解明し、鉄以外の金属を空洞中に導入することはバイオミネラリゼーション及び、工学的応用面から見ても興味深い。現在までに、ニッケル、インジウム等のナノ粒子が作製されているが、今回、過酸化水素水を加えることにより酸化亜鉛の導入に成功したので報告する。溶液 [終濃度 0.2mg/mL フェリチン (Fer-8) + 2mM 酢酸亜鉛 + 200mM HEPES (pH7.8) + 16mM アンモニア + 100mM H₂O₂] を室温で24時間放置し、透過型電子顕微鏡で空洞内に形成されたナノ粒子を確認した。染色は空洞内部を染色しない金グルコースで染色した。コア形成には過酸化水素水が必須で過酸化水素水濃度依存性が高いことがわかった。さらに反応溶液を3,000 g × 10分 で遠心し、220nmのフィルタリングの後、濃縮を行なった溶液を、エネルギー分散型X線分析装置付き高分解能透過型電子顕微鏡により観察した。元素分析から亜鉛のピークが観測され、又、格子像観察から明瞭な酸化亜鉛の結晶格子を確認した。本研究は文部科学省リーディングプロジェクトとして実施した。

M.Okuda, K.Nishio, N.Matsukawa, I.Yamashita : Fabrication of zinc oxide nano-particles using ferritin and H₂O₂

3P332

球殻状タンパク質リステリアフェリチンを用いた半導体ナノ粒子の作製

○榎本 隆弘¹、岩堀 健治²、山下一郎^{1,2,3} (¹奈良先端大・物質、²JST/CREST、³松下電器 先端研)

[目的] 球殻状タンパク質フェリチンを用いたナノ粒子作製は盛んに試みられている。フェリチンと同じ球殻状タンパク質であるリステリアフェリチンは外径9 nm、内部に5 nmの球状空洞構造を有し、フェリチンより小さなナノ粒子作製が可能である。今回、リステリアフェリチンを用い、発光素子等への応用が期待されている化合物半導体、CdS ナノ粒子作製を初めて試みた。[実験] CdS ナノ粒子作製条件として、反応溶液の硫黄濃度、pH、アンモニア水濃度の検討を行い、作製粒子の同定を行った。[結果・考察] CdS ナノ粒子作製の最適条件を検討した結果、硫黄濃度 5.0 mM、pH 4.5、アンモニア水濃度 75 mM となり、ナノ粒子形成率は約 50%であった。またEELS分析より作製ナノ粒子はCdとSから成ると判断された。溶液中の硫黄濃度の上昇に伴い、ナノ粒子形成率は上昇したが、硫黄の濃度が11.0 mM以上では減少する結果となった。硫黄濃度の上昇に伴いリステリアフェリチン外で形成されるCdS量が増加し、リステリアフェリチン内で反応するカドミウムイオン量が減少したためであると思われる。反応溶液のpHが4.5-6.5ではナノ粒子形成率は高く、7.0以上で減少する結果となった。pH 7.0以上におけるナノ粒子形成率の減少は、反応溶液中の硫黄が不安定な硫化物イオンとして存在し、リステリアフェリチン外でカドミウムイオンと反応したことが原因であると考えられる。一方、高濃度のアンモニア水添加はカドミウムアンミン錯体形成を促進し、リステリアフェリチン外でのCdS形成を抑制するためにナノ粒子形成率の上昇を導いたと考えられる。以上より、リステリアフェリチンを用いたCdSナノ粒子作製はリステリアフェリチン外でのCdS形成を抑える条件で行うことが望ましいと結論付けられた。

T.Enomoto, K.Iwahori and I.Yamashita : The synthesis of semiconductor nanoparticles in the Listeria ferritin cavity