特集論文要旨

総合論文 DNA 分子組織体上でのクロモフォアの配列化

大矢 裕一

関西大学工学部 (〒564-8680 吹田市山手町 3-3-35)

生体系では、多数の分子・高分子が非共有結合的な相互作用によって組織化しており、同種あるいは異種の分子や原子団（官能基）が集合・配列化すると同時にそれらが動的かつ協同的に働くことにより、単独の分子が持ち得ない高次の機能を発生せしめている。意図した順序や間隔で分子を並べることができれば、bottom-up 型のナノテクノロジーへの大きな貢献が見込まれる。天然の光合成システムでは適切な間隔と配向でポルフィリン類縁体が空間配置することで、高効率な光エネルギー移動を可能にしている。従って、蛍光性クロモフォアをエネルギー順位の順で空間的に配置させれば、天然の光合成システムに倣った人工光合成システムのモデルが構築できると考えられる。DNA は相補的水素結合による高い認識能と結合能を有し、そのシーケンスを変化させることにより容易に結合基の組み合わせ (binding donor, binding acceptor) を調製できるので、分子と分子をプログラマブルに配列化させる「分子のり (molecular glue)」として、自己組織的にナノメートルスケールの分子組織体を構築するのに極めて有効である。筆者らは、こうした DNA の特性を利用してクロモフォアモデルとして芳香族化合物をコアとして 2 本の oligo-DNA 鎖を逆方向に伸長した oligo-DNA dimer を用いて一次元の多重会合体を構築することに成功した。また、末端を蛍光性クロモフォアで修飾した 10 残基 oligo-DNA と 30-40 残基のマトリックス DNA を用いることにより、シーケンシャルなクロモフォア・アレイを構築し、そのクロモフォア間での多段階の光エネルギー移動が起こることも確認した。こうした oligo-DNA とクロモフォアからなる分子組織体は、人工光合成システムのモデルとしての光エネルギーの伝達・変換システムの構築やナノメートルスケールの機能分子組織体構築に有用であろうと考えられる。

(連絡者：大矢裕一) Vol.4, No.1, 5 (2004)

総合論文 ナノ粒子を利用した生体分子の検出と精製

友廣 岳則

富山医科薬科大学 薬学部 (〒930-0194 富山市杉谷)

物質がナノサイズまで小さくなると表面積／体積比が増大するだけでなく、例えばブラウン運動など運動性や反応性は熱的な揺らぎや量子的な揺らぎに支配されるようになる。半導体物質では発光特性などに量子サイズ効果等が生じ、磁性現象における量子トンネル効果など多様な独特な物理的性質を示す。最近ではこれらをバイオ領域に応用しようとする技術が展開している。例えば機能性高分子や磁性粒子による生体分子の分離システムや金粒子を使ったバイオセンシング技術、また量子ドットによる標識化技術など、ここでは主に数 nm から数百 nm サイズの粒子を用いた生体分子の検出と精製、バイオシステムへの応用等について最近のトピックスを中心に解説する。

(連絡者：友廣岳則) Vol.4, No.1, 11 (2004)

ナノ粒子を利用した生体分子の検出と精製

Nanoparticle-Based Detection and Purification of Biomolecules

友廣岳則

富山医科薬科大学 薬学部
〒930-0194
富山市杉谷 2630

Takenori TOMOHIRO

Faculty of Pharmaceutical Sciences
Toyama Medical and Pharmaceutical University
2630 Sugitani, Toyama
930-0194, JAPAN

Abstract: With decreasing size of particles to nanometer level, the surface-to-volume ratio is largely increasing as well as the mobility and reactivity, and the dispersion of nanoparticles is dominated by thermodynamic and quantum fluctuation. Compared with bulk-sized materials, nanomaterials show the unique physical properties such as optical property of semiconducting materials by quantum-size effect, quantum-tunneling effect of magnetic materials. Currently, nanotechnology has been rapidly applied to biological systems and many bioconjugate nanomaterials have been developed with new concepts, especially in the fields of separation and detection of biomolecules, and regulation of biological reactions. This article reviews a variety of new applications of these materials for advance of biotechnology, which include biosensing systems using various gold nanoparticles, quantum dots-based fluorescence labeling techniques, and separation/detection of biomolecules using pH- or temperature-sensitive polymers and magnetic particles.

Key words: Nanoparticle, Nanobiotechnology, Nanotechnology, Bioconjugate, Molecular Recognition

1 はじめに

微細化技術におけるリソグラフィーやエッチングなどによるトップダウン方式とナノマテリアルを積み上げるボトムアップ方式はナノテクノロジーの代表的手法として発展してきた。最近では特に DNA¹⁾ やタンパク質²⁾ などソフトナノマテリアルを素材化し、分子認識をキーワードに自発的集合・分散が可能なネットワーク構築を目指したボトムアップ法が注目されており、さらにそれらをゲルや微粒子などのマトリックスに利用したチップ化やナノパターン形成技術が広がりを見せ始めている。これらの技術開発と平行して、ナノテクノロジーもまた生体分子の検出や操作をはじめ生体内反応の可視化や制御などバイオテクノロジーの新しい展開に貢献してきた。特にナノメートルという大きさの材料が持つ特性を利用する研究が急速に進展しており、ここでは主に数 nm から数百 nm サイズの粒子を用いた生体分子の検出

と精製、バイオシステムへの応用等に関して最近のトピックスを加えて紹介する。

2 微粒子による生体分子の検出と生体反応の制御

機能性ミクロスフェアは細胞分離や生体物質分離・精製をはじめ、ドラッグデリバリー (DDS)、固定化酵素やイムノアッセイなどバイオ領域の様々な分野において応用され実用化されてきた³⁾。多くの場合、特異的な認識や酵素反応を行う生体成分を微粒子の表面に固定化して用いるため、特に生体物質分離や酵素反応システム等にはその認識する反応場として十分な表面積や高い分散性、反応性が要求される。一般に粒子サイズが小さくなるに従い、重量に対する粒子表面の割合つまり表面反応を行える生体分子数が増大し、さらに運動性や反応性も向上する。従って単位重量当たりの反応効率が向上する。もちろん他の因子として固定化のための官能基、均一性と分散性、B/F 分離機能、非特異的吸着や固定化タンパク質変性の抑制などが重要であり、使用目的によって担体の素材やサイズは選択される。例えば、磁性粒子

連絡者: 友廣 岳則
E-mail: ttomo@ms.toyama-mpu.ac.jp

は細胞などの分離や DNA, RNA を対象とする遺伝子工学分野に繁用されているが、サブミクロン以下の粒径になると通常の磁気分離が難しくなる。以下に代表的なナノ粒子とその応用について述べる。

2.1 有機高分子

2.1.1 単分子粒子

ナノサイズの有機高分子粒子は大きく単分子、分子集合（高分子ミセル）、重合・凝集の各粒子に分けられる。単分子粒子ではフラレンやデンドリマーが代表的である。 C_{60} 分子は約 0.7 nm の大きさの疎水性炭素構造体であり表面化学修飾が比較的容易である。比較的毒性が弱い医療分野でも注目されており、例えば HIV プロテアーゼ活性阻害によるエイズ治療薬⁴⁾、レーザーや超音波照射による活性酸素発生を利用した癌治療薬⁵⁾、さらに $Gd@C_{82}(OH)_n$ など親水性の Gd 含有フラレンは MRI（磁気共鳴イメージング）の造影剤⁶⁾ として有望視されている。一方、樹木状構造を持つデンドリマーは数世代を経ると直径十 nm 程度の扁球状の粒子を形成する。これらは完全に分子量や構造、官能基を制御できることが特長である。

2.1.2 高分子ミセル型粒子

性質の異なるパーツから成り立つブロック共重合体は相分離し高分子ミセル型の粒子を形成する。ポリサッカライドにコレステロールを 5 wt% 導入すると疎水性会合が起こり粒子を形成することが確認されて以来⁷⁾、高分子の種類や分子量、疎水基の割合により粒子径や密度等が制御できるようになった。つまり、多様な化合物の抱接・除放制御が可能になりプロドラッグ型酵素や DDS 等が期待される。ユニークなものでは PEG（ポリエチレングリコール）と電荷を持つブロックからなる高分子の報告例がある。正電荷と負電荷の 2 種類を作製し混合すると、電荷を有する部分が同じ長さの場合には、電荷部分の会合に続いてそれを核にした数十 nm 径のコア・シェル型の粒子が形成される (Fig. 1)⁸⁾。

Fig. 1 Core-Shell Particle Formation of Oppositely Charged Block Copolymers.

2.1.3 重合・凝集型粒子

重合法によってナノサイズの均一な粒子を作製するのはそれほど容易ではないが、O/W 型マイクロエマル

ジョン法によって数十 nm 径のラテックス粒子が得られ、ソープフリー重合法では分散性が極めて高い数百 nm ~ 1 μ m 径の粒子が得られる。これらの粒子を物質分離・精製に用いる場合、通常の遠心法による B/F 分離には数百 nm サイズが必要であり、数十 nm 径の粒子では磁性体を用いても迅速性に問題がある。このような場合は粒子の凝集・分散を利用する手法が利用されている。例えばイムノアッセイに代表されるように抗原あるいは抗体を粒子表面に固定して免疫凝集を行うことが可能であり、近年 DNA 相補性を利用した凝集による一塩基多型 (SNPs) 検出法⁹⁾ が多数報告されている。

一方、温度や pH、光、磁気などの刺激応答機能を持った微粒子が注目されている。温度や pH 応答性ラテックスでは条件により粒子表面の親疎水性が変化する。表面がイソプロピルアクリルアミド (NIPAAm) のポリマーからなる粒子では 32°C 付近に臨界凝集濃度を持ちその前後で急激にポリマーの水和力が変化する¹⁰⁾。つまり低温では水和ポリマーが形成されるため分散安定性が高いが、高温では脱水和により疎水性が増すため分散安定性が著しく低下し凝集を起こす。この状態変化は各種ポリマー組成に依存することが知られており目的とする温度領域に設定が可能である。粒子表面にカルボキシル基など酸、塩基性基を有する場合も、溶液の pH により表面電荷が変化し上記温度応答性高分子と同様に分散安定性を変えることにより凝集分離することができる。応用範囲は広くタンパク質などの脱吸着の制御¹¹⁾ や DNA-poly (NIPAAm) による SNPs 解析¹²⁾、酵素機能の on/off¹³⁾ など多くのバイオシステムに利用されている。

2.2 磁性粒子

磁性を応用する場合にまず考えられるのは、磁性体を含む固定化担体を磁力で B/F 分離する方法である。一般的にラテックス粒子に比較し粒径は数 μ m 程度と大きく粒径分布も広い、沈殿が早い、凝集が起こりやすいという欠点があるが、分離が迅速で簡便、生体分子に影響を与えないなどの利点があるため細胞分離や DDS、イムノアッセイなどの分野で多くの磁性粒子が市販されている。既に遺伝子工学分野への応用が進み、mRNA 分離やビオチン化プライマーを使った PCR 生成物の精製や DNA 診断¹⁴⁾ をはじめ、最近では RNA polymerase の転写過程における回転運動を直接観察するプローブとして用いられた¹⁵⁾。

例えば高温下で蒸気凝縮法による鉄粒子作製など金属ナノ粒子を工業的に製造する方法は多数報告されているが、一般にその粒径の均一性は低いのが現状である。ところが、磁性細菌をはじめヒトを含めた生物は極めて均

一なナノ粒子を自ら作製しており、これを材料に応用する研究が進められている。磁性細菌 *M. magnetotacticum* には数十 nm の単結晶マグネタイトが 10 ~ 20 個直鎖状に列に並んだ構造を持つマグネトソームが存在する。この粒子はリン脂質膜で覆われているため分散性がよく、特に magA 遺伝子産物がその膜上に発現し鉄輸送に関与していることが確認され、遺伝子レベルで抗体等の表面修飾が可能になった¹⁶⁾ ことはバイオ分野の研究者にとって有益である。一方、哺乳動物が持つ主要な鉄イオン貯蔵システムにタンパク質複合体のフェリチンが知られている。無機コアを含まないタンパク質部分をアポフェリチンと呼ぶが、既に人工アポフェリチンが作られており、その中にナノ粒子を in vitro 合成できる上、その酸化鉄のサイズや磁化状態を調製できる¹⁷⁾。特に均一なサイズは量子デバイスを作製する上で重要なポイントになるため、この磁性粒子を Si 基盤上に配列する試みも進められている¹⁸⁾。このように化学工学的に難しいプロセスを生物に任せるのは大変機能的だと思われる。

2.3 金粒子

金粒子は 1) 化学的に安定であること、2) 多様なナノ粒子を単分散で調製でき、容易に入手できる、3) 重金属元素であり、電子散乱能が大きく二次電子の放出効率が高い、4) 金粒子周囲に多量の銀を吸着させることで増感可能、5) チオール基との結合により修飾が容易であるなどの特徴があり、従来から広く生体組織の電子顕微鏡コントラスト剤、イムノアッセイ抗体標識に用いられ、さらに電極を含む基盤表面を金でコーティングすることで分子の固定化や電気化学的検出に利用されてきた。一方、金ナノ粒子は赤橙色ないし赤褐色を呈することが知られている。これは微小空間内に閉じこめられた自由電子が光と相互作用して生じる表面プラズモン共鳴によるもので、粒子サイズや周囲環境により大きく影響される。この性質を利用して DNA、特に遺伝子診断で

重要な SNPs の検出が多数報告されている。例えば 1 本鎖オリゴヌクレオチドを導入した 2 種類の金粒子を作製し、そこに両方のオリゴヌクレオチドに結合可能な配列を含む標的 DNA を溶液中に加えると、次々とハイブリダイズし凝集体を形成する (Fig. 2)¹⁹⁾。金ナノ粒子は表面プラズモン共鳴により赤色/ピンク色を呈するが、凝集により粒子周囲の誘電率が著しく変化すると青色/紫色へ変化する。形成された二本鎖の安定性は温度や塩濃度に影響されるが、特に塩基対のミスマッチがある場合は大きく不安定化するため融解温度 (T_m) が下がる。つまり特定温度における溶液の色の変化を自分の目で追うことにより簡便にしかも高感度に、標的 DNA を標識化する必要もなく SNPs 解析ができる²⁰⁾。特に金粒子は銀増感法を用いることで表面ラマン散乱による検出が可能になり²¹⁾、さらに高感度な電気化学的検出も可能である²²⁾。後者は光リソグラフィーで作製した微小電極間のギャップに DNA 相補鎖 (標的 DNA) を利用して金ナノ粒子を捕集し、銀析出させることにより電極間の電気伝導度変化を捉えたものである。

検出のみならず、金ナノ粒子をアンテナにして DNA 機能を遠隔操作することが報告された。金属ナノ粒子をラジオ波領域の高周波磁場にさらすと誘導カップリング効果により渦電流が生じ、局所的に熱が発生してナノ粒子近傍の温度が上昇することが知られている。Jacobson 等²³⁾ はヘアピン構造の DNA が結合した 1.4 nm の金ナノ粒子を 1 GHz 磁場におくと二本鎖は融解し、遮断すると再結合することを報告した。50 ピコ秒で on/off が可能なことや熱は粒子の極近傍でのみ発生し周囲の生体分子に影響を及ぼさないことも利点である。何よりも外部から特定物質のみ制御できる点で興味深い。

2.4 量子ドット

エレクトロニクス分野でデバイス素子として開発が進められてきた半導体量子ドットはそのサイズ効果による発光特性が注目されていたが、1998 年に CdSe ナノ結晶

Fig. 2 Selective Colorimetric Detection System of Polynucleotides Using Gold Nanoparticles.

が標識剤として生体分子に適用された²⁴⁾。この発光波長は結晶の種類とサイズに依存し、例えば数 nm の CdSe では可視領域、InP は可視～近赤外領域、InAs は近赤外～赤外領域の発光を示し、また粒径が大きいほど長波長にシフトする。発光スペクトルのバンド幅はシャープ (20～30 nm) であり、CdSe では粒子径を変えるだけで任意の可視光を作れる上に 350 nm 付近の同じ光で励起できる。また発光強度が on/off する blinking 現象も CdS や ZnS で覆うことにより抑えることができる。CdSe の他に Si 量子ドットは光・電荷特性を有するレドックス活性種として利用可能であり、光照射による発光が 420 nm であるのに対し電気化学的に励起すると 640 nm の光を出し大きく赤色シフトするという特徴を持つ²⁵⁾。

バイオ分野への応用ではまず生体分子の蛍光標識が考えられる。蛍光ラテックス粒子と同様に、例えば 3 種類の量子ドット (赤、青、緑) を特定の割合でポリマー粒子に組み込めば多様な色のバーコードが調製でき、多様な分子を標識できる (Fig. 3)²⁶⁾。しかも自己消光や異種ドット間での蛍光エネルギー移動を起こさないの信頼性の高い素材である。初期段階では、生体分子に応用する場合に粒子の凝集が起こりやすくハンドリングが難しいことが問題であったが、最近では PEG-PE などリン脂質でコーティングすることによって、発生過程を *in situ* で長時間に渡り追跡することに成功している²⁷⁾。特にローダンミンなど通常の有機蛍光剤に比較して発光強度と耐久性、化学的安定性、低毒性、ラベル化分子投与後の初期 S/N 比に優れていることが有意な点である。標識剤以外にも、量子ドットが光励起により電子-正孔分離を起こすことで生じる電場を利用して、神経細胞のポテンシャルを変化させる試みも進められている²⁸⁾。

3 生体分子の分離・精製

ナノテクノロジーのバイオへの応用研究は主として生

体分子の検出法の開発、生体反応の可視化であり、生体分子を使ったナノ構造体構築に関心が集まっている。生体分子の分離・精製に関してまず取りあげるのは、微粒子の応用例ではないが、生体分子の挙動をナノスケールという観点から理解しそれを生体分子の分離手法に応用した試みである。

3.1 ブラウン・ラチェット<爪車>による分離

小さな物質の現象に例えばブラウン運動が挙げられる。多くの生体分子はナノスケールの大きさである故に生体内での分子運動は熱的な揺らぎや量子的な揺らぎに支配されている。さらに周囲の水分子の衝突を激しく受けながらも、秩序的に物質を輸送し、合成し、分解する等の生体反応を行っている。例えば、キネシン分子モーターを見てみると、このタンパク質は微小管のレール上を一方向に毎秒 1 μm 、車に例えるなら時速 100 km に相当する速度で移動している。これまでは ATP 分解によるエネルギーを使い移動しているものと考えられてきた。ところが最近の研究ではこの動力源はブラウン運動によるものであり、ATP 分解エネルギーは単にそのポテンシャルを揺するのに使われているという。通常微小な物質であるタンパク質は周囲の水分子等による衝突を受け、方向性のないランダムな動きをするが、そこに菌止めが付いているギヤ：ラチェットのようにある方向に「ブレーキ」をかけてやれば反対方向に移動するようになる (Fig. 4)。つまりランダムな熱揺らぎから方向性のあるエネルギーを取り出すことが出来る。これは、エンジンを搭載しそれを動力源とする車とは基本的に原理が異なる。

エレクトロニクス分野では以前よりこのようなブラウン・ラチェット現象を利用したデバイス開発に人力が注がれている。上記のような生体分子をナノ分子としてとらえた生体内現象の理解はナノ素材を利用してそれを実現・応用化する研究を促進しており、既にラチェットの原理を利用した「分子ふるい」による分離システムが考

Fig. 3 Multiplexed Optical Code of Biomolecules Using CdSe Nanocrystal.

Fig. 4 Brownian Ratchet Array for Separation of Lipids.

案されている。例えばDNAをサイズにより分離する場合、アガロースやポリアクリルアミドゲルを使った電気泳動法が用いられる。最近ではマイクロチップ化した電気泳動法²⁹⁾が進展を見せている。ガラスやプラスチック基盤上の細い溝に微粒子やナノサイズの柱 (pillar) を作製することによって上記ゲルに代わる「メッシュ」効果により移動速度を制御できるようになってきた。Boxer 等³⁰⁾はスライドガラスに高さ 25 nm の山形をした非対称模様を描いた2次元分子ふるいを作製した。大部分が中性脂質分子である溶液中に電荷を持つ種々の脂質分子を加え電場をかけたところ、ラチェット効果により物質は非対称な障害物のために単純な拡散ではなく一方向に移動しやすくなり、効果的に分離できることを見出した (Fig. 4)。

3・2 生体親和性粒子による分離

ナノテクノロジーにより一分子を操作し解析することができ、DNAチップやプロテオーム解析技術の進歩により数千から数万の遺伝子やタンパク質ネットワークの動態解析が可能になってきた。それでも現時点では個々のリガンド分子に対するレセプター群を探索しさらにサブユニットを含めた関連因子を確実に同定し解析するためには、やはり効率的な精製技術が必要である。次にタンパク質の精製についてナノ粒子を用いた例を取りあげる。

一般にクローニングベクターを用いて発現させたタンパク質は様々なタグを導入することができ、対応した市販のアフィニティーカラムで比較的容易に精製できる。しかるに細胞粗抽出液から直接タンパク質を精製しようとする場合には一段階精製は難しく、通常、硫酸沈殿の他、多種類のカラム法 (サイズ排除、イオン交換、逆相、アフィニティー等) を駆使した多段階の精製過程が必須である。アフィニティー精製は酵素-阻害剤、抗体-抗原といった分子間の高い親和性に基づいて分離するので効率はいいが、抗原-抗体結合などはかなり強いいためその溶出には変性を伴う過酷な条件が一般的である。また、DNA固定カラムによる転写因子のアフィニ

ティー精製では、一般に多孔性カラム担体内部への滞留や疎水的・静電的相互作用による吸着の他、リガンドであるDNAの濃縮効果等のため比較的弱い親和性のタンパク質 (非特異的も含め) でも結合するようになる。従って、非特異的結合を抑えるために界面活性剤や poly (dI-dC) など競争阻害剤の大量添加や樹脂上のDNA密度を下げたり、結合をカラム外で行わせる (例えば、リガンドである dsDNA 末端に (TG)_n などの突出部分を付け、相補鎖である (CA)_n 結合担体で分離する) など選択的溶出法の改良や工夫が必要になってくる。

ここで重要なポイントの1つに固体表面への非特異的吸着の抑制が挙げられる。生体親和性という点ではこれまで親水性基や脂質等によるコーティングが有効とされてきたが、近年、粒子表面に存在する水分子の構造やダイナミクスによる生体分子の水和 (溶媒和) 等への影響が重要視されている³¹⁾。特にメトキシエチルアクリレートやグリシジルメタクリレート (GMA) のポリマー表面は静電的相互作用が小さく、適度な疎水性/親水性バランスを持つためタンパク質等の吸着を抑えることが見出された。一例として半田、川口等により開発されたSG粒子を取りあげる。これはソーブフリー乳化重合により調製したスチレン (St) と GMA のコポリマーにさらに GMA をシード重合した均一な粒子である³²⁾。アフィニティー精製に用いる担体はリガンド分子の固定化量が重要であるため通常は多孔性にして表面積を稼ぐ。SG粒子の粒径は約 200 nm であり従来の担体に比べ数百～数千分の一と小さいため単位容積あたりの表面積は著しく大きい (1 g 当り約 20 m²)。多孔にする必要がなく、従ってポリマー内部への吸着や滞留が抑えられる。微粒子コアはジビニルベンゼンで架橋された poly (St) を含むため硬くて分散安定性が高く、しかも汎用の遠心機で効率良く分離可能な比重を持つ。特に表面は poly (GMA) で被覆されタンパク質の非特異的吸着が少なくなるよう設計されている。実際に SG 粒子による親和性タンパク質の溶出はインキュベーション (粒子とタンパク質の混合) 時間に依存して増加し、非特異的なタンパク質吸着

Fig. 5 Affinity Purification of CDDP-DNA Binding Proteins Using SG Beads. SDS-pages of eluates (a) from SG beads³⁴ (+: CDDP-DNA, -: CDDP free DNA as ligands immobilized on beads) and (b) from cellulose beads³⁵ after three kinds of purification procedures. ▲: Proteins were analyzed for their binding activity.

量は減少する傾向が見られた。分散性と反応性におけるサイズ効果と吸着抑制効果が示された。

細胞粗抽出液から温和な条件で直接精製できれば、弱い親和性のタンパク質精製やマルチサブユニットタンパク質複合体取得に有利である。DNA-SG 粒子は、例えば転写因子 CREB/ATF ファミリーとそのコアクチベーター CBP³³⁾ や損傷 DNA 結合タンパク質³⁴⁾ 等の精製に応用された。特に抗癌剤であるシスプラチン (CDDP) が結合した DNA への親和性タンパク質の精製では、その結合が比較的弱いことや種類が多岐に渡るため精製・解析することは容易ではなかった。先に CDDP-DNA をリガンドとして固定したセルロースカラムクロマトグラフィーなど異なる 3 種類の精製過程を経る方法が報告されたが³⁵⁾、SG 粒子法ではワンポット精製であるにもかかわらず非特異的吸着によるバックグラウンドを極めて低く抑えることができ、銀染色レベルで一挙に 9 種類以上の結合タンパク質が解析された (Fig. 5)。この微粒子法は HPLC のような高価な機器は必要ないが、逆に自動化が難しく、今後は温度、pH、磁気などの外的刺激応機能の導入が課題になると考えられる。このような精製以外にも SG 粒子は生体反応の制御に応用され、例えば粒子表面上でのタンパク質のフォールディング誘導が報告されている³⁶⁾。

3.3 温度応答性磁性粒子

生体分子の精製では、担体は表面積や分散・反応性に優れたナノサイズであることが効果的だが、分離回収するためにはある程度の比重を持つかあるいは上記に示したように外部刺激に応答する機能が付与されている粒子が望ましい。従来から磁気分離法はよく用いられるが、先述のように粒径を小さくすると反応効率は向上するが

磁気分離効率は下がる。そこで温度応答性高分子で磁性粒子を被覆すると、温度により粒子の凝集が制御でき迅速な磁気分離が可能になる。このシステムは抗体精製などに利用された³⁷⁾。

4 おわりに

ナノテクノロジーで用いられている素材など機能性微粒子のバイオテクノロジー分野への応用に関して、特に生体分子の検出や精製技術を取りあげた。ここに記載した内容を含めナノバイオ分野の研究は、プロテオミクスに代表されるタンパク質の網羅的なスクリーニング系の開発やシグナル伝達に絡む相互作用の総合的な解析技術などと呼応して、より確実で正しい生体機能の理解をもたらすと思われる。現在、ナノ材料をバイオテクノロジーに応用し、また逆に高機能なナノ素材である生体分子をナノテクノロジーに応用しようとする研究がまさにルネサンス期を迎えている。中でもブラウン・ラチェットによる生体分子分離システムのように、ナノスケールといういわば幻想の世界から現実の世界で形にできるという時代が到来したことはあらためて感慨深い。

文 献

- 1) N.C. Seeman, *Nature*, 421, 427-31 (2003).
- 2) A. Bernard, D. Fitzli, P. Sonderegger, E. Delamarche, B. Michel, H.R. Bosshard & H. Biebuyck, *Nat. Biotechnol.*, 19, 866-9 (2001).
- 3) H. Kawaguchi, *Prog. Polym. Sci.*, 25, 1171-210 (2000).
- 4) M. Han, X. Gao, J.Z. Su & S. Nie, *Nature Biotech.*, 19, 631-5 (2001).
- 5) Y. Tabata, Y. Murakami & Y. Ikada, *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 1108-16 (1997).
- 6) H. Kato, Y. Kanazawa, M. Okumura, A. Taninaka, T.

- Yokawa & H. Shinohara, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4391-7 (2003).
- 7) K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi & J. Sunamoto, *Macromolecules*, **26**, 3062-8 (1993).
 - 8) A. Harada & K. Kataoka, *Science*, **283**, 65-7 (1999).
 - 9) T. Ihara, Y. Chikaura, S. Tanaka & A. Jyo, *Chem. Commun.*, **2002**, 2152-3.
 - 10) H.G. Schild, *Prog. Polym. Sci.*, **17**, 163-249 (1992).
 - 11) H. Kawaguchi & K. Fujimoto, *Bioseparation*, **7**, 253-8 (1998-99).
 - 12) D. Umeno, T. Mori, M. Maeda, *Chem. Commun.*, **1998**, 1433-4.
 - 13) V. Bulmus, Z. Ding, C.J. Long, P.S. Stayton & A.S. Hoffman, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 78-83 (2000).
 - 14) M. Uhlen, *Nature*, **340**, 733-4 (1989).
 - 15) Y. Harada, O. Ohara, A. Takatsuki, H. Itoh, N. Shimamoto & K. Kinoshita Jr, *Nature*, **409**, 113-5 (2001).
 - 16) T. Tanaka & T. Matsunaga, *Anal. Chem.*, **72**, 3518-22 (2000).
 - 17) S. Gider, D.D. Awschalom, T. Douglas, S. Mann & M. Chaparala, *Science*, **268**, 77-80 (1995).
 - 18) I. Yamashita, *Thin Solid Films*, **393**, 12-18 (2001).
 - 19) C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic & J.J. Storhoff, *Nature*, **382**, 607-9 (1996); A.P. Alivisatos, K.P. Johnsson, X. Peng, T.E. Wilson, C.J. Loweth, M.P. Bruchez Jr. & P.G. Schultz, *Nature*, **382**, 609-11 (1996).
 - 20) R. Elghanian, J.J. Storhoff, R.C. Mucic, R.L. Letsinger & C.A. Mirkin, *Science*, **277**, 1078-81 (1997).
 - 21) Y.C. Cao, R. Jin & C.A. Mirkin, *Science*, **297**, 36-40 (2002).
 - 22) S. Park, T.A. Taton & C.A. Mirkin, *Science*, **295**, 1503-6 (2002).
 - 23) K. Hamad-Schifferli, J.J. Schwartz, A.T. Santos, S. Zhang & J.M. Jacobson, *Nature*, **415**, 152-5 (2002).
 - 24) M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss & A.P. Alivisatos, *Science*, **281**, 2013-6 (1998); W.C.W. Chan & S. Nie, *Science*, **281**, 2016-8 (1998).
 - 25) Z. Ding, B.M. Quinn, S.K. Haram, L.E. Pell, B.A. Korgel & A.J. Bard, *Science*, **296**, 1293-7 (2002).
 - 26) M. Han, X. Gao, J.Z. Su & S. Nie, *Nature Biotech.*, **19**, 631-5 (2001).
 - 27) B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou & A. Libchaber, *Science*, **298**, 1759 (2002).
 - 28) J.O. Winter, T.Y. Liu, B.A. Korgel & C.E. Schmidt, *Adv. Mater.*, **13**, 1673-7 (2001).
 - 29) L. Zhang, F. Dang & Y. Baba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1645-54 (2003).
 - 30) A. van Oudenaarden & S.G. Boxer, *Science*, **285**, 1046-8 (1999).
 - 31) M. Morra, *Water in Biomaterial Surface Science*, Wiley (2001).
 - 32) T. Wada, H. Watanabe, H. Kawaguchi & H. Handa, *Methods Enzymol.*, **254**, 595-604 (1995).
 - 33) J. Sawada, N. Simizu, F. Suzuki, C. Sawa, M. Goto, M. Hasegawa, T. Imai, H. Watanabe & H. Handa, *J. Biol. Chem.*, **274**, 35475-82 (1999).
 - 34) T. Tomohiro, J. Sawada, C. Sawa, H. Nakura, S. Yoshida, M. Kodaka, M. Hatakeyama, H. Kawaguchi, H. Handa & H. Okuno, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 63-5 (2002).
 - 35) E.N. Hughes, B.N. Engelsberg & P.C. Billings, *J. Biol. Chem.*, **267**, 13520-7 (1992).
 - 36) H. Shimizu, K. Fujimoto & H. Kawaguchi, *Biotechnol. Prog.*, **16**, 248-53 (2000).
 - 37) K. Kondo, H. Kamura & K. Higashitani, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 99-105 (1994).