3P337

金ナノ微粒子をキャリアとする免疫学的応答と効率的な抗体生産

○石井 則行¹、Fitrilawati F.^{1,2}、Manna A.³、秋山 陽久¹、玉田 靖⁴、玉田 薫^{1,5} (¹産総研、²パジャジャラン大、³シンガポール国立大、⁴農業生物資源研、⁵東工大)

アゾベンゼン誘導体は抗原性が低く単独では抗体産生能をもたない(=ハプテン)、比較的大きな蛋白質等をキャリアとして結合することで抗体産生に良い効果を与える例が知られている。しかし、同時にキャリアとして用いた蛋白質等に対する抗体も生産され、精製を困難にする等の問題があった。これらを合理的に解決する方法として、生体に害のない金ナノ微粒子を用いた、効率の良い抗体生産法を開発したので報告する。免疫感作は、アゾベンゼン誘導体で表面修飾した金ナノ微粒子を、免疫増強剤(アジュバント)に分散させ、週1回の間隔でウサギに皮下注射し、免疫応答の経時変化を観察した。定期的に採血し、血清の生化学的試験(ELISA法)により抗体価を確認した。等量のアゾベンゼン誘導体のみを投与したウサギでは抗体の産生は認められなかったが、金ナノ微粒子をキャリアとし空間密度を高めたアゾベンゼン誘導体を投与したウサギで、優位な抗体産生が見られた。興味深いことに、一度アゾベンゼン誘導体のみを投与したウサギに、引き続き、金ナノ微粒子をキャリアとしたアゾベンゼン誘導体を投与しても抗体産生はほとんど確認されなかった。上述の方法により調製した抗体と、抗原であるアゾベンゼン修飾金ナノ微粒子との認識反応について、透過型電子顕微鏡(TEM)によるモルフォロジー観察を行なったところ、金ナノ微粒子の周囲に抗体が特異的に結合する様子が確認できた。また、アゾベンゼンで修飾した平面金基板の表面プラズモン共鳴分光法(SPR)測定において、抗体が、生体内での安定構造であるトランス体アゾベンゼンに優先的に結合することが実験的に確認できた。これらの知見は金属ナノ微粒子のバイオ関連分野への新たな応用展開を示唆するものであると同時に、臨床治療への応用の可能性および克服しなければならない問題点等を提起している。

N.Ishii, F.Fitrilawati, A.Manna, H.Akiyama, Y.Tamada and K.Tamada : Gold nano-particles work as a carrier in immunological response

3P339

システインを導入したTRAPによる基板上Auナノ粒子の固定

○藤原 勇¹、吉井 重雄²、西尾 和晃²、Hedde Jonathan^{3,4}、山下 一郎^{1,2,3} (¹奈良先端大、²松下電器先端研、³JST-CREST、⁴横浜市立大)

【背景・目的】我々はタンパク質を利用した半導体素子の作製を、バイオナノプロセスとして提案してきた。今回、リング状タンパク質TRAP (tryptophan RNA-binding attenuation protein) のAuナノ粒子固定と固体基板への吸着を検討した。トリプトファン合成を調節するTRAPは11個のタンパク質サブユニットから成る複合体であり、外径約10nm、中心部に直径約2nmの開口部を持つリング形状をとる。本検討ではTRAPの内部に遺伝子改変によりシステインを導入したミュータントを作製し(TRAP-Cys)、リング内部への金粒子固定とTRAP自体の基板表面上への固定を試みた。【実験および結果】TRAP-Cysを直径2nmのAuコロイド微粒子と液中にて混合し、室温にて8時間以上保持した。透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したところ、一部のタンパク質において、金ナノ粒子の固定が観察された。また、厚さ3nmの熱酸化膜(SiO₂)を持つSi基板上に金属Ti薄膜を蒸着し、大気暴露して厚さ5nmのTiO₂酸化膜を作製し、次にTRAP-Cysの水溶液をSiO₂表面およびTiO₂表面に滴下し、室温にて30分保持し純水洗浄後、原子間力顕微鏡(AFM)で観察した。TiO₂表面には多数のTRAP-Cysが吸着し、SiO₂表面には殆ど吸着が見られなかった。さらにTRAP-Cysを吸着させたTiO₂/Si基板を、調整したAuコロイド水溶液に浸漬して3時間以上保持し、基板を純水洗浄した。TEM、AFM及び走査型電子顕微鏡(SEM)により吸着したTRAP-CysへのAuナノ粒子の固定を確認した。今後、TiO₂パターニング基板へのTRAP-Cys選択吸着を行ってAuナノ粒子固定を行う予定である。本研究の一部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。

I.Fujiwara, S.Yoshii, K.Nishio, J.Hedde and I.Yamashita : Immobilization of Au nano-particles on substrate by cysteine mutant TRAP

3P338

タンパク質素材によるアルミニウムナノ粒子作成

○小西 徹、近藤 哲郎、大塚 泰之、金子 嵩之、深野 弘子、吉村 英恭 (明大・物理)

我々は、これまでにたんぱく質素材であるFerritin、またはDpsにおける内部結晶化による金属のナノ粒子化を行ってきた。Ferritinにおいては、Fe, In, Co, Niなどの金属を内部に結晶化させることができた。今回我々は、Ferritin内部に新たにアルミニウム(Al)を結晶化させることが可能になったので報告する。Alの結晶化には、100 mMHEPES (pH6.8~8.2)、リコンビナントapo-ferritin(0.1~0.5mg/mL)、硫酸アンモニウムアルミニウム水溶液(1~5 mM)を使用する。それらを常温(23℃)において反応させ、すぐに4℃の環境化において24時間反応を進めた。その結果50~80%のapo-ferritinにAlの内部結晶を生じさせることができた。内部結晶の形成の割合は、HEPESのpH、apo-ferritin、硫酸アンモニウムアルミニウム水溶液の濃度を変えておこなった。この結果より、Ferritinには、Alの内部結晶の形成には、ある程度の条件がそろえば可能であることがわかった。学会では、内部結晶の構造組成について報告する予定である。

T.Konishi, T.Kondoh, Y.Otsuka, T.Kaneko, H.Fukano, H.Yoshimura : Fabrication of aluminium nanoparticles using the ferritin protein

3P340

多角体の物性

○濱田 格雄¹、中村 亮介¹、市田 秀樹¹、兼松 泰男¹、徳永 史生²、森 肇³ (¹CREST・JST、阪大・先端イノベ・VBL、²CREST・JST、阪大院理、³CREST・JST、京工繊大・応生、プロテインクリスタル)

昆虫ウイルスである細胞質多角体病ウイルス(CPV)は、宿主である昆虫の冬眠という发育ステージに自らのステージを合わせるため、宿主の細胞質中に多数のウイルス粒子を封入した結晶化タンパク質のカプセルである多角体という巨大な構造物を形成する。多角体は本来、ウイルス粒子が長期間外的環境下に放置されてもその感染力を保つためのカプセルであり、化学的・物理的に非常に安定した特性を持っている。多角体の中にウイルス粒子が特異的に封入される現象は、ウイルス粒子の外殻タンパク質(VP3)と、多角体タンパク質(ポリヘドリン)との間の特異的相互作用によるものであることが示されており、VP3と外来タンパク質からなる融合タンパク質と、CPVのポリヘドリンを培養細胞中で同時期に発現させることで、この融合タンパク質を封入した多角体を得ることが出来る。前年度、年会におけるシンポジウム「ナノバイオエンジニアリングの基礎としての生物物理学」講演において細胞増殖因子(FGF2)を封入した多角体を用いた細胞増殖実験の結果が示された。これは多角体中に封じ込められた蛋白質が生理活性を持つことを示した実験である。今回、我々のグループでは、多角体そのものの性質と多角体中に閉じ込められた蛋白質が実際にどのように機能発現をするのかを検討するために分光実験による検討を試みた。多角体の表面物性を確認するためにさまざまな蛍光プローブを添加し、蛍光測定などの分光を行った結果、表面は、疎水性が高いことが確認された。生理機能を確認するために、GFPやカルシウム添加により構造変化を誘引できるS-モジュリンなどの蛋白質を封じ込めた多角体を作製し、蛍光実験をはじめとする分光実験を行い、多角体内での蛋白質の動きについて検討を行ったので報告する。

N.Hamada, R.Nakamura, H.Ichida, Y.Kanematsu, F.Tokunaga and H.Mori : Properties of Polyhedra