

形状加工と化学修飾を組み合わせたリポソーム吸着場

(芝浦工業大学) ○小山徹、町田景吾、池田泰之、松村一成

1. 緒言

近年における膜タンパク質のリガンド探索や機能解明は、創薬をはじめとする産業応用上極めて重要な分野となっている。この研究分野で必要とされる技術の一つである、ターゲットとなる膜タンパク質を持つ特定の細胞やウイルスを固相上に固定化する技術は、すでにさまざまな展開が図られている。この固定化技術の更なる高度化が、膜タンパク質などの細胞機能解析デバイスに有効であることは自明である。

本研究は、集束イオンビーム(Focused Ion Beam: FIB)装置による材料微細加工技術と材料表面の化学修飾を組み合わせて用いることで、従来にないバイオチップ構築技術の創製を目指し、実験を行った。

2. 実験方法

基盤材料には Poly Butylene Terephthalate(PBT)を使用し、材料表面を化学修飾(カップリング)及び FIB 装置加工を行った。加工形状は方形細孔(一辺 $0.1\sim 5\mu\text{m}$ 、深さ $\sim 2\mu\text{m}$)を配列的に生成した。そして、FIB 加工部位(凹部位)に露出した PBT 末端カルボキシル基に poly-L-Lysine(p-Lys)をカップリングさせてリポソーム吸着能を付与した。リポソーム吸着場作製過程を Fig.1 に示す。

リポソーム吸着場が生成されたことを確認するために、蛍光修飾したアニオン性リポソームやオクタデシル化シリカ(ODS)粒子などを吸着させた後、蛍光顕微鏡観察、走査型プローブ顕微鏡観察を行った。また、微細加工および化学修飾を行った各段階での材料表面の官能基を確認するために、蛍光ラベル化剤を修飾し蛍光顕微鏡観察を行った。

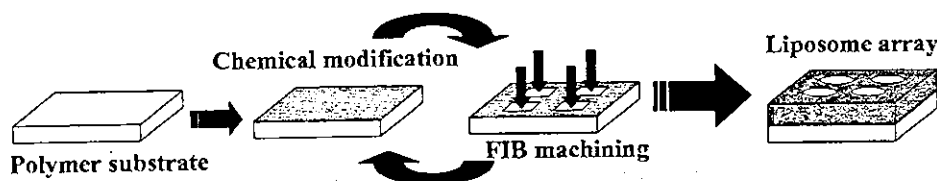


Fig. 1 リポソームの配列的吸着場作製過程

3. 実験結果及び考察

上述した方法によって構築したリポソーム吸着場に対するリポソームの吸着現象を確認した。その結果、FIB 加工による方形細孔と吸着粒子の大きさがマッチすることが重要であり、これらがマッチングしたときに吸着する割合が大きくなることが示された(脂質膜をコートした ODS 粒子(粒径 $5\mu\text{m}$)使用時)。また、同様の手法を用いて導電性ガラスを基盤材料として作製実験を行ったが、PBTと同様にリポソーム吸着が確認された。

さらに、p-Lys とリポソーム間の静電相互作用による吸着について水晶発振子マイクロバランス(QCM)を用いて吸着量の経時的追跡を行い、リポソームの電荷に依存して吸着現象が変化することが確認された。講演ではそれらの結果も併せて報告する予定である。

Polymer microfabrication and the applications using FIB machining (2)

Immobilizing support of liposomes prepared by 3D patterning and chemical modification

(SHIBAURA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) Tohru Koyama

《緒言》

リポソームや細胞・ウイルス等の小胞体を材料表面上に固定化する手法はバイオセンサーを構築する重要な基盤技術である。表面プラズモン共鳴法や水晶振動子マイクロバランス法を活用したバイオセンサーが広く利用されるようになり、それに伴って固定化手段の高効率化や機能化が望まれている。短鎖ペプチドによる固定化法は機能設計の自由度の点から有用であるが、用いるアミノ酸配列を *de novo* 設計するための知見は未だ不十分である。本研究は、各種アミノ酸配列の短鎖ペプチドのリポソーム吸着能と脂質膜内挙動を測定し、その関連性の検討を目的とする。

《実験方法》

各種アミノ酸配列のペプチドを固相合成し、その担体に対するリポソームの吸着量を定量した(Fig1)。用いたペプチドのアミノ酸配列は、膜貫通型・接触型という脂質膜への作用形態の異なる2種類のモチーフを設計し、構成アミノ酸は、リシン(K)、アラニン(A)、トリプトファン(W)の3種類に単純化した。同配列のペプチドを別途遊離ペプチドとして合成・精製し、ペプチド・脂質二重膜の相互作用を蛍光自動偏光分析や蛍光消光解析を用いて行った。固定化対象のリポソームはホスファチジルコリンを主成分とし、ホスファチジルセリン(10 mol%)及び蛍光修飾脂質を含むものであり、押し出し法によって粒径50nm~5000nmに調整して使用した。

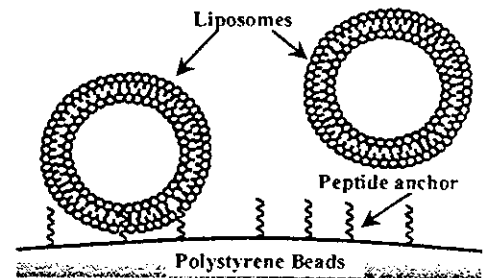


Fig 1. Schematic representation of immobilized liposomes on the peptide-modified polymer

《実験結果及び考察》

固相上のペプチドのリポソーム固定化能はリシン残基数が多く、トリプトファン残基が中央に位置するペプチドほど固定化能が優れるというアミノ酸配列依存性が明らかとなった。又、貫通型ペプチドに関してはリポソーム粒径100 nmにおいて最大の吸着を示す特徴的なベル型の粒径依存性が見出された。一方、接触型のペプチドは粒径の増大と共に固定化量が増加し、5000 nmでは著しく減少する傾向を示した。

ペプチド・脂質二重膜間相互作用測定のために、リポソーム存在下での遊離ペプチドの水溶性消光剤による蛍光消光の解析を行った。解析結果より、貫通型のK9WA5ペプチドが最も水相との接触の無い脂質二重膜深部に局在化する事が明らかとなった。その他の配列に関しては同様にトリプトファン残基が中央に位置するK4WA5、ペプチド鎖先端に位置するWK4A5ペプチドと続く結果となった。さらに、各々のペプチドに対してリポソーム粒径依存性を検討したところ、いずれも粒径100 nmの際に蛍光消光が高効率で阻害される結果となった。以上の事から、固相上のペプチドのリポソーム吸着能と遊離ペプチド・リポソーム間相互作用との間に相関関係がある事が明らかとなり、ターゲットとなる脂質膜に対して短鎖オリゴペプチドの機能設計を行う事で固定化能の制御が可能である事が示唆された。

Development of liposome immobilizing material with small peptide(3) interfacial location of peptides and efficiency of immobilizing liposome

Yuzo Kasuya, Yuko Tokuda, Naoki Hirai, Yasuyuki Ikeda, Kazunari Matsumura.

(Graduate School of Material Science and Engineering, Shibaura Institute of Technology., m203102@sic.shibaura-it.ac.jp)

We have quantitated the amount of liposome bound to the various oligopeptides on the polymer beads. Both hydrophobic and hydrophilic segments contribute to the activity of immobilizing liposome, but cause different liposome size dependence. In this study, we investigated interaction between small peptide and lipid bilayer based on fluorescence quenching. The peptides which have a Trp residue and several Lys were located in the hydrophobic region of the bilayer. We observed a bell-shaped profile for the dependence of the inhibition effect against a quencher on liposome size, with a maximum at 100 nm. These results correspond to the amount of immobilizing liposome on the peptide-modified solid supports. Therefore, there is positive correlation between interfacial location of peptides and activity of immobilizing liposomes.

Bisphenol-A の分解反応系におけるシクロデキストリンの効果

水戸裕* ○田森絃一** 池田泰之** 松村一成*

*芝浦工業大学 工学部, **芝浦工業大学 大学院 工学研究科

《目的》エストロゲン様作用物質の高効率な分解反応系は、高選択的吸着場と共に環境ホルモン対策技術の主要な要素である。触媒を用いた化学的分解反応系は、酵素による生化学的分解反応系とは異なった利点を持ち、その開発に向けた知見の蓄積が求められている。

我々は、硝酸アンモニウムセリウム (IV) (^{IV}CAN)を用いて Bisphenol-A (BPA)の分解反応系を構築し、その速度論的評価を行っている。今回、BPA に対して包接能を持ち吸着場の構成分子として利用されているシクロデキストリン(CD)の、BPA 化学分解反応系における効果について検討を行った。

《実験方法》BPA 濃度 $1 \times 10^{-4} M$ の水/アセトニトリル (AN) (96 : 4 v/v) 溶液を調製し、 ^{IV}CAN ($5 \times 10^{-4} M$) 及び各種 CD の存在下で室温にて反応を行った。反応時間は 4h までの BPA 濃度及び BPA 分解生成物濃度の経時変化を HPLC を用いて追跡し、BPA の減少速度定数を決定した。HPLC 分析は、ODS 逆相カラムを用いアセトニトリル/水系の勾配溶出法にて行った。

《結果及び考察》 $^{IV}CAN/CD$ 混合系による BPA 分解反応系の擬一次反応速度プロットを図 1 に示す。

CD として β -CD、 γ -CD を添加したいずれの反応系も ^{IV}CAN 単独の反応系に比べて初期減少速度が 1/2 から 1/3 となった。しかしながら基質に対して 2 等量の CD 濃度条件では等量の濃度条件よりも BPA の減少速度が高かった。

BPA の分解反応はフェノール基が Ce (IV)イオンに配位した複合体形成から進行すると考えられる。また、この濃度条件では CD は BPA に対してほぼ等量的に会合している。すなわち、上記の結果は、CD 上の水酸基が BPA と競争的に Ce (IV)イオンに配位し、CD 上の Ce (IV)イオン

によるホスト-ゲスト分子間反応の反応性は低くなるが、過剰 CD 上の Ce (IV)イオンと包接 BPA との反応性は保持されていると考えられる。このことから、CD に金属配位部位を修飾した機能分子の触媒としての有効性が予想される。また、CD 単独でも水相/油相の 2 相反応系では相間移動触媒として作用することが期待され、現在その検討を行っている。

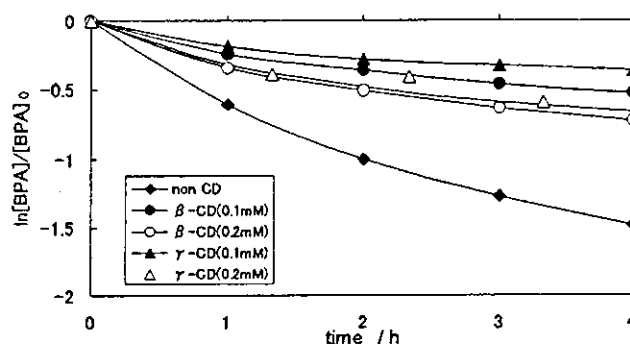


Figure 1 Pseudo first order kinetics plots of bisphenol A degradation with Ce(IV)/cyclodextrin.

Effect of Cyclodextrin on Bisphenol A degradation rate in the Ce(IV)-induced reaction system

Yu Mito, ○Kouichi Tamori, Yasuyuki Ikeda, Kazunari Matsumura

Shibaura Institute of Technology, 3-9-14, Shibaura, Minato-ku, Tokyo 108-8548, Japan

The cerium(IV)/cyclodextrin-induced degradation of bisphenol A (BPA), a representative endocrine disruptor, was carried out. Cerium (IV) ammonium nitrate (^{IV}CAN) efficiently degrades BPA as clearly evidenced by HPLC. Although β - or γ - cyclodextrin reduce the degradation rate because of stereochemical effect, neither complexation of cerium ion and the hydroxy residue nor inclusion of BPA in cyclodextrin suppress the degradation. Thus, this efficient degradation reagent will be more active by adding the function to bind the substrate within the catalytic core using cyclodextrin. These results are the pertinent findings to the development of synthetic BPA degradases.