

3Da05 球殻状タンパク質を用いた蛍光発光ナノ粒子の作製とバイオミネラリゼーション機構の解明

○岩堀 健治^{1,2}, 山下 一郎^{1,2,3}⁽¹⁾奈良先端大・物質, ⁽²⁾科技団・CREST, ⁽³⁾松下電器・先端研

アポフェリチンタンパク質は直径 12 nm 内部直径 7 nm の空洞を持つ球殻状タンパク質である。我々はこのような球殻状タンパク質の内部空洞を利用して様々な種類の均一なサイズを持つナノ粒子作製を行うと共に、タンパク質におけるバイオミネラリゼーションのメカニズム解明を行っている。現在、特にナノ電子デバイス作製に有用な化合物半導体ナノ粒子の作製を行っており、反応溶液中に過剰なアンモニウムイオンを添加しテトラアンミン錯イオン形成をする slow chemical reaction system (SCRY) 法を考案する事で、空洞内に直径 7 nm の CdSe 及び CdS 化合物半導体ナノ粒子の作製に成功している。このような II-VI 族化合物半導体ナノ粒子は化合物特有の蛍光発光を示す事が知られている。さらにナノ粒子の粒子径に応じてサイズ効果により蛍光波長が変化するため、光デバイス、レーザー、量子ドット、生体内蛍光マーカーといった様々な応用が可能であるため大変注目されている。今回、我々は、SCRY を改変することでアポフェリチンタンパク質内部に新規の化合物半導体ナノ粒子である ZnS ナノ粒子の作製を試みた。反応溶液条件の最適化の結果、直径 7 nm の ZnS ナノ粒子の作製に成功した。作製されたナノ粒子は XRD, EDS 分析により ZnS 立方晶であることが確認され、紫外線ランプを用いた励起により青色の蛍光が観察された。さらに種々のリコンビナントフェリチンに対する ZnS ナノ粒子のコア形成比較も行った。これらの結果にもとづきバイオミネラリゼーションのメカニズムに関しても考察する。

Fabrication of a nano-particle with photo-luminescence in the apoferritin cavity

○Kenji IWAHORI^{1,2}, Ichiro YAMASHITA^{1,2,3}⁽¹⁾Grad. Sch. Mater. Sci., NAIST, ⁽²⁾CREST, JST, ⁽³⁾ATRL, Panasonic)

Key words biomineralization, ferritin, nano-particle, zinc sulfide

3Da07 非対称 2 分子膜リボソームの構築

○小松 佑規, 三浦 陽子, 濱田 勉, 高木 昌宏
(北陸先端院・材料)

【目的】細胞膜(脂質二分子膜)の表裏では、リン脂質分子の組成が著しく異なっていることが知られている。ホスファチジルコリン (PC) やスフィンゴミエリン (SM) は外層に偏って存在し、ホスファチジルエタノールアミン (PE) やホスファチジルセリン (SM)、ホスファチジルイノシトール (PI) は内層に局在している。この細胞膜の非対称性はすべての真核細胞に共通してみられることから、非対称性の制御メカニズムが存在し、重要な生命機能を担っていることが示唆される。生体膜のモデル系としてリボソームが広く研究に用いられているが、この非対称性を考慮した研究はほとんど行なわれておらず、研究は未だ初歩的段階である。そこで本研究では、油中液滴を用いた非対称 2 分子膜リボソームの構築を試みた。

【方法・結果】スライドガラス上にシリコンゴム製の穴の開いたチャンバーを作製し、穴の中に水とオイルの二相分離系を用意する。二分子膜の外層となる脂質分子をオイルに溶解し、一定時間静置すると、水相とオイル相の界面に単分子膜が形成される。その後、二分子膜内層となる脂質分子で覆われた液滴を上部から加えると、液滴が単分子膜を通過してオイル相から水相に移行することで、内外層非対称の 2 分子膜リボソームが形成される。形成されたリボソームへの浸透圧印加による膜揺らぎの解析から二分子膜の物性評価、蛍光色素による膜染色実験から非対称性の評価をおこなった。また、多成分脂質膜上のラフト様ドメインに対する非対称性の影響についても議論する。

Preparation of cell-sized liposome with asymmetric nature

○Yuuki KOMATSU, Yoko MIURA, Tsutomu HAMADA, Masahiro TAKAGI
(Sch. Mat. Sci., JAIST)

Key words liposome, asymmetric bilayer, W/O droplet, raft like domain

3Da06 マイクロ流路を用いた酵素免疫測定法による培養液からのアポトーシス高速度検出

○渋谷 啓介, 芳賀 良一, 難波 勝
(日立・電開研)

【背景・目的】抗体医薬品製造ではアポトーシス細胞死を監視することは品質管理の上で重要となる。アポトーシスの検出法は細胞染色法等が一般的であるが、細胞の前処理工程を必要とするため、監視装置の自動化が困難である。そこで本研究ではアポトーシス検出装置の簡易化を目的にマイクロ流路チップを用いて培養液成分 M30 を指標とした酵素免疫測定法 (ELISA法)の検討を行った。

【検出原理】サイトケラチン 18 はアポトーシスにより活性化した酵素により切断され、M30 エピトープを持つ断片 (M30) が分泌される。M30 を特異的に認識する M30 抗体を用いた ELISA 法で培養液中の M30 を測定することでアポトーシスを検出できる。

【実験方法】マイクロ流路チップの流路内壁には活性エステル化処理を施した。M5 抗体を流路内壁に共有結合させ、ブロッッキングを行った。次に、試料、ビオチン化 M30 抗体、ストレプトアビジン-HRP を順次送液して反応させ、発色基質 TMB および反応停止液 (硫酸) を送液し、450nm の吸光度を比色計で測定した。試料で用いたアポトーシス細胞の培養液は、抗体医薬品製造でよく利用される CHO 細胞を CD-CHO 培地で培養し、アポトーシス誘導後、フィルタ (0.2 μ m) で細胞を取り除いて調製した。

【結果及び考察】マイクロ流路チップによる M30 標準物質を用いた検量線は濃度 0~750 U/L の範囲で良好な直線関係を示し、培養液の測定では、 5×10^4 cells/mL 以上のアポトーシス細胞を検出できた。発色反応の時間は 96 穴マイクロプレートに対し 1/10 と短縮できた。本検出法では細胞の前処理が省略できるため、アポトーシス検出装置の簡易化が期待できる。

Apoptosis detection using microchip-based enzyme-linked immunosorbent assay

○Keisuke Shibuya, Ryoichi Haga, Masaru Namba
(Hitachi, Ltd. Power&Industrial Systems R&D Laboratory)

Key words apoptosis, microchip, ELISA, M30

3Da08 リン脂質の構造に依存した膜小胞形態変化のダイナミクス

○川口 耕平, 石井 健一, 濱田 勉, 高木 昌宏
(北陸先端院・マテリアル)

【背景・目的】細胞内にはミトコンドリアやゴルジ体等の様々な形態の脂質膜構造体が存在し、その形態は生物学的機能に密に関連している。近年リボソームをモデル膜に用いた再構成実験が進められ、細胞内膜構造に類似した種々の膜形態が観察されている。しかし、膜を構成する脂質分子の構造的特徴が膜の形態および変形ダイナミクスに与える影響に関してはほとんど明らかにされていない。今回我々は、脂質の構造が脂質膜形態変化プロセスに与える影響を解明することを目的として、巨大リボソームを用いた顕微鏡直接観察を行った。

【方法・結果】DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin), DOPG (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]), DOTAP (1,2-Diacyl-3-Trimethylammonium-Propane) の 3 種類のリン脂質を用いて静置水相法で巨大リボソームを作製した。グルコース水溶液と混合させ、浸透圧応答による膜の形態変化を位相差顕微鏡で直接観察した。その結果、DOPC から形成されたリボソームでは球状のまま次第に縮小し内部に小胞を形成するプロセス (a) と、球状リボソームから小胞が数珠状に伸びた後再び球状に戻るプロセス (b) の 2 つの形態変化が観察された。DOPG リボソームに浸透圧を加えて観察したところ、(a) に類似したプロセスのみが観察され、DOTAP リボソームでは (b) に類似したプロセスのみが観察された。発表では、リン脂質の構造が膜形態変化プロセスに及ぼす影響について議論する。

Transformation of Giant Vesicles Depending on the Structure of Constituent Lipid Molecules

○Kohei KAWAGUCHI, Ken-ichi ISHII, Tsutomu HAMADA, Masahiro TAKAGI
(Sch. Mat. Sci., JAIST)

Key words liposome, transformation, osmotic response