

# 生体触媒反応を介した金ナノ粒子の合成とその表面修飾による高機能化に関する研究

二井手, 哲平

<https://doi.org/10.15017/1441205>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（工学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

生体触媒反応を介した金ナノ粒子の合成と  
その表面修飾による高機能化に関する研究

平成26年1月

九州大学大学院化学システム工学専攻

二井手 哲平

## 目次

<b>第1章 序論</b>	<b>1</b>
1-1. はじめに	1
1-2. 金ナノ粒子とその物理化学的特性	2
1-2-1. 金ナノ粒子の歴史と合成法	2
1-2-2. 局在表面プラズモン共鳴 (Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)	3
1-2-3. 表面増強ラマン散乱 (Surface Enhanced Raman Scattering: SERS)	4
1-2-4. 蛍光の消光作用 (Nano-Surface Energy Transfer: NSET)	5
1-2-5. 金ナノ粒子の伝導体としての利用	5
1-2-6. 金ナノ粒子の細胞への取り込み	5
1-3. 金ナノ粒子の機能化	7
1-3-1. 自己組織化膜による機能化	7
1-3-2. 生体分子を固定化する戦略	10
1-3-2-1. 静電的相互作用による固定化	11
1-3-2-2. 官能基特異的な修飾技術	12
1-3-2-3. クリックケミストリーによる修飾技術	13
1-3-2-4. 配位結合による修飾技術	13
1-3-2-5. 生体分子の特異的な結合を利用した固定化	14
1-3-2-6. チオールを用いた直接固定化法	15
1-3-2-7. 固体表面認識ペプチドによる直接固定化法	16
1-4. 生体分子修飾金ナノ粒子の応用例	17
1-4-1. タンパク質、酵素	17
1-4-2. 核酸	18
1-4-3. ペプチド	19
1-4-4. 抗体	19
1-4-5. 脂質	20
1-5. 本論文の構成	22
1-6. 参考文献	23

## 第2章 グリセロールデヒドロゲナーゼが触媒する補酵素還元反応を介した金ナノ粒子の合成 30

2-1. 緒言	30
2-1-1. バイオミネラルゼーション	30
2-1-1-1. 生物制御によるバイオミネラルゼーション	31
2-1-1-2. 生物誘発によるバイオミネラルゼーション	31
2-1-2. 微生物を利用した金属ナノ粒子の合成	32
2-1-3. 遺伝子組換え大腸菌を利用した金属ナノ粒子の合成	32
2-1-4. 酸化還元酵素の酵素反応による金属イオンの還元	33
2-1-5. 補酵素 NADH	34
2-1-6. <i>Escherichia coli</i> 由来グリセロールデヒドロゲナーゼの酵素学的特性	34
2-1-7. 本研究の戦略	36
2-2. 結果と考察	37
2-2-1. グリセロールデヒドロゲナーゼの発現および精製	37
2-2-2. グリセロールデヒドロゲナーゼへの緩衝種および pH の影響	37
2-2-3. グリセロールデヒドロゲナーゼによる金ナノ粒子の調製	39
2-2-4. 調製した金ナノ粒子の評価	41
2-2-5. グリセロールデヒドロゲナーゼ発現大腸菌による金ナノ粒子の合成	43
2-2-6. 大腸菌細胞触媒により調製した金ナノ粒子の評価	44
2-3. 結語	46
2-4. 実験操作	47
2-4-1. 試薬	47
2-4-2. 測定機器	47
2-4-3. グリセロールデヒドロゲナーゼの調製	47
2-4-4. 活性測定	48
2-4-5. 金ナノ粒子の調製	48
2-4-6. 調製した金ナノ粒子の評価	49
2-4-7. グリセロールデヒドロゲナーゼ発現菌体の調製	49
2-4-8. グリセロールデヒドロゲナーゼ発現大腸菌による金ナノ粒子の合成	50
2-4-9. 大腸菌により調製した金ナノ粒子の評価	50

### 第3章 金結合性ペプチドを介した酵素触媒的補酵素還元反応によるタンパク質被覆金ナノ粒子の合成

54

3-1. 緒言	54
3-1-1. 自然界における無機表面を特異的に認識するタンパク質	54
3-1-2. 金属表面に親和性を有するペプチドの探索法	55
3-1-3. 金結合ペプチド	56
3-1-4. バイオテンプレートを用いた金ナノ粒子の調製法	58
3-1-5. 本研究の戦略	59
3-2. 結果と考察	60
3-2-1. 金表面および抗体への結合能を有する機能性タンパク質のデザインと調製	60
3-2-2. 機能性タンパク質存在下での金ナノ粒子の調製	61
3-2-3. 形状観察および溶液中における金ナノ粒子の安定性の評価	63
3-2-4. 動的光散乱測定による金ナノ粒子上の機能性部位の評価	66
3-2-5. 金ナノ粒子上のタンパク質の同定	66
3-2-6. システイン導入 pG <sub>2</sub> pA 融合タンパク質共存下での金ナノ粒子の調製	68
3-2-7. タンパク質の金ナノ粒子上への固定化におけるシステインの効果	69
3-2-8. ELISA による pG <sub>2</sub> pA 融合タンパク質の機能評価	71
3-3. 結語	73
3-4. 実験	74
3-4-1. 試薬	74
3-4-2. 測定機器	74
3-4-3. pG <sub>2</sub> pA 融合タンパク質発現用プラスミドの構築	75
3-4-4. pG <sub>2</sub> pA 融合タンパク質の調製	79
3-4-5. タンパク質修飾金ナノ粒子の調製	79
3-4-6. タンパク質修飾金ナノ粒子の評価	80
3-4-7. ELISA 法による金ナノ粒子上のタンパク質の機能評価	80
3-5. 参考文献	82

## 第4章 抗体結合ドメイン融合グリセロールデヒドロゲナーゼを利用したタンパク質被覆金ナノ粒子の一段階合成 87

4-1. 緒言	87
4-1-1. ナノバイオ界面に働く力	87
4-1-2. <i>Bacillus stearothermophilus</i> 由来グリセロールデヒドロゲナーゼの酵素学的特性	90
4-1-3. 本研究の戦略	92
4-2. 結果と考察	
4-2-1. プロテインG融合グリセロールデヒドロゲナーゼの設計と調製	93
4-2-2. プロテインG融合グリセロールデヒドロゲナーゼの活性評価	95
4-2-3. 金ナノ粒子の調製および評価	96
4-2-4. 金ナノ粒上のタンパク質の評価	100
4-2-5. タンパク質被覆金ナノ粒子の機能評価	101
4-3. 結語	103
4-4. 実験	
4-4-1. 試薬	104
4-4-2. 測定機器	104
4-4-3. 発現用プラスミドの構築	105
4-4-4. プロテインG融合タンパク質の調製	109
4-4-5. 様々な溶液条件における各BsGLDの活性評価	109
4-4-6. タンパク質修飾金ナノ粒子の調製	110
4-4-7. タンパク質修飾金ナノ粒子の評価	110
4-4-8. ELISA法による金ナノ粒子上のプロテインGの機能評価	111
4-5. 参考文献	112

## 第5章 結論 114

謝辞

## 第 1 章 序論

### 1-1. はじめに

ナノサイエンス、すなわち「ナノメートルスケールでの科学現象の理解」は、工学、物理学、化学、材料工学および分子生物学といった様々な分野に大きな革新をもたらした[1, 2]。これはナノレベルで制御された構造体の構築、評価、および操作が可能になったことに起因しており、技術的な進歩とそれに密接に関連した先駆的な研究の賜物である。ナノサイズ材料は、巨視的 (バルク) 固体や、原子・分子とは異なる特性を示し [3]、エレクトロニクス、エネルギーをはじめとした多様な分野の発展に寄与してきた。本章では特にナノ材料とバイオテクノロジー分野の融合領域に着目して展開していく。

生物の進化は、タンパク質や核酸といった巨大な分子を最適化して高い認識特性や触媒特性などを示すユニークな構造体を作り出してきた。生命活動を支える生体高分子は、生体内で精巧緻密な機能を発現しており、生体内のほぼ全ての役割を担っているといっても過言ではない。日進月歩の研究のなかで、その機能の詳細が徐々に明らかになりつつあるが、未だ明らかとなっていない機構や機能、生体分子などが数多く残されており、生命現象とそれを司る分子の役割の理解は我々人類の永遠のテーマとも言える。一方で、このような生命を支える部品ともいえる生体分子を生体外へ取り出し活用する試みがなされている。酵素、抗体-抗原などの生体分子の大きさはおよそ 2–100 nm の範囲にあり、金属ナノ粒子に代表されるナノ材料とほぼ同じ分子サイズを有する。生体由来の柔らかい機能を有する構造体と無機材料から成るナノ構造体とを融合することで、生命現象の理解に向けた有機-無機ハイブリッド材料を開発できる可能性を秘めている。

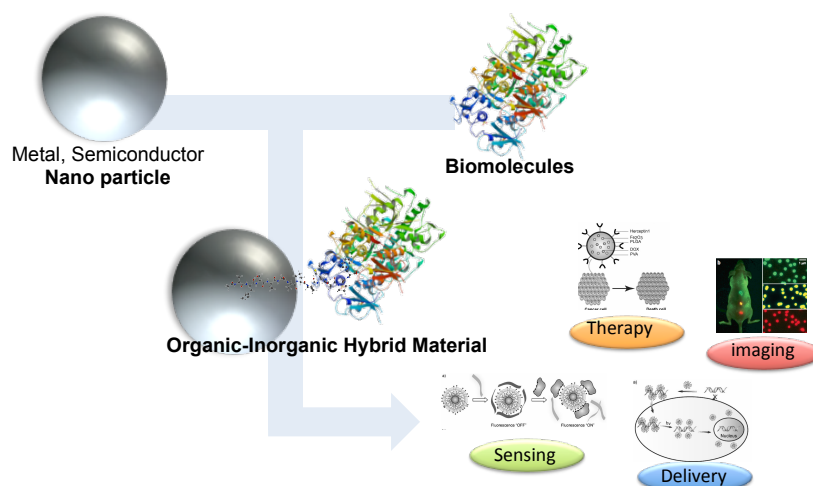


Figure 1-1. 有機-無機ハイブリッド材料とその応用の概略

このような背景から、これまで様々な有機-無機複合化材料が生み出されてきた (Figure 1-1)。このような材料は、バイオセンサー、バイオイメージング、電子回路の構成要素、さらには薬物送達システムのバイオ素子としても利用されており、今後もその利用領域は拡大することが考えられる。特に金ナノ粒子は

多くの実用的な機能と特性を有しているため、最も研究報告が多いナノマテリアルである。そこで、次節では金ナノ粒子に焦点を当てて、その特性について述べる。

## 1-2. 金ナノ粒子の物理化学的特性

### 1-2-1. 金ナノ粒子の歴史と合成法

金ナノ粒子の歴史は古く、その光学的特徴から、古代ローマ時代よりガラスの染色材料として利用されている。1857年に M. Faraday により、二硫化炭素溶媒中で亜リン酸蒸気を還元剤として用いて、塩化金酸イオンから金ナノ粒子の調製できることが報告され [4]、はじめて金ナノ粒子に科学的な解釈が加えられた。M. Faraday の報告以来、現在までに様々な金ナノ粒子調製法が報告された。20 世紀初頭に行われた研究に関する研究は、J. Turkevitch らにより纏められている [5]。そのなかには、上記の Faraday 法、Bredig が発表した金ワイヤーを用いた電気的な手法などが報告されている。また、J. Turkevitch 自らが長年かけて行った金ナノ粒子に関する研究により、クエン酸を還元剤として用いて金ナノ粒子を調製する手法が開発され [6]、現在でも汎用的に用いられている手法となっている。1973 年には、G. Frens により、クエン酸三ナトリウムと金イオンの比を変えることで、16 から 147 nm まで粒子サイズを制御できることが報告された [7]。その後、溶液中での安定化および粒子径の制御に寄与する保護剤の重要性が認識され始め、1993 年に M. Giersig らにより、アルカンチオールによる表面修飾が報告された [8]。その翌年には、M. Brust らの研究グループによりチオール誘導体を用いて直径が 1–3 nm の金ナノ粒子を調製できることが報告された [9]。現在でもチオールを用いた金ナノ粒子表面の保護は最も利用される手法となっている。チオール配位子以外に、これまでに、アミン配位子、界面活性剤、ポリマー、 dendrimer、生体分子など様々な保護剤が報告されている [10]。2009 年には、W. C. W. Chan らによって、クエン酸法で調製した金ナノ粒子を種粒子として、ヒドロキノンを用いてさらに結晶成長させることで 50–200 nm の大きな金ナノ粒子も合成可能であることが報告された [11]。2010 年には、H. Mattoussi らによって、ポリエチレングリコールの末端にジスルフィド基を導入したリガンドを用いて、1.5–18 nm の単分散な金ナノ粒子を作り分けることができることが報告されている [12]。このような歴史的背景の下、現在、様々なボトムアップ型の金ナノ粒子合成法が報告され、目的のサイズおよび様々なリガンドを提示した金ナノ粒子が合成できるようになってきた。特に、21 世紀に入ってから、生体分子を金ナノ粒子上に修飾することで、医療分野への応用が盛んに行われている。



### 1-2-2. 局在表面プラズモン共鳴 (Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)

金ナノ粒子の特性で最も利用されているものが、局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) である。LSPR は、Mie 散乱理論 [13] に従い、電磁気的なエネルギーに共鳴して金ナノ粒子表面の自由電子が集団的に振動することに起因する。自由電子が集団的振動して擬似的な粒子として振る舞っている状態のことをプラズモンと呼ぶ。バルクの金属では軌道が縮退したバンドを形成するため、自由電子が動き回ることになり、自由電子の集団的振動は起こらない。しかし、金属も一原子では電子軌道の一定のエネルギー準位 (HOMO) までは電子が満たされており、それよりも高いエネルギー順位 (LUMO) は空軌道となっている。そこで、粒子をナノサイズまで小さくすると、自由電子がその領域に閉じ込められるため、一原子の状態に近づき、電子のエネルギー準位は離散化する (量子サイズ効果)。なかでも、金ナノ粒子は、自由電子の集団的振動と可視から近赤外領域の光電場が共鳴して、光吸収が起こる表面プラズモン共鳴 (SPR) を起こす (Figure 1-2)。ナノ粒子などナノサイズの金属表面では、伝導帯中の自由電子の集団的振動によって分極が起こり、ナノ粒子の表面近傍にプラズモンが局在化することで局所的に極めて強い電場増強を引き起こす [14]。この現象を特に LSPR と呼ぶ。このような現象は金ナノ粒子の他に、銀、銅といったナノ粒子にも見られる。LSPR は金ナノ粒子の特性の中でも最も良く利用されており、凝集による色の変化を利用した DNA やタンパク質の検出系へ応用されている。

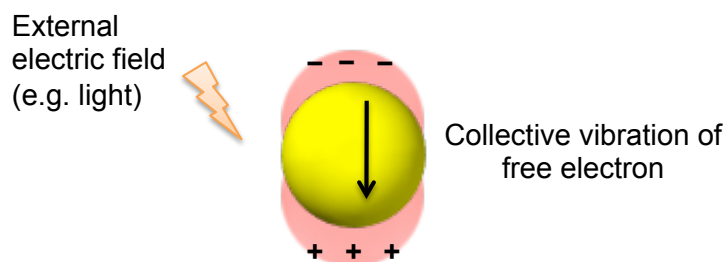


Figure 1-2. 金属ナノ粒子表面でのプラズモンの概念図

また、LSPR に由来する吸収スペクトルはナノ粒子のサイズ、アスペクト比の異なる異方性のナノ粒子、凝集状態、周囲媒体の誘電率で変化することが知られている。球状の金ナノ粒子に関しては、赤色から紫色に呈色している。また、サイズが 9–99 nm へと変化することで、LSPR に由来する消失スペクトルが、517–575 nm へと変化する [15]。粒子サイズが 2 nm 以下では LSPR 帯は示さない。

LSPR 帯は粒子サイズにわずかに依存する一方で、異方性に非常に強く影響される。ロッド状の金ナノ粒子 (金ナノロッド) は短軸と長軸に由来した二つの LSPR 帯を示す。短軸に由来する LSPR 帯は 520 nm 付近に現れ、長軸由来の LSPR 帯はアスペクト比の増加に伴いレッドシフトする。また、金ナノロッドの他に、多面体構造、プレート状構造、中空のナノシェル構造なども多数報告されており、ユニークな光特性を示すことが報告されている [16]。例えば、金ナノシェル構造はシェルの厚さに伴って LSPR が変化することが知られている。

## 1-2-3. 表面増強ラマン散乱 (Surface Enhanced Raman Scattering: SERS)

分子に特定の波長の光が照射されると、レイリー散乱光と呼ばれる入射光と同じ波長の光が散乱される。また同時に、分子の振動と回転エネルギーに対応する入射光と異なる波長の光が散乱される。この入射光と異なる波長の散乱はラマン散乱と呼ばれる。このラマン効果は非常に小さく、散乱前後でエネルギーが変化する非弾性散乱であり、入射光に比べて低いエネルギー (ストークス: 分子にエネルギーが移動) と高いエネルギー (アンチストークス: 分子からエネルギーが移動) を有する。このエネルギーシフトは分子の構造に由来するため、ラマンスペクトルにより分子の検出と同定を行うことができる。一方で、散乱効果は入射光の波長に依存する (エネルギーシフトは分子に依存)。一般的なラマン散乱効果は非常に小さいため、測定したい分子が十分な濃度でなければ観測ができない。しかし、測定分子が金表面近傍にあり且つ高い屈折を示している場合 (e.g. 金ナノ粒子や金属ナノ探針)、光電場が増強され、その結果ラマン散乱が増強される。この現象が表面増強ラマン散乱 (SERS) と呼ばれている [17-19]。ナノ粒子のプラズモン共鳴は表面近傍において、電場を強く増強させることができ、入射光の強度に匹敵する。その結果、強い散乱確率が得られ、増強されたラマン散乱光が観測される [20, 21]。SERS はしばしば分析物の検出に用いられる (Figure 1-3)。例えば、金ナノ粒子表面に修飾したリガンドが特異的に分析物を捉えることで観測するなどの手法が用いられている。また近年では、DNA の検出 [22] やタンパク質や癌細胞の検出 [23, 24]、SERS を利用した二光子振動分光分析法 [25] などが報告されている。

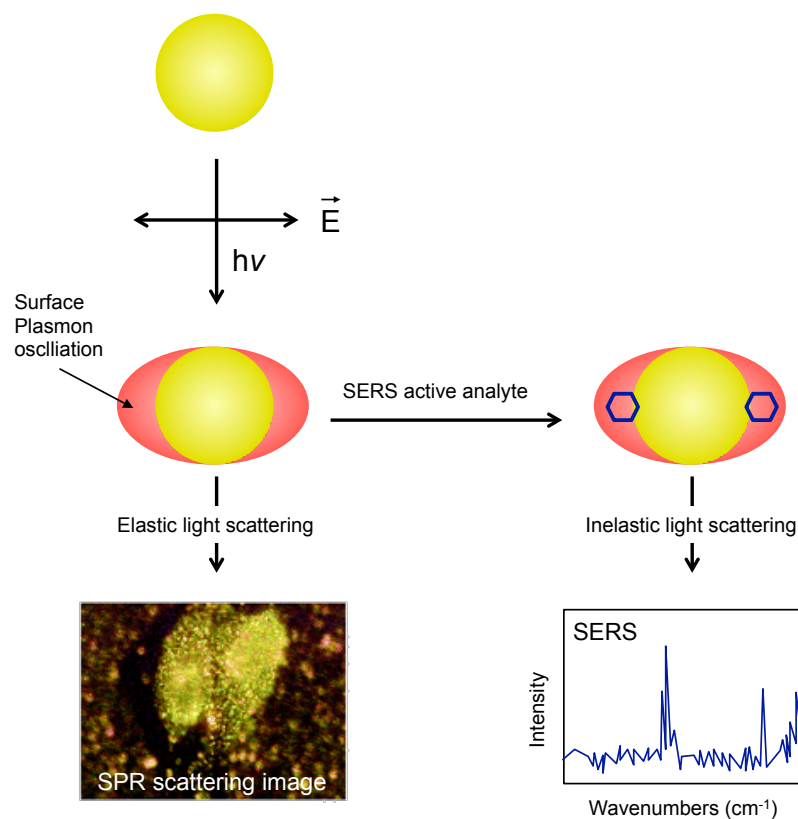


Figure 1-3. 表面増強ラマン散乱 (SERS) の検出系への利用

#### 1-2-4. 蛍光の消光作用 (Nano-Surface Energy Transfer: NSET)

金ナノ粒子表面近傍に蛍光分子が接近すると蛍光が消光することが知られている [26–31]。この現象は、NSET (nano-surface energy transfer) と呼ばれ、蛍光分子 (donor) が一次励起状態から基底状態に戻る過程で、エネルギーが金ナノ粒子表面 (acceptor) に移動することで起こる。従って、蛍光基の発光スペクトルが、金ナノ粒子の SPR 帯と重なり合うことが重要である。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET; Förster resonance energy transfer) のエネルギー移動距離は約 10 nm が限界であるが、NSET は 2 倍の 20 nm までエネルギーが移動することが示されている [32]。このようなユニークな消光作用から、金ナノ粒子は蛍光分子と複合化することで、バイオセンサーへと応用されてきた。例えば、単鎖の DNA (single stand DNA) を介して金ナノ粒子と蛍光基を複合体化させ、相補鎖 DNA の検出を行った例や [26, 27]、プロテアーゼ認識アミノ酸配列を導入したリンカーで金ナノ粒子と蛍光基を結合させ、プロテアーゼの検出を行った例 [28, 29] などへ応用されている。また、金ナノ粒子の蛍光の消光作用は、金ナノ粒子と蛍光基との距離が重要な因子であり、近ければ近いほどその消光作用は強くなることがわかっている [26, 31]。

#### 1-2-5. 金ナノ粒子の伝導体としての利用

金ナノ粒子は酸化還元反応から産出される電子の伝導体としても用いられる [33]。この分析技術の発想は、酸化還元酵素の基質の分析から得られたものである。酸化還元酵素は分析したい基質分子を特異的に酸化または還元することができる。酸化還元反応によって、放出 (または獲得) された電子を電流値へと変換することで基質の存在を定量的に分析することができる。金ナノ粒子の表面へ酵素を複合体化させ、金ナノ粒子を電極材料として用いた例がある [34]。酵素と金ナノ粒子の複合体化はサイクリックボルタメトリーなどの電流の増幅器と共に用いて用いられている。また、はじめて電極にリンカーを介して金ナノ粒子を直接結合させた例 [35] は、金ナノ粒子を電極に固定化後に、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) を金ナノ粒子に固定化して基質の検出を行っている。フラットな金電極表面に直接酵素を固定化させることは可能であったが、金ナノ粒子に変えることで、広い表面積や屈曲した表面は、酵素の活性中心に近くなることから効率的な電子の受け渡しが行えるなどの利点があるとされている [36, 37]。

#### 1-2-6. 金ナノ粒子の細胞への取り込み

クエン酸還元法 [5, 6] により得られる金ナノ粒子は、単分散で大量調製が可能である。この手法により調製された金ナノ粒子はクエン酸により覆れている。近年の金ナノ粒子を用いた研究は、タンパク質や核酸などの機能性分子を金ナノ粒子表面に結合させることにより利用されている例がほとんどである。クエン酸還元法により調製された金ナノ粒子は、それに続く機能化の前駆物質としての利用されている。ここではクエン酸に覆われたのみの未修飾の金ナノ粒子を「裸の金ナノ粒子」として、生物分野へ応用した例を紹介する。また、正電荷を帯びたトランスフェリンタンパク質を静電的にナノ粒子表面に非特異吸着させ、金ナノ粒子の細胞へ導入の研究も合わせて紹介する。

2005 年に、クエン酸還元法により調製された金ナノ粒子を用いて細胞への取り込みが可能であることが報告された [38, 39]。一つの例として、W. C. W. Chan らのグループでは、サイズと形の違いにより細胞への取り込みが変化するかを検討している [39]。モデル細胞としての HeLa 細胞に対して、金ナノ粒子を 14 から 74 nm までサイズ変化させて評価している。その結果、粒子径によって細胞への取り込みの数が変化することが示された。ICP-AES を用いて金濃度を定量した結果、HeLa 細胞へのクエン酸被覆金ナノ粒子の取り込み数は、14、50、74 nm の金ナノ粒子でそれぞれ 3000、6160、2988 個であると算出された。また、アスペクト比 1:1 から 1:5 の金ナノ粒子においても細胞への取り込みを評価しているが、異方性の増加に伴って細胞への取り込みが減少することが示されている。HeLa 細胞への金ナノ粒子取り込み機構について、細胞内ベシクルにより細胞へ取り込まれているため、クエン酸被覆金ナノ粒子表面へタンパク質が非特異的に吸着し取り込まれているのではないかと考察している。

クエン酸還元法で調製された金ナノ粒子は表面のクエン酸により負電荷を帯びている。この負電荷を足場として、正電荷を帯びたタンパク質であるトランスフェリンにより静電吸着させ、細胞への取り込みを促進されることが示された [40]。また、細胞表面でベシクルを形成し、クラスリンタンパク質を介してエンドサイトーシスにより取り込みが起こることが明らかとなっている [41]。

前記したように、金ナノ粒子に関する多くの研究において、クエン酸被覆金ナノ粒子は、生体分子などを他の機能を付与する際の重要な前駆物質である。金ナノ粒子と異種分子との複合体化は、分子ターゲティングやイメージングなどにおいて必要で強力なツールとなる。

### 1-3. 金ナノ粒子の機能化

金ナノ粒子は、生体分子や有機分子などの様々な分子による機能化が検討されている。特に、生物学分野への利用を考えた際、生体へのダメージを最小限にするため粒子表面のチューニングが必須となる。加えて、金ナノロッドやその他の金ナノ構造体の合成に汎用される保護剤である臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB; cetyltrimethylammonium bromide) は、 $\mu\text{M}$  オーダーで重大な細胞毒性を示すことが知られているため [42]、粒子表面からの除去が必要となる。また、金ナノ粒子表面は生体分子が物理吸着しやすいため、粒子表面を他の分子で保護することも必要である。粒子表面から毒性のある保護剤を除去することや保護することに加えて、別の機能性分子を粒子上に固定化することで、金ナノ粒子に新たに機能を付与することができる。これにより、金ナノ粒子が有する本来の物理化学的な機能に加えて、化学的、生物学的な特性も付与することが可能である。

#### 1-3-1. 自己組織化膜による機能化

金ナノ粒子の機能化において、自己組織化膜 (SAM; Self-assembled monolayer) を金ナノ粒子上へ形成させることは最も汎用される手法である。これまで、様々な有機分子を用いて金ナノ粒子上へ SAM を作成できることが報告されてきた。有機分子の金表面への固定化は一般に、thiolate [43]、dithiolate [44]、dithiocarbamate [45]、amine [10, 46]、carboxylate [10]、selenide [47]、isothiocyanate [10]、phosphine [10] を含む分子により達成できる。また、近年の報告で、トリメチルスズ化合物を利用して、Au-C 結合を形成することも報告され [48]、更なる金ナノ粒子の利用が進むと考えられる。一般に金とリガンド分子との結合強度は、Pearson が提唱した hard-soft acid-base (HSAB) 則に依存している。従って、強固な結合を形成したい場合は、チオールを、弱い結合を形成したい場合はアミンやカルボン酸を選択することで、思い通りの結合強度を付与できるものと考えられる。

金ナノ粒子表面への SAM 形成において最もよく利用されるのは、アルキルチオールとジアルキルジスルフィドである [49]。これら化合物は、gold (I)-チオレート (Au-S) 結合を形成する。チオールにおいては、チオールの水素原子が還元脱離することで Au-S 結合を形成する。また、ジスルフィドにおいては、S-S 結合の解離の後、Au-S 結合を形成する。Au-S の結合強度は 40-50 kcal/mol と見積もられている [49, 50]。

さらに、チオールは、金表面と強く相互作用するために、結晶成長を妨げる効果を示すことから、サイズの小さな金ナノ粒子 (< 5 nm) の合成に利用される。また、二機能性のリガンド (e.g. チオアルキル酸、チオアルキルアミン) を使用することによって、一段階で機能性の金ナノ粒子を得ることができる。一方で、比較的大きな粒子を調製する際は、クエン酸やリン酸化アルキル、CTAB などを利用するが、これらリガンドは金ナノ粒子の表面との親和性は低く、得られた金ナノ粒子表面は不安定となる。そのため、金ナノ粒子を調製後、適切なリガンドで置換する二段階の操作が必要である。この際のリガンドとして利用されるのも、チオールやジスルフィドの誘導体が多く、金ナノ粒子表面に SAM を形成させることで、最終的に目的の粒径の安定な金ナノ粒子を取得することができる。チオールまたはジスルフィド誘導体の末端官能基は、水溶性またはバイオコンジュゲーションのための官能基を付与するように選択することがで

きる。加えて、複数の機能は、リガンドの混合物を用いて導入することができる。

このように、SAM を利用した金ナノ粒子の機能化は汎用的で優れた手法である。以下に、一例として、カチオン性アルカンチオールの利用を示す。

### カチオン性アルカンチオールの利用

アルカンチオールの SAM で覆われた金ナノ粒子は、生物学分野ではその安定性と汎用性の高さから、多くの研究で利用されている。ここではアルカンチオール分子の反対側の末端がカチオン性を帯びるアミンの分子について機能化した例について紹介する。

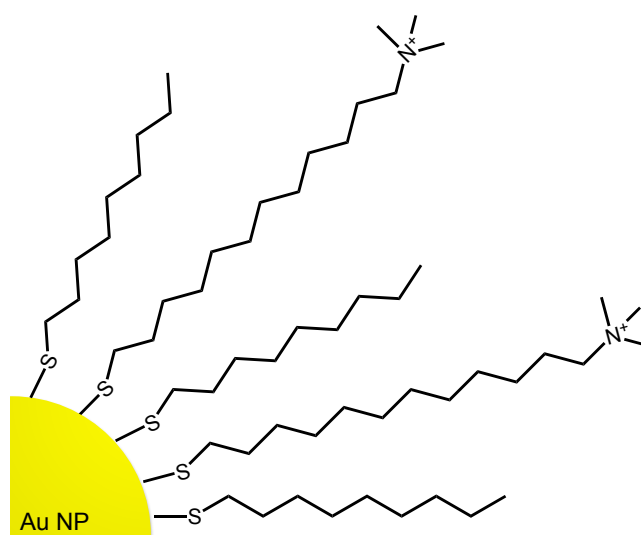


Figure 1-4. アミンにより機能化された金ナノ粒子の概念図

#### a) 生体内への輸送キャリアー

金ナノ粒子表面に提示されたアミンは生理的条件下で正に帯電している (Figure 1-4)。このアミンを狙って分子を静電的に吸着させることや共有結合形成の官能基としての利用が可能である。4級アミンと DNA の静電相互作用を利用してプラスミド DNA の細胞内輸送 [51-53]、さらに、生体内で分解されやすい不安定な薬物や疎水性の薬物を安定的な体内への送達も報告されている [54, 55]。

#### b) タンパク質センサー

金ナノ粒子の蛍光の消光作用を利用して、タンパク質センサーへも利用されている。タンパク質表面の極性や等電点は種類によってさまざまである。そこで、蛍光体と金ナノ粒子を、アミンを介して静電的に吸着させ、解離とともに蛍光が回復するといったシステムが提案されている [56, 57]。

金ナノ粒子表面のリガンドと紫外線照射下で蛍光を発するポリマー (poly(*p*-phenyleneethynylene); PPE) を静電吸着させたセンサーアレイが報告された [56]。タンパク質溶液を投入するとその相互作用の強さに従ってポリマーが解離し、紫外線照射下で蛍光を発する。蛍光の強度はポリマーの解離状態に依存し、またポリマーの解離はタンパク質とリガンドの相互作用の強さに依存する。既知のタンパク質と蛍光強度の関係をデータ化することで、さまざまなタンパク質が含まれる血清や汗など複雑なサンプル中に存在するタンパク質を検出することに成功している。

また、蛍光ポリマーの代わりに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いた報告も同研究グループによってなされている [57]。GFP は血清タンパク質のセンシング材料として用いられた。血清は 20,000 種類を超えるタンパク質を含有していることが知られている。蛍光ポリマーはタンパク質とわずかながら非特異的な相互作用を持つことが報告されており [58]、様々なタンパク質が存在する溶液系において検出の誤差が懸念される。また、GFP はサイズと分子量が既知であり、蛍光のコアも同定されていることから、他のタンパク質と相互作用に起因する凝集による蛍光強度の減少も新たなパラメータとして加えることができる。このような設計のもと、アミンを修飾した金ナノ粒子はタンパク質センサーへ利用されている。

次節では、本研究の目的である金ナノ粒子と生体分子との複合体化について実例を挙げて紹介する。

### 1-3-2. 生体分子を固定化する戦略

金ナノ粒子はユニークな物理学的特性を有しているが、生物学的な応用に用いる際は、一般に一つ以上の分子を金ナノ粒子表面へ固定化する必要があることはこれまで述べた。金ナノ粒子を含む様々なナノ粒子と生体分子を複合化する際の 6 つの目標となる基準が I. Medinza によって提唱されている [59, 60]。以下に紹介する。

- I. **ナノ粒子あたりの生体分子の結合量の制御**: 利用目的により、必要とされるナノ粒子表面上の生体分子の数は異なる。例えば、一分子の結合挙動を観察したい場合は、ナノ粒子上の生体分子はより少ない方が好ましい。また、分析したい分子に対する結合力や結合量を増やしたい場合は、ナノ粒子上の生体分子を多くする必要がある。一方で、DNA アレイに見られるように、生体分子の結合量が極端に多い場合は、立体障害などにより分析したい分子に対する結合力が減少するため、結合量の制御が必要である。
- II. **結合による機能損失の回避**: 全てのケースにおいて、生体分子およびナノ粒子の機能を保持する固定化操作を選択する必要がある。表面の生体分子やナノ粒子の機能損失や不安定化を避ける必要がある。
- III. **ナノ粒子表面からの距離の制御**: FRET や NSET、電子移動を行う際は、ナノ粒子表面と生体分子の距離を制御することが極めて重要となる。リガンドやタンパク質により調整する必要がある。
- IV. **ナノ粒子上での配向性の制御**: タンパク質、酵素、抗体の活性は、自身の結合サイトに依存するため、配向性を制御する必要がある。生体分子をナノ粒子上へ固定する際、非特異的な架橋や静電的相互作用での吸着を選択すると、不均一な固定となるため、生体分子の機能損失が生じる。
- V. **生体分子のナノ粒子への結合力の制御**: 一般に、ナノ粒子の溶液中での安定性を考慮した場合、生体分子とナノ粒子との結合は強固にすべきだが、ナノ粒子をキャリアーとした際のドラッグデリバリーシステムでは、送達したい薬物を患部で解離させる必要があるため、結合の制御が求められる。例えば、光や pH などによって結合が切れるなどの仕組みを導入する。
- VI. **汎用的な結合操作**: 実用的な利用を考えた場合、別の系での利用、異なるロットで調製したもの、異なる金属種のナノ粒子を用いた際においても再現性良く上記の 5 つの基準を満たす必要がある。

以上に挙げた生体分子とナノ粒子の複合化操作における 6 つの基準は、ナノ粒子だけでなく、バルクの金属への生体分子の固定化操作においても適用可能である。次節において、特にタンパク質の金ナノ粒子への固定化戦略について紹介する。



## 1-3-2-1. 静電的相互作用による固定化

金ナノ粒子表面のリガンドの電荷により、タンパク質を静電的に吸着させる手法である。例えば、クエン酸還元法により調製された金ナノ粒子は、表面がクエン酸に被覆されて負に帯電している。この負電荷に対してタンパク質表面の正に帯電したアミノ酸側鎖が静電的に結合可能である (Figure 1-5)。1999年にクエン酸還元法で調製した金ナノ粒子とIgG抗体を静電相互作用により結合させている [61]。溶液をクエン酸の等電点よりも高い pH にすることで金ナノ粒子を負に帯電させることができる。さらに、生体分子の交互積層 (LbL; Layer-by-Layer) 法にも拡張することができる。すなわち、負に帯電した金ナノ粒子に電気的に付着させたタンパク質分子 (正に帯電) は、負に帯電した次のタンパク質層の足場として用いることができる。また、この他にも適切なカチオン性リガンド分子を用いて、アニオン性のタンパク質を吸着させることも可能である。本手法は、リガンドの電荷を利用した非常に簡便な手法であり、以前から生体分子と金ナノ粒子の複合体形成における汎用的な手法として利用されてきた。しかしながら、この手法の欠点として、金ナノ粒子上での生体分子の配向がランダムになってしまうことや、特異的な結合ではないため、タンパク質の機能損失や目的以外の分子の非特異的な吸着が懸念される。従って、*in vitro*での診断技術に限定して利用されることが多い。

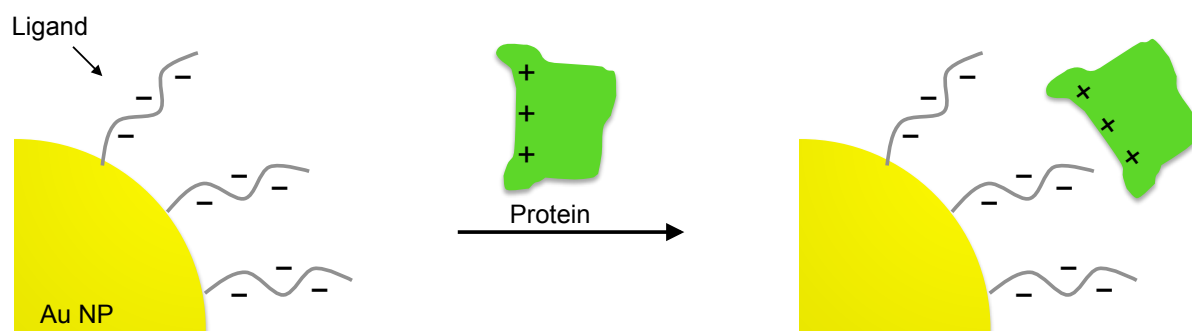


Figure 1-5. 静電的相互作用を利用したタンパク質の固定化

## 1-3-2-2. 官能基特異的な修飾技術

生体分子の官能基を標的とした化学反応により、金ナノ粒子への固定化を行うことができる。この手法は、SAM などの機能性リガンドをあらかじめ金ナノ粒子に被覆させた後、タンパク質との反応を行う。官能基としては、アミンやチオール、カルボン酸、水酸基などが挙げられる。一例として、N-hydroxysuccinimide (NHS) を有するリガンドを用いて、タンパク質中の Lys 残基を標的とした反応スキームを Figure 1-6 に示す。この他にも、Lys や Tyr を標的としたいくつかの修飾戦略が考えられ (Table 1-1)、目的やタンパク質の官能基に合った手法の選択が可能となる。機能性リガンドとタンパク質との複合化は、本節で挙げた例以外にも様々な手法が考えられ、目的に合わせて複合化操作を選択することができる [62]。このような官能基選択的な修飾技術は、生体分子とリガンド分子とを共有結合により結合されているため、生体分子が金ナノ粒子表面に強く固定化されるといった利点がある。しかし、一般に、複数存在する官能基群に対して反応を行うため、部位特異的な連結は困難とされている。従って、タンパク質の機能損失や、金ナノ粒子上のタンパク質数が制御困難なことが懸念される。

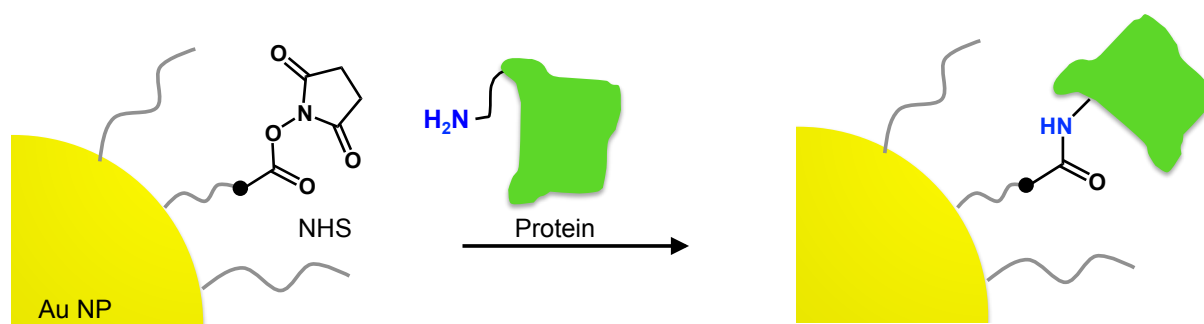


Figure 1-6. タンパク質の特定の官能基を利用した固定化

Table 1-1. 官能基選択的なタンパク質修飾技術の例

Residue	Reagent	Product
Lys	NHS ester	Amide bond
	Slufonyl halide	Sulfonamide bond
	Aldehyde after NaBH <sub>3</sub> CN	Imine → Alkylamine bond
	Isothiocyanate	Thiourea Bond
Tyr	Aniline	Diazonium compound

### 1-3-2-3. クリックケミストリーによる修飾技術

2001年にK. B. Sharplessらによって纏められた総説によると、クリックケミストリーとは、(1) 容易な実験操作、(2) 目的物が高収率で得られる、(3) 水溶液中でも安定、(4) 高い汎用性といった特徴を有する化学反応の総称である [63]。2006年にM. BrustらによってHuisgen環化付加反応をタンパク質と金ナノ粒子の複合化に利用可能なことが報告された [64]。概念図をFigure 1-7に示す。本報告では、アジド化リガンドで金ナノ粒子にSAMを形成し、アルキン化リパーゼを作用させることで、リパーゼ修飾金ナノ粒子の調製を行っている。しかし、リパーゼへのアルキンの導入には、リパーゼ表面のLys残基群が用いられている。従って、アルキンの導入数の制御が困難であることと、リパーゼの活性低下が懸念される。

また、2010年には、Raoらによって、Huisgen環化付加反応によるアジド化ルシフェラーゼとアルキンリガンド金ナノ粒子のバイオコンジュゲーションが報告された [65]。この報告では、Native chemical ligation (NCL) 法を利用してルシフェラーゼに対して部位特的にアジドを導入しており、ルシフェラーゼの活性低下を抑制した固定化ができているものと考えられる。本コンジュゲーション法は、他のタンパク質やナノ粒子に応用可能であることが考えられ、ナノ粒子の高機能化への応用が期待できる。その他のクリック反応も利用可能と考えられる。

これらのクリック反応は特異性が極めて高く、迅速に反応が進行するため、再現性は良くなることが期待できる。さらに、NCL法など部位特異的な修飾法を組み合わせることで、タンパク質の機能損失を最小限にした固定化が達成できるものと考えられる。しかし、操作ステップが多くなるといった欠点もある。

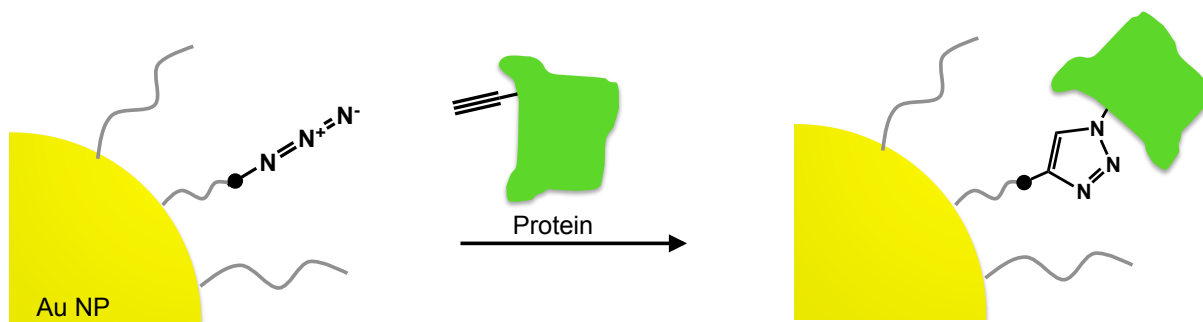


Figure 1-7. クリック反応を利用したタンパク質の固定化

### 1-3-2-4. 配位結合による修飾技術

ポリヒスチジン ( $\text{His}_n$ ) 配列はアフィニティタグとして、タンパク質に組み換え導入され、金属イオンが固定化されたアフィニティークラムを用いた精製 (IMAC; immobilized metal affinity chromatography) に利用される。 $\text{His}_n$ はnitrotriacetic acid (NTA) やiminodiacetic acid (IDA) などと共に、二価の金属イオン (e.g.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) と配位結合を形成することが知られている。例えば、NTAと $\text{Ni}^{2+}$ イオンとの錯体は、 $\text{Ni}^{2+}$ イオンの6つの配位座のうち4つがNTAによって占領され、残りの2つの配位座に水分子が配位した状態で安定な構造をとる。そこに $\text{His}_n$ タンパク質を共存させると、His残基中のイミダゾール基 (N原子) が、

NTA-Ni 錯体中の水分子と置換することで、NTA-Ni-His 錯体が形成される。一般に、タンパク質中に His が連続した配列は珍しく、His<sub>n</sub> はタンパク質の末端に融合されるため。そのため、錯形成に伴うタンパク質の構造変化は極めて小さいと考えられる。タンパク質の固定化においても、Ni-NTA を介して、His-tag 融合タンパク質を金ナノ粒子上に固定化できることが示されている [66]。リガンドに NTA を修飾後、Ni<sup>2+</sup> イオンを添加し、最後に His-tag 融合タンパク質を配位結合により固定化する手法となる (Figure 1-8)。Ni-NTA と His<sub>n</sub> との相互作用は弱いものではないと考えられるが、金属イオンの脱離や脱離した金属イオンがタンパク質の阻害剤となる可能性も考えられるので、適切な設計が必要である。また、一般に、Ni-NTA は His だけでなく、還元型の Cys も結合するため、リガンドとして用いたチオールリガンドを除去しておく必要がある。

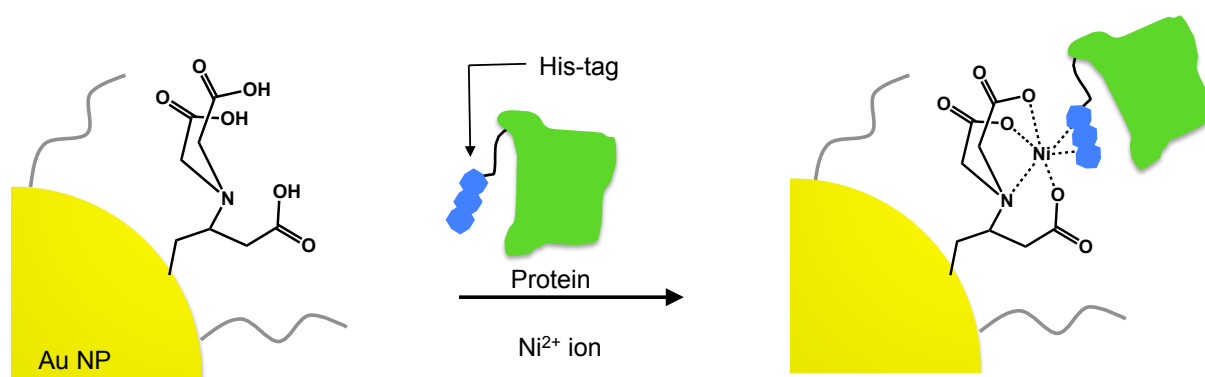


Figure 1-8. 配位結合を介したタンパク質の固定化

### 1-3-2-5. 生体分子の特異的な結合を利用した固定化

アビジン-ビオチン相互作用や抗体-抗原の結合を用いて、目的のタンパク質を金ナノ粒子上に固定化することができる。概念図を Figure 1-9 に示す。これまでビオチンとアビジンの相互作用によるバイオコンジュゲーションが行われてきた。実際に、ナノ粒子と生体分子との典型的な複合化操作において、第一選択肢として本相互作用が用いられることが多い。アビジンとビオチンの結合定数は  $10^{15} \text{ M}^{-1}$  と極めて高く、非共有結合の相互作用としては最も強固な結合であると言われている。細菌である *Streptomyces avidinii* から単離されたストレプトアビジン (SA) はビオチンに対してアビジンと似た相互作用を示すため、SA も同様にバイオコンジュゲーションに利用される。ビオチン化タンパク質 [67] や核酸 [68, 69] などが調製され、SA 修飾金ナノ粒子との結合が報告されている。

また、抗体と抗原の相互作用も同様にバイオコンジュゲーションに利用される。抗体-抗原の結合定数は  $10^7$ – $10^9 \text{ M}^{-1}$  であり、高い特異性を有する。実際に、金ナノ粒子に抗体を修飾し抗原を結合させる例 [70] も報告されており有用な手法となっている。

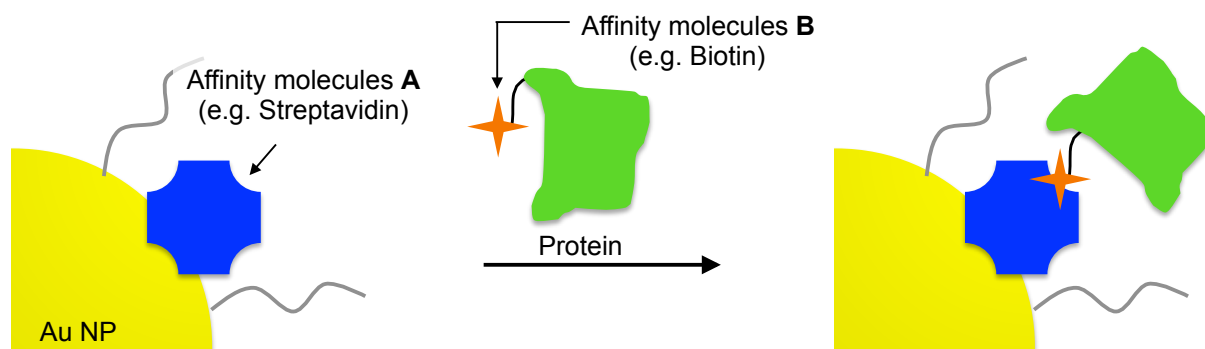


Figure 1-9. 生体分子特異的な相互作用によるタンパク質の固定化

### 1-3-2-6. チオールを用いた直接固定化法

タンパク質に Cys 残基を新たに組換え導入し、直接タンパク質を金ナノ粒子に作用させることで、タンパク質の固定化を行うことができる (Figure 1-10)。先述したように、チオール基は金表面と共有結合のような強固な結合を形成することが知られており、金ナノ粒子表面への生体分子の安定な固定化が達成可能である。生体分子表面に Cys 残基に由来するチオール残基を用いて金ナノ粒子へ直接修飾 [71] することや、遺伝子工学的手法や化学的手法 [72] によりチオールを導入することで強い結合能を担持させることができる。元来のチオール残基を用いて直接ナノ粒子へ固定化させた場合、本来の立体構造が変化し、不活性化することが懸念される。しかし、いくつかの安定なタンパク質は活性を損なうことなく固定化できることが報告されている。Ag ナノ粒子の例になるが、ヘモグロビン [73] やクロロカタコールジオキシゲナーゼ [74] は活性を保つことが報告されている。しかし、一般には、金ナノ粒子表面でタンパク質は変性し、その活性を失う。特に、内部のジスルフィド結合が切断され、金ナノ粒子と Au-S 結合を形成することで高次構造が変化することで完全に機能を損失してしまうと考えられる。

また、チオールを修飾した核酸と金ナノ粒子の複合体形成の例も報告されている。アミドリン酸前駆体を用いて固相合成法により合成された n-アルカンチオールで修飾された核酸を用いて金ナノ粒子と複合体化させた報告がある [75]。この他にもステロイドのジスルフィド誘導体を用いて核酸修飾した例 [76] やアデノシルリン酸チオラートを用いた例 [77] がある。

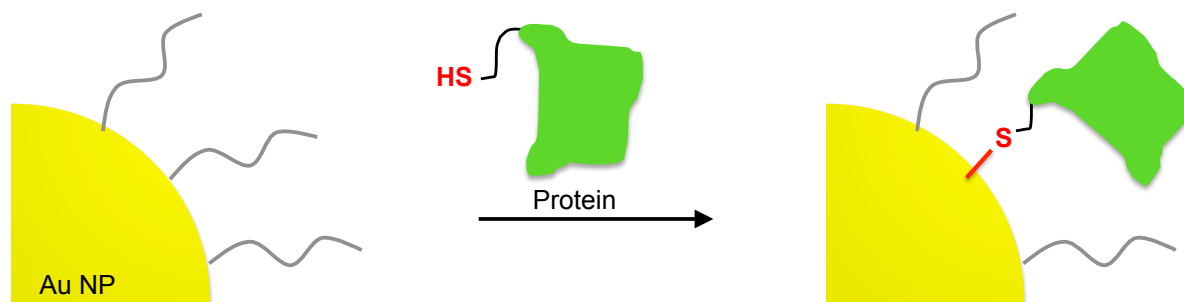


Figure 1-10. チオール基を介したタンパク質の固定化

## 1-3-2-7. 固体表面認識ペプチドによる直接固定化法

本節では、アフィニティペプチドを用いた固定化戦略について紹介する。アフィニティペプチドの探索と特性については、第3章で改めて紹介する。

生体分子と金ナノ粒子との複合化技術は、有機分子または生体分子と無機ナノ粒子間の共有結合に基づいた手法が選択されてきた [78]。しかしながら、生体分子と金属ナノ粒子間の共有結合の形成は、生体分子の変性や金属ナノ粒子の機能が十分に発揮されない場合がしばしば見られる。そこで近年、共有結合に変わるアプローチとして、コンビナトリアル化学により単離されたペプチド断片の非共有結合に基づいた修飾法が登場した [79–82]。特定の無機表面に親和性を持つペプチド断片をタンパク質に組換え導入することで、タンパク質に特異的な金属結合能を付与することができる。例えば、金表面に親和性を有するペプチドをタンパク質に導入することで、タンパク質の金表面への特異的な固定化が達成可能となる (Figure 1-11)。但し、こちらも 1-3-2-6 節で述べたように、直接金ナノ粒子表面へタンパク質が吸着してしまうことで、タンパク質の変性が起こることも懸念される。従って、目的タンパク質とアフィニティペプチドの間に緩衝材となるドメインを導入するなどして、目的のタンパク質が直接金ナノ粒子表面へ吸着することを避ける必要がある。

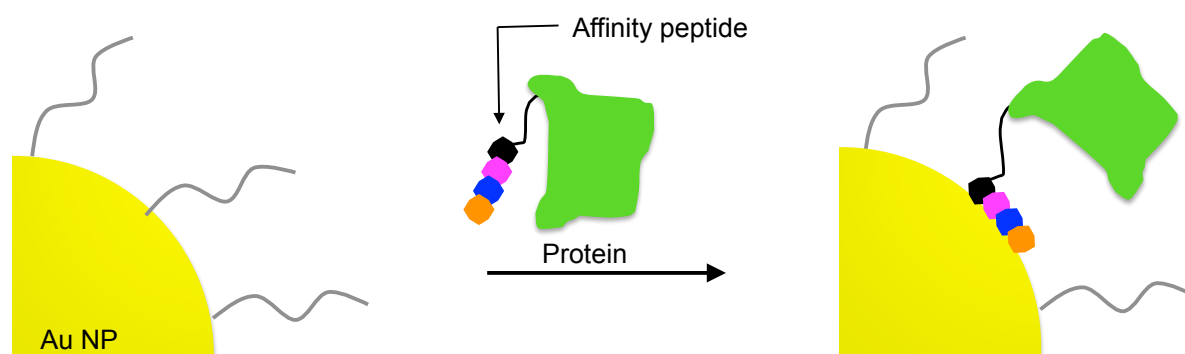


Figure 1-11. アフィニティペプチドを介したタンパク質の固定化

#### 1-4. 生体分子修飾金ナノ粒子の応用例

一般に、生体分子と金ナノ粒子複合化は、物理吸着、静電相互作用、共有結合などの手法が用いられてきた。固定化する生体分子としては以下のものが考えられ、それぞれについて様々な報告がなされている。

- ・ ペプチド、タンパク質、抗体
- ・ 生体触媒 (酵素、リボザイム)
- ・ 核酸、アプタマー
- ・ 糖鎖
- ・ 脂質

ここでは生物学分野への応用を中心に、金ナノ粒子への複合化材料である生体分子ごとに分類し、その応用の実例を交えて紹介する。

##### 1-3-4-1. タンパク質、酵素

###### センサー

凝集による溶液の色の変化に基づいてタンパク質や抗体の検出へ用いた報告がある。抗体の Fc ドメインに対しアフィニティーを有するプロテイン A を金ナノ粒子表面へ修飾し、抗体の検出に成功している [83]。その他にも糖タンパク質ホルモンであるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の検出のために、抗 hCG 抗体を金ナノ粒子と複合体化させて、血清中から hCG の迅速に検出できることが報告されている [84]。また、金ナノ粒子を単鎖の抗体可変領域 (scFv) を複合体化させ、scFv を介して様々なタンパク質を金ナノ粒子表面に提示できることを示している。

###### 酵素反応のシグナル増幅

アスパラギン酸プロテアーゼであるペプシンと複合体化させた金ナノ粒子は、担持させていないペプシン溶液よりも安定性が高くなることが報告されている [85]。ペプシンの非特異的な加水分解が抑えられ、安定に存在できるからではないかと考えられる。また、フラビン酵素であるグルコースオキシダーゼを金ナノ粒子 (1.4 nm) と複合体化させることで、酵素反応を利用した電極材料の調製が報告されている [34]。チオール修飾補酵素フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を金ナノ粒子に結合させ、活性を維持したまま安定的にアポグルコースオキシダーゼを金ナノ粒子に固定化することができることが示された (Figure 1-12)。金ナノ粒子が電子伝導体として働き、酵素反応で生じる電子を効率的に電極へ移動させることに成功している。

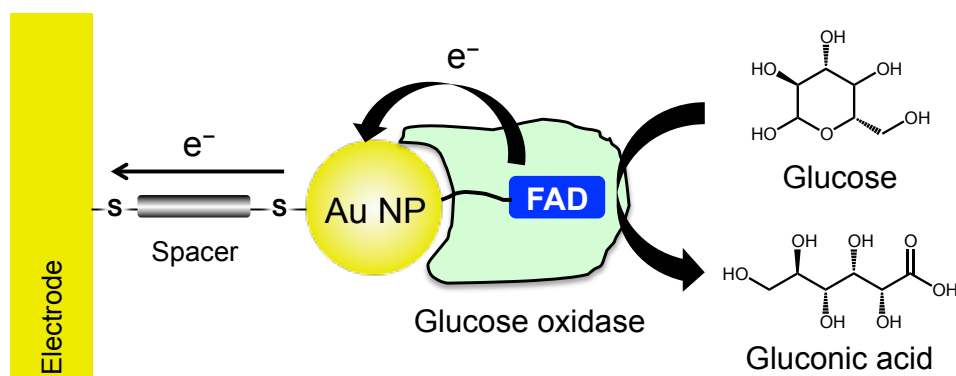


Figure 1-12. FAD を介した金ナノ粒子へのグルコースオキシダーゼの固定化の模式図 [34]

### ナノ構造体の形成

システインを表面に提示したササゲモザイクウイルス (Cowpea Mosaic Virus: CPMV) 変異体が、金ナノ粒子 (2–5 nm) とのナノ構造形成の足場として有用であることが報告されている [86]。様々な部分にシステインに置換させた CPMV に対してシステイン特異的に金ナノ粒子が結合することが透過型電子顕微鏡 (TEM) により示されており、ウイルスタンパク質を足場として金ナノ粒子の構造体化に成功している。

#### 1-3-4-2. 核酸

1996年にC. A. Mirkinらの研究グループはDNAと金ナノ粒子との複合体化し、分散状態と凝集状態で溶液の色が変化することを利用して比色センサーへ応用している [75]。相補鎖DNAの迅速な検出が可能であるため、現在では実用化にも至っている機能性材料である。また、金ナノ粒子-DNAハイブリッド材料の細胞内での利用も盛んに行われている。DNAはしばしばDNaseなどの加水分解酵素や他の生体分子から容易に分解や不活性化などの障害を受けてしまう [87, 88]。一方で、金ナノ粒子との複合体を形成することでDNaseからの加水分解を受けにくくなることが報告されており [89]、細胞内導入の際に金ナノ粒子との複合体化は非常に有用である。その理由は明らかではないが、金ナノ粒子表面へDNAが密に配列することによって加水分解酵素がアクセスしづらくなることや、DNAが密になっていることより局所的にイオン濃度が増加し酵素活性が発揮されないなどの理由が考えられる。近年「ナノフレアー」と名付けられた細胞内核酸検出プローブが報告された [90]。金ナノ粒子に一本鎖RNAを修飾し、蛍光基をラベル化した短いオリゴ核酸をハイブリダイズさせる。金ナノ粒子近傍では蛍光基は消光しており、細胞内のターゲットRNAを認識することで消光がキャンセルされて蛍光を発するようにデザインされている。この他にも、細胞内イメージング [91] やRNA干渉 [92]、癌細胞の検出 [93] などに用いられており、細胞内での利用の際に有用なツールとなっている。

#### 1-3-4-3. ペプチド



特定のオリゴペプチドはタンパク質を認識することが知られている。細胞内において、ペプチドに基づいた核局在化シグナルは、核の局在性や生体分子同士の複合体形成を助長させることに用いられている [94]。このようなペプチドのシグナル配列は、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸などが多く含まれ、importin $\alpha$  (核移行受容体 importin のサブユニット) と相互作用することで、核外膜を通過することが可能となり、核へ輸送される [95]。このようなシグナル配列は HIV が産出する Tat タンパク質に由来する CYGRKKRRQRRR や、インテグリン結合ドメインに由来する CKKKKKKGGRGDMFG などが知られている。

このようなシグナルペプチドと金ナノ粒子を複合体化させて HepG2 細胞の核に金ナノ粒子を移行させる試みがなされた [96]。核移行ペプチドをウシ血清アルブミン (BSA) に化学的に結合させ、ペプチド修飾 BSA を金ナノ粒子表面に吸着させることで、金ナノ粒子-ペプチド複合体を調製し、核への移行を試みた。その結果、この金ナノ粒子-ペプチド複合体は核に移行することが示された。興味深いことに、この複合体のみで、エンドサイトーシスや核局在化シグナルレセプターを介して核へ到達することができることが明らかとなった。また近年、同著者らはシグナルペプチドと分子量 5,000 の巨大なポリエチレングリコールを修飾した金ナノ粒子を細胞に導入することに成功している [97]。さらに、オリゴ核酸とシグナルペプチドを金ナノ粒子に修飾した複合体を核の周囲に局在化させ、目的の RNA を捉えることでタンパク質の発現を抑制した報告もなされている [98]。

また、アフィニティータグペプチドを用いて金ナノ粒子を精製できることも報告されている [99]。通常金ナノ粒子はサイズ排除クロマトグラフィーなどで精製を行っていた [100]。タンパク質の精製に用いられるヘキサヒスチジンアフィニティータグを導入した機能性ペプチドを金ナノ粒子に修飾し、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) 法により金ナノ粒子をタンパク質のように精製可能であることが示された。

#### 1-3-4-4. 抗体

抗体ラベル化金ナノ粒子はおおよそ 40 年前から免疫組織化学の分野で用いられてきた [101]。抗体ラベル化金ナノ粒子はイムノクロマトグラフィーとして妊娠検査キットや糖尿病検査キットとして実用化されており、産業面での重要性は高い (Figure 1-13)。また近年では、生きた細胞を用いた研究が盛んになっており、標的指向性を付与するために抗体が着目され、抗体修飾金ナノ粒子が研究者の間で再び注目されている。抗体は金ナノ粒子に対して、疎水性相互作用や静電相互作用などの非共有結合的な吸着や、ネイティブのチオール残基による共有結合的な吸着が知られているが、近年では N-hydroxysuccinimide (NHS) ester を介した結合法や DNA-ストレプトアビジン複合体を用いた修飾法 [102] など抗体の活性を損なわずに金ナノ粒子に修飾する手法が盛んに報告されている。NHS エステルは一級アミンに対して特異的に反応でき、また DNA は相補鎖特異的に反応することができるため今日では金ナノ粒子-抗体複合体の合成法には有用な手法となっている。

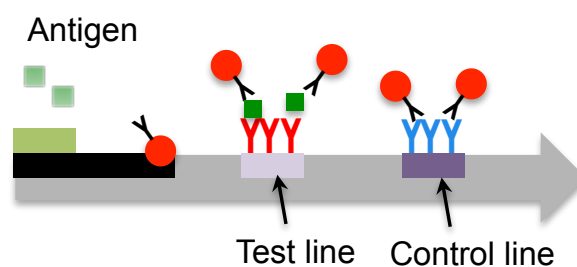


Figure 1-13. 金ナノ粒子を利用した免疫クロマトグラフィー

細胞への利用はイメージングとフォトサーマル治療への応用がある。イメージングでは、癌を構成するタンパク質特異的に結合する抗体を修飾した金ナノ粒子が調製され、癌細胞のイメージングができることが報告されている [103]。フォトサーマル治療への利用は、金ナノロッド [104] や金ナノシェル [105, 106] に抗体を修飾し、癌細胞への標的指向性を付与している。例えば、癌細胞はヒト上皮増殖因子受容体 2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2 : HER2) を過剰発現するので、HER2 に特異的に結合する抗体を用いて、金ナノシェル-抗体複合体を調製し、フォトサーマルによる治療が試みられている [106]。操作は金ナノシェル-抗体ハイブリッドが癌細胞の HER2 を認識・結合後、細胞に近赤外光を照射する。金ナノシェルが近赤外光を吸収し、エネルギーを熱に変換し放出することで、癌細胞を死滅させることができる。コントロールとして抗 HER2 抗体とは別の抗体を修飾した金ナノシェル複合体は癌細胞を認識しないために、癌細胞を死滅させることはできなかつた。このことから、金ナノシェル-抗 HER2 抗体複合体が癌細胞の HER2 特異的に認識でき、癌治療に有用であることが示された。

#### 1-3-4-5. 脂質

近年、金ナノ粒子-脂質複合化が報告されている [107-109]。C. A. Mirkin らの研究グループは脂質を含有した高比重リポタンパク質 (HDL) に着目し、脂質修飾金ナノ粒子の調製を行った。天然の HDL は動脈硬化性プラークのマクロファージや体内のコレステロール運搬を担う重要なタンパク質である。HDL とコレステロールは強い相互作用を示すことから、ナノ構造体の調製が可能である。まず、脂質を除いたアポリポタンパク質 A1 (APOA1) を調製し、金ナノ粒子に吸着させた。次いでそれぞれ別の機能を示す二種類のコレステロール (チオール化脂質、アミン化脂質) を加えることにより、金ナノ粒子表面の APOA1 に相互作用を示し、脂質修飾金ナノ粒子が調製できる。また、蛍光基を修飾したコレステロールを調製し、APOA1 とコレステロール誘導体との解離定数を算出している。その結果、 $K_D = 3.8 \pm 0.8 \text{ nM}$  と非常に小さいことが分かり、APOA1 とコレステロールは高い結合力を有することが初めて示された。この高い結合力は重要なデータであり、脂質を含む構造体をデザインする上で汎用的に用いられる可能性を秘めている。

その他にも、金ナノ粒子-HDL 複合体をもちいてマクロファージ細胞のイメージングを行った応用例 [108] やラマン散乱のレポーター分子を吸着させた新たな金ナノ粒子-脂質複合体を調製した例 [109] が

報告されている。脂質修飾した金ナノ粒子は生体内においても非常に安定であり、今後多くの分野での利用が期待され、応用研究が盛んになることが予想される。

1-3 章では、金ナノ粒子と生体分の組み合わせた複合材料について、その調製法や応用例を交えて述べてきた。生体分子と金ナノ粒子を複合化させることで様々な機能を有する新しい材料を開発することができ、無限の可能性を秘めている。今後もこのようなハイブリッド材料の開発が行われ、盛んに応用されることが予想される。しかしながら、生体分子は不安定であり容易に機能失活を起こす恐れがある。さらに、生体分子の失活を防ぐ目的から、金ナノ粒子との複合体化のプロセスのステップが多いなどの問題がある。このような問題から、金ナノ粒子-生体分子ハイブリッド材料をより安定に、効率よく得るための新たな調製法が求められている。そこで、本研究ではバイオミネラリゼーションを利用した新たな調製プロセスの開発を目指す。

## 1-5. 本論文の構成

本論文の構成は以下の通りである。

第 2 章では、グリセロールデヒドロゲナーゼ (GLD) 酵素反応を利用した金ナノ粒子の調製法の開発、さらに GLD を大腸菌に発現させることで大腸菌へのバイオミネラル化機能付与についての内容を記述する。GLD による NADH 補酵素再生系により産出される電子を金イオンの還元剤として利用することで金ナノ粒子ができると考え、酵素反応依存的な金ナノ粒子の調製法の開発を行った。GLD は大腸菌由来のものを選択した。まず、精製した GLD 酵素を用いて、GLD 酵素反応により産出される NADH によって金ナノ粒子が調製可能か否かを *in vitro* で評価した。次に、GLD 酵素が発現した大腸菌を用い、非発現の大腸菌と比較することで、GLD 酵素の発現により大腸菌にバイオミネラル化機能が付与できるかを評価した。

第 3 章では、GLD による NADH 補酵素再生系に対して、金結合性ペプチドを融合した機能性タンパク質を共存させることで、目的とする機能性タンパク質が金ナノ粒子表面に修飾されたタンパク質-金ナノ粒子複合体の調製を試みた。さらに、調製した機能性タンパク質が金ナノ粒子の形成とタンパク質の結合に及ぼす影響を評価した。最後に、得られた抗体結合ドメイン修飾金ナノ粒子を用い、Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) を行うことで、金ナノ粒子上のタンパク質が機能を保持しているかを評価した。

第 4 章では、機能性タンパク質と GLD を遺伝子工学的手法により融合させた新規キメラタンパク質を調製し、単一タンパク質成分によるタンパク質修飾金ナノ粒子の一段階合成を試みた。その際、これまで用いてきた大腸菌由来 GLD に代えて、より安定で結晶構造が入手可能な *Bacillus stearothermophilus* 由来 GLD (BsGLD) を用い、タンパク質の設計を行った。さらに、設計したキメラタンパク質に金結合能を付与するために、第 3 章で得られた知見をもとに、金結合ペプチドタグを設計して用いた。

第 5 章では、本論文の総括を行い、本研究の今後の展望について述べた。

## 1-6. 参考文献

- [1] Lane, N. The Grand Challenges of Nanotechnology. *J. Nanopart. Res.* **2001**, 3, 95–103
- [2] Service, R. F. Is Nanotechnology Dangerous? *Science* **2000**, 290, 1526–1527
- [3] 岩村 秀、廣瀬 千秋 [訳]、ナノ粒子化学 -基本原理から応用まで- (2007)
- [4] Faraday, M. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **1857**, 147, 145–181
- [5] Turkevitch, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss Faraday Soc.* **1951**, 11, 55–75
- [6] Enustun, B. V.; Turkevitch, J. Coagulation of Colloidal Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3317–3328
- [7] Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Phys. Sci.* **1973**, 241, 20–22
- [8] Giersig, M.; Mulvaney, P. Preparation of Ordered Colloidal Monolayers by Electro-Phoretic Deposition. *Langmuir* **1993**, 9, 3408–3413
- [9] Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid-Liquid System. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801–802
- [10] Daniel, M. -C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications towards Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 293–346
- [11] Perrault, S. D.; Chan, W. C. Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50–200 Nm. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17042–17043
- [12] Oh, E.; Susumu, K.; Goswami, R.; Mattoussi, H. One-Phase Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoparticles with Control Over Size and Surface Functionalities. *Langmuir* **2010**, 26, 7604–7613
- [13] Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, 25, 377–445
- [14] Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A.; Kinard, B. E.; Hankins, P. Chemical Sensing and Imaging with Metallic Nanorods. *Chem. Commun.* **2008**, 5, 544–557
- [15] Link, S.; El-Sayed, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4212–4217
- [16] Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 60–103
- [17] Fleischmann, M.; Hendra P. J.; Mcquillan, A. J. Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26, 163–166
- [18] Campion, A.; Kambhampati, P. Surface-Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 241–250
- [19] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Kneipp, J. Single Molecule Detection by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 443–450
- [20] Nie, S.; Emory, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **1997**, 275, 1102–1106

- [21] Krug, J. T.; Wang, G. D.; Emory, S. R.; Nie, S. Efficient Raman Enhancement and Intermittent Light Emission Observed in Single Gold Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9208–9214
- [22] Cao, Y. C.; Jin, R.; Mirkin, C. A. Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection. *Science* **2002**, 297, 1536–1540
- [23] Ni, J.; Lipert, R. J.; Dawson, G. B.; Porter, M. D. Immunoassay Readout Method Using Extrinsic Raman Labels Adsorbed on Immunogold Colloids. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4903–4908
- [24] Qian, X.; Peng, X. -H.; Ansari, D. O.; Yin-Goen, Q.; Chen, G. Z.; Shin, D. M.; Yang, L.; Young, A. N.; Wang, M. D.; Nie, S. In Vivo Tumor Targeting and Spectroscopic Detection with Surface-Enhanced Raman Nanoparticle Tags. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 83–90
- [25] Kneipp, J.; Kneipp, H.; Kneipp, K. Two-Photon Vibrational Spectroscopy for Biosciences Based on Surface-Enhanced Hyper-Raman Scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 17149–17153
- [26] Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J. Single-Mismatch Detection Using Gold-Quenched Fluorescent Oligonucleotides. *Nature Biotech.* **2001**, 19, 365–370
- [27] Maxwell, D. J.; Taylor, J. R.; Nie, S. Self-Assembled Nanoparticle Probes for Recognition and Detection of Biomolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9606–9612
- [28] Lee, S.; Cha, E. -J.; Park, K.; Lee, S. -Y.; Hong, J. -K.; Sun, I. -C.; Kim, S. Y.; Choi, K.; Kwon, I. C.; Kim, K.; Ahn, C. -H. A Near-Infrared- Fluorescence-Quenched Gold-Nanoparticle Imaging Probe for In Vivo Drug Screening and Protease Activity Determination. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2804–2807
- [29] Kim, Y. P.; Oh, Y. H.; Oh, E.; Ko, S.; Han, M. K.; Kim, H. S. Energy Transfer-Based Multiplexed Assay of Proteases by Using Gold Nanoparticle and Quantum Dot Conjugates on a Surface. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 4634–4641
- [30] Dulkeith, E.; Morteani, A. C.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Levi, S. A.; Van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; Möller, M.; Gittins, D. I. Fluorescence Quenching of Dye Molecules Near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 203002-1–203002-4
- [31] Dulkeith, E.; Ringler, M.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Javier, A. M.; Parak, W. J. Gold Nanoparticles Quench Fluorescence by Phase Induced Radiative Rate Suppression. *Nano Lett.* **2005**, 5, 585–589
- [32] Yun, C. S.; Javier, A.; Jennings, T.; Fisher, M.; Hira, S.; Peterson, S.; Hopkins, B.; Reich, N. O.; Strouse, G. F. Nanometal Surface Energy Transfer in Optical Rulers, Breaking The FRET Barrier. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3115–3119
- [33] Castaněda, M. T.; Merkoç, S. A. A. Electrochemical Sensing of DNA Using Gold Nanoparticles. *Electroanalysis*, **2007**, 19, 743–753
- [34] Xiao, Y.; Patolsky, F.; Katz, E.; Hainfeld, J. F.; Willner, I. Plugging into Enzymes': Nanowiring of Redox-Enzymes by a Gold Nanoparticle. *Science* **2003**, 299, 1877–1881

- [35] Xiao, Y.; Ju, H. -X.; Chen, H. -Y. Hydrogen Peroxide Sensor Based on Horseradish Peroxidase-Labeled Au Colloids Immobilized on Gold Electrode Surface by Cysteamine Monolayer. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 391, 73–82
- [36] Yu, A.; Liang, Z.; Cho, J.; Caruso, F. Electrochemical Nanoreactors Based on Dense Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2003**, 3, 1203–1207
- [37] Zhao, J.; Henkens, R. W.; Stonehuerner, J.; O'Daly, J. P.; Crumbliss, A. L. Direct Electron Transfer at Horseradish Peroxidase Modified Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1992**, 327, 109–119
- [38] Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Gold Nanoparticles are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* **2005**, 1, 325–327
- [39] Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining The Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, 6, 662–668
- [40] Yang, P. H.; Sun, X. S.; Chiu, J. F.; Sun, H. Z.; He, Q. Y. Transferrin-Mediated Gold Nanoparticle Cellular Uptake. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 494–496
- [41] Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W. Elucidating The Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* **2007**, 7, 1542–1550
- [42] Alkilany, A. M.; Nagaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, 5, 701–708
- [43] Martin, B. R.; Dermody, D. J.; Reiss, B. D.; Fang, M.; Lyon, L. A.; Natan, M. J.; Mallouk, T. E. Orthogonal Self Assembly on Colloidal Gold-Platinum Nanorods. *Adv. Mater.* **1999**, 11, 1021–1025
- [44] Hou, W.; Dasog, M.; Scott, R. W. J. Probing The relative Stability of Thiolate and Dithiolate Protected Au Monolayer protected Clusters. *Langmuir* **2009**, 25, 12954–12961
- [45] Zhao, Y.; Perez-Segarra, W.; Shi, Q. C.; Wei, A. Dithiocarbamate Assembly on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7328–7329
- [46] Mayya, K. S.; Caruso, F. Phase Transfer of Surface-Modified Gold Nanoparticles by Hydrophobization with Alkylamines. *Langmuir* **2003**, 19, 6987–6993
- [47] Yee, C. K.; Ulman, A.; Ruiz, J. D.; Parikh, A.; White, H.; Rafailovich, M. Alkyl Selenide- and Alkyl Thiolate-Functionalized Gold Nanoparticles: Chain Packing and Bond Nature. *Langmuir* **2003**, 19, 9450–9458
- [48] Cheng, Z. L.; Skouta, R.; Vazquez, H.; Widawsky, J. R.; Schneebeil, S.; Chen, W.; Hybertsen, M. S.; Breslow, R.; Venkataraman, L. In Situ Formation of Highly Conducting Au-C Contacts for Single Molecule Junctions. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 353–357
- [49] Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1533–1554
- [50] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. SAM of Thiolates on Metals as a form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103–1169
- [51] Sandhu, K. K.; McIntosh, C. M.; Simard, J. M.; Smith, S. W.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticle-Mediated Transfection of Mammalian Cells. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 3–6

- [52] Thomas, M.; Klibanov, A. M. Conjugation to Gold Nanoparticles Enhances Polyethylenimine's Transfer of Plasmid DNA into Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 9138–9143
- [53] Han, G.; You, C. C.; Kim, B. J.; Turingan, R. S.; Forbes, N. S.; Martin, C. T.; Rotello, V. M. Light-Regulated Release of DNA and its Delivery to Nuclei by Means of Photolabile Gold Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 3165–3169
- [54] Bowman, M. C.; Ballard, T. E.; Ackerson, C. J.; Feldheim, D. L.; Margolis, D. M.; Melander, C. Inhibition of HIV Fusion with Multivalent Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6896–6897
- [55] Kim, C. K.; Ghosh, P.; Pagliuca, C.; Zhu, Z. J.; Menichetti, S.; Rotello, V. M. Entrapment of Hydrophobic Drugs in Nanoparticle Monolayers with Efficient Release into Cancer Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1360–1361
- [56] You, C. C.; Miranda, O. R.; Gider, B.; Ghosh, P. S.; Kim, I. B.; Erdogan, B.; Krovi, S. A.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. Detection and Identification of Proteins Using Nanoparticle-Fluorescent Polymer 'Chemical Nose' Sensors. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 318–323
- [57] De, M.; Rana, S.; Akpınar, H.; Miranda, O. R.; Arvizo, R. R.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. Sensing of Proteins in Human Serum Using Conjugates of Nanoparticles and Green Fluorescent Protein. *Nat. Chem.* **2009**, 1, 461–465
- [58] Kim, I. B.; Dunkhorst, A.; Bunz, U. H. F. Nonspecific Interactions of a Carboxylate-Substituted PPE with Proteins. A Cautionary Tale for Biosensor Applications. *Langmuir* **2007**, 21, 7985–7989
- [59] Medintz, I.; Universal Tools for Biomolecular Attachment to Surfaces. *Nat. Mater.* **2006**, 5, 842–842
- [60] Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology *Chem. Rev.* **2013**, 113, 1904–2074
- [61] Shenton, W.; Davis, S. A.; Mann, S. Directed Self-Assembly of Nanoparticles into Macroscopic Materials Using Antibody-Antigen Recognition. *Adv. Mater.* **1999**, 11, 449–452
- [62] Bioconjugate Techniques, 2nd Ed.; Hermanson, G. T., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, **2008**
- [63] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021
- [64] Brennan, J. L.; Hatzakis, N. S.; Tshikhudo, T. R.; Dirvianskyte, N.; Razumas, V.; Patkar, S.; Vind, J.; Svendsen, A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Brust, M. Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 1373–1375
- [65] Kim, Y. P.; Daniel, W. L.; Xia, Z.; Xie, H.; Mirkin, C. A.; Rao, J. Bioluminescent Nanosensors for Protease Detection Based upon Gold Nanoparticle–Luciferase Conjugates *Chem. Commun.* **2010**, 46, 76–78
- [66] Abad, J. M.; Mertens, S. F. L.; Pita, M.; Fernandez, V. M.; Schiffrin, D. J. Functionalization of Thioctic Acid-Capped Gold Nanoparticles for Specific Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5689–5694



- [67] Nash, M. A.; Waitumbi, J. N.; Hoffman, A. S.; Yager, P.; Stayton, P. S. Multiplexed Enrichment and Detection of Malarial Biomarkers Using a Stimuli-Responsive Iron Oxide and Gold Nanoparticle Reagent System. *ACS Nano* **2012**, *6*, 6776–6785
- [68] Wang, J.; Li, J. H.; Baca, A. J.; Hu, J. B.; Zhou, F. M.; Yan, W.; Pang, D. W. Amplified Voltammetric Detection of DNA Hybridization via Oxidation of Ferrocene Caps on Gold Nanoparticle/Streptavidin Conjugates. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3941–3945
- [69] Shaiu, W.-L.; Larson, D. D.; Vasenka, J.; Henderson, E. Atomic Force Microscopy of Oriented Linear DNA Molecules Labeled with 5nm Gold Spheres. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 99–103
- [70] Okano, K.; Takahashi, S.; Yasuda, K.; Tokinaga, D.; Imai, K.; Koga, M. Using Microparticle Labeling and Counting for Attomole-Level Detection in Heterogeneous Immunoassay. *Anal. Biochem.* **1992**, *202*, 120–125
- [71] Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications; Hayat, M. A., Ed.; Academic Press: New York, NY **1989**
- [72] Ghosh, S. S.; Kao, P. M.; McCue, A. W.; Chappelle, H. L. Use of Maleimide-Thiol Coupling Chemistry for Efficient Syntheses of Oligonucleotide-Enzyme Conjugate Hybridization Probes. *Bioconjugate Chem.*, **1990**, *1*, 71–76
- [73] Groot, J. E.; Hester, R. E.; Kaminaka, S.; Kitagawa, T. Functional Activity of Hemoglobins Adsorbed on Colloidal Silver: A Surface-Enhanced Resonance Raman-Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 2044–2048
- [74] Broderick, J. B.; Natan, M. J.; O'Halloran, T. V.; Van Duyne, R. P. Evidence for Retention of Biological Activity of a Non-Heme Iron Enzyme Adsorbed on a Silver Colloid: A Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Study. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13771–13776
- [75] Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* **1996**, *382*, 607–609
- [76] Letsinger, R. L.; Elghanian, R.; Viswanadham, G.; Mirkin, C. A. Use of a Steroid Cyclic Disulfide Anchor in Constructing Gold Nanoparticle–Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 289–291
- [77] Bardea, A.; Dagan, A.; Ben-Dov, I.; Amit, B.; Willner, I. Amplified Microgravimetric Quartz Crystal Microbalance Analyses of Oligonucleotide Complexes: A Route to a Tay-Sachs Biosensor Device. *Chem. Commun.* **1998**, *7*, 839–840
- [78] Katz, E.; and Willner, I. Integrated Nanoparticle–Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042–6108
- [79] Sarikaya, M.; Tamerler, C.; Jen, A. K.-Y.; Schulten, K.; Baneyx, F. Molecular Biomimetics: Nanotechnology through Biology. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 577–585
- [80] Sarikaya, M.; Tamerler, C.; Schwartz, D. T.; Baneyx, F. Materials Assembly and Formation Using Engineered Polypeptides. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2004**, *34*, 373–408

- [81] Tamler, C.; Sarikaya, M. Genetically Designed Peptide Base Molecular Materials. *ACS Nano* **2009**, *3*, 1606–1615
- [82] Slocik, J. M.; Govorov, A. O.; Naik, R. R. Plasmonic Circular Dichroism of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 701–705
- [83] Thanh, N. T. K.; Rosenzweig, Z. Development of an Aggregation-Based Immunoassay for Anti-Protein A Using Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1624–1628
- [84] Schneider, B. H.; Dickinson, E. L.; Vach, M. D.; Hoijer, J. V.; Howard, L. V. Optical Chip Immunoassay for hCG in Human Whole Blood. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 13–22
- [85] Gole, A.; Dash, C.; Ramakrishnan, V.; Sainkar, S. R.; Mandale, A. B.; Rao, M.; Sastry, M. Pepsin-Gold Colloid Conjugates: Preparation, Characterization, and Enzymatic Activity. *Langmuir* **2001**, *17*, 1674–1679
- [86] Chatterji, A.; Ochoa, W. F.; Lin, T.; Johnson, J. E.; Ratna, B. R. Cowpea Mosaic Virus as a Scaffold for 3-D Patterning of Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 867–870
- [87] Woolf, T. M.; Jennings, C. G. B.; Rebagliati, M.; Melton, D. A. The Stability, Toxicity and Effectiveness of Unmodified and Phosphorothioate Antisense Oligodeoxynucleotides in *Xenopus* Oocytes and Embryos. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1763–1769
- [88] Pan, C. Q.; Lazarus, R. A. Engineering Hyperactive Variants of Human Deoxyribonuclease I by Altering Its Functional Mechanism. *Biochemistry* **1997**, *36*, 6624–6632
- [89] Rosi, N. L.; Giljohann, D. A.; Thaxton, C. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science* **2006**, *312*, 1027–1030
- [90] Seferos, D. S.; Giljohann, D. A.; Hill, H. D.; Prigodich, A. E.; Mirkin, C. A. Nano-Flares: Probes for Transfection and mRNA Detection in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15477–15479
- [91] Zheng, D.; Seferos, D. S.; Giljohann, D. A.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Aptamer Nano-flares for Molecular Detection in Living Cells. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3258–3261
- [92] Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Gene Regulation with Polyvalent siRNA-Nanoparticle Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2072–2073
- [93] Medley, C. D.; Smith, J. E.; Tang, Z.; Wu, Y.; Bamrungsap, S.; Tan, W. H. Gold Nanoparticle Based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Cancerous Cells. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1067–1072
- [94] Vives, E.; Schmidt, J.; Pelegrin, A. Cell-Penetrating and Cell-Targeting Peptides in Drug Delivery. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2008**, *1786*, 126–138
- [95] Goldfarb, D. S.; Garipey, J.; Schoolnik, G.; Komberg, R. D. Synthetic Peptides as Nuclear Localization Signals. *Nature* **1986**, *322*, 641–644
- [96] Tkachenko, A. G.; Xie, H.; Coleman, D.; Glomm, W.; Ryan, J.; Anderson, M. F.; Franzen, S.; Feldheim, D. L. Multifunctional Gold Nanoparticle–Peptide Complexes for Nuclear Targeting. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4700–4701

- [97] Liu, Y. L.; Shipton, M. K.; Ryan, J.; Kaufman, E. D.; Franzen, S.; Feldheim, D. L. Synthesis, Stability, and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide–Poly(ethylene glycol) Monolayers *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2221–2229
- [98] Patel, P. C.; Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Mirkin, C. A. Peptide Antisense Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 17222–17226
- [99] Lévy, R.; Wang, Z.; Duchesne, L.; Doty, R. C.; Copper, A. I.; Brust, M.; Fernig, D. G. A Generic Approach to Monofunctionalized Protein-Like Gold Nanoparticles Based on Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 592–594
- [100] Lévy, R.; Thanh, N. T. K.; Doty, R. C.; Hussain, I.; Nichols, R. J.; Schiffrin, D. J.; Brust, M.; Fernig, D. G. Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10076–10084
- [101] Faulk, W. P.; Taylor, G. M. An Immunocolloid Method for the Electron Microscope. *Immunochemistry* **1971**, *8*, 1081–1083
- [102] Niemeyer, C. M.; Ceyhan, B. DNA-Directed Functionalization of Colloidal Gold with Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3685–3688
- [103] El-Sayed, I. H.; Huang, X. H.; El-Sayed, M. A. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 829–834
- [104] El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A. Selective Laser Photo-Thermal Therapy of Epithelial Carcinoma Using Anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles. *Cancer Lett.* **2006**, *239*, 129–135
- [105] Hirsch, L. R.; Stafford, R. J.; Bankson, J. A.; Sershen, S. R.; Rivera, B.; Price, R. E.; Hazle, J. D.; Halas, N. J.; West, J. L. Nanoshell-Mediated Near-infrared Thermal Therapy of Tumors Under Magnetic Resonance Guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 13549–13554
- [106] Loo, C.; Lowery, A.; Halas, N.; West, J.; Drezek, R. Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 709–711
- [107] Thaxton, C. S.; Daniel, W. L.; Giljohann, D. A.; Thomas, A. D.; Mirkin, C. A. Templated Spherical High Density Lipoprotein Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1384–1385
- [108] Cormode, D. P.; Skajaa, T.; van Schooneveld, M. M.; Koole, R.; Jarzyna, P.; Lobatto, M. E.; Calcagno, C.; Barazza, A.; Gordon, R. E.; Zanzonico, P. *et al.* Nanocrystal Core High-Density Lipoproteins: A Multimodal Molecular Imaging Contrast Agent Platform. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3715–3723
- [109] Tam, N. C. M.; Scott, B. M. T.; Voicu, D.; Wilson, B. C.; Zheng, G. Facile Synthesis of Raman Active Phospholipid Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2178–2182

## 第2章

## グリセロールデヒドロゲナーゼ発現大腸菌を用いた金ナノ粒子の合成

## 2-1. 緒言

金ナノ粒子はユニークな光学特性や物理化学的特性を示す機能性マテリアルである。これまで、金ナノ粒子を用いた様々なアプリケーションが開発されており、その応用範囲は多岐に渡る。一般に、金ナノ粒子は、適切な還元剤と保護剤を用いて前駆体金属イオンから化学還元することにより得られる。この手法は非常に汎用的な手法として現在も用いられているが、金ナノ粒子を生体分子や有機分子で機能化する際においてはリガンド交換などの操作が必要となる。他方で、自然界に目を向けると、生物はボトムアップ式に無機物結晶のナノ構造体形成を行い、さらにそのプロセスは常温、常圧、生理的条件下といったマイルドな条件で達成される。実際に、微生物を用いた金ナノ粒子の合成法などが報告されており、ユニークな手法として注目を集めている。しかし、生物本来のプロセスを利用した手法では、金ナノ粒子形成の詳細な機構は不明のままである。ここでは、生体分子の機能を利用した金ナノ粒子の調製について紹介したい。

## 2-1-1. バイオミネラル化

生物は様々な結晶性、非結晶性の鉱物を作り出し、その機能を利用することで生命活動を行っている。例えば、ヒトを含む脊椎動物はリン酸カルシウムを利用して骨や歯を作り出し、体を支えることや臓器の保護などを行っている。また、貝や珊瑚、甲殻類に代表される無脊椎動物は、炭酸カルシウムの結晶を作り出し、臓器の保護や体内の水分保持などの役割を担っている。植物においても、イネの葉や茎に多く含まれるケイ酸は堅さの保持を助けている。さらに、磁性細菌と呼ばれる細菌は、細胞内にマグネタイトを作り、自身の進路決定の際のコンパスとして利用している。このように、生物が無機鉱物を作り出すバイオミネラルは、細菌から高等な動物まで幅広い生物で作られ、形の規定や臓器の保護、平衡感覚や地磁気のセンサーなど、生命活動を支える様々な材料が知られている。このような生物によって作り出されるバイオミネラルは無機鉱物と有機物から構成された有機-無機ハイブリッド材料であり、化学合成により作られるものとは比べ、穏やかな反応条件下で調製できる傾向がある。さらに、バイオミネラルの構成成分、サイズ、構造、形態は厳密に制御されているため、これまで多くの科学者の興味を引いてきた。一般に、バイオミネラル形成機構は不明な点が多いが、ほとんどの場合でペプチドやタンパク質が関与しており [1]、近年では分子レベルでの理解をもとに応用研究も行われるようになった [2, 3]。

バイオミネラル化の定義は諸説あるが、ここでは渡部哲光による分類 [8] に従い、二つに大別した。一つは、「生物に備わった鉱物化機構によって誘起されるミネラル化」、もう一つは「生物が産出し体外に放出した物質により誘起されるミネラル化」である。以下に、それぞれの詳細について述べる。

### 2-1-1-1. 生物制御によるバイオミネラリゼーション

生物制御によるバイオミネラリゼーションとは、生物が環境中のイオンを利用する生物機構によって、イオンの取り込みから鉱物化までを行う現象のことである。ほとんど全ての場合、このバイオミネラルの形成にはその形成に関与する有機基質が共存する。また、無機的に形成された鉱物には見られず、その生物種特有の形態を示すものが多い。貝殻や珊瑚の骨格形成など、一般的に考えられているバイオミネラリゼーションの大部分がこれに当てはまる。この生物制御による鉱物化における重要な点は、鉱物は上皮細胞の分泌液から形成され、細胞の外表面に接している点である。つまり、バイオミネラルは直接環境に接している場合においても、外側から成長せず、環境から隔離された細胞の接している内側から成長する。さらに、細胞内で形成したバイオミネラルをエキソサイトーシスにより輸送している生物種も存在する。

また、生物制御機構によるミネラル化は、ミネラルの成分となるイオンの生体内への取り込みから始まる。取り込まれたミネラルはタンパク質やペプチド、アミノ酸などと結合し、それに続く酵素反応の基質となり、ミネラル化、特定の場所への輸送へとつながる。この一連の現象はバイオミネラリゼーションの基本的な過程ではあるが、カルシウム以外の機構の解明はほとんど進んでいない。カルシウムに関しては、食料から消化器官を経て血液に入るものと、カルシウムチャネルから体内に取り込まれるものがある。水生植物、水生下等動物の場合、細胞内カルシウムイオン濃度は  $1 \mu\text{M}$ 、淡水・海水中の濃度はおよそ  $0.5\text{--}10 \text{ mM}$  であり、外環境の濃度の方が 500 倍以上高い。カルシウムイオンの通過機構として、その多くは細胞膜上のカルシウムイオンチャネルを介して細胞内部に運ばれる。体外への排出は ATPase (Ca-ATPase、Ca、Mg-ATPase 等)の働きにより濃度勾配に逆らって運び出される。

### 2-1-1-2. 生物誘発によるバイオミネラリゼーション

ここでは、生物活動に誘発されて、生物体表面を含めた生物体内外で鉱物が形成することを生物誘発と定義する。バイオミネラルを構成する無機・有機物質の一部は生物から排泄されたものが多いが、生物から全く供給されないものもある。生物誘発作用によってミネラリゼーションを起こす生物の多くは、バイオミネラルによって利益を得られることはほとんどなく、バイオミネラルの形は無機的にできた鉱物とあまり変わらない。細菌類や菌類、藍菌類などによるバイオミネラリゼーションの大部分はこのような誘発作用によって起こったものである。例えば、硫酸還元細菌による硫化鉄の形成などがある。この細菌は細胞内で硫酸塩または硫黄を還元して環境中に硫化水素を放出する。もしその場に鉄や亜鉛、その他の金属イオンが存在し、pH、イオン濃度など適当な条件が揃えば、細菌の表面に硫化鉄や硫化亜鉛などの硫化金属が析出する。この細菌は放出された化学物質によりミネラリゼーションを誘発している。

また、生物に利益をもたらす誘発型のバイオミネラリゼーションも存在する。藍藻類は、ストラマライトや炭酸塩マットと呼ばれる細菌の棲息地 (shelter) を形成し、独自の生活環境を作ることが知られている。菌類と藻類からなる共生生物である地衣類はシュウ酸化合物の結晶を作り出し、周囲の有害な金属イオンを沈殿させて生体内に入るのを防ぐと考えられている。

### 2-1-2. 微生物を利用した金属ナノ粒子の合成

特定の微生物は金属ナノ粒子を合成できることが知られており [9-11]、廃液からの金属イオンの回収への利用も検討されている。金ナノ粒子に関しては、2001年に植物に寄生する糸状菌 (*Verticillium* sp.) を用いて、金イオンから約 20 nm の単分散な金ナノ粒子を調製できるという報告がなされた [12]。生物の金属イオンに対する解毒性や恒常性を維持するための還元能や集積能を、巧みに利用したユニークな手法であり、金イオンやその他の金属イオンのナノ粒子を調製できる新たな手法として注目を集めている。しかしながら、現在でも反応機構は不明のままである。一般に、微生物を用いた金属ナノ粒子合成は生物の代謝や金属イオンに対する応答、どのような生体分子が形成に関与しているかなど、網羅的に評価する必要があり、メカニズムの解明は困難である。

また、超好熱性古細菌の *P. islandicum* や *P. furiosus* や超好熱性細菌の *T. maritima* や中温性細菌の *S. algae* と *G. ferrireducens* が Au (III) から Au (0) への還元を行うことができることが報告されている [13]。しかしながら、電子供与体は不明であり、Au (0) が沈殿する位置 (細胞内、ペリプラズム空間、細胞外等) も菌種によって異なる。ほとんどの細菌の場合は細胞表に金が沈殿する。*S. algae* や *G. ferrireducens* に関してはペリプラズム空間に Au (0) が沈殿することが確認されている [13, 14]。分類の近い菌種によっても金イオンを還元できるものとそうでないものがあることも示されている。例えば、*P. islandicum* と分類の近い *P. aerophilum* は Au (III) を還元することができない。

このように天然の細菌を用いた場合は、金属イオンの詳細な還元メカニズムが不明であることが多い。しかし、いくつかの細菌に関しては、ヒドロゲナーゼやシトクロム *c* が関わっていることが示唆されている。*S. algae* などは水素を電子供与体として Au (III) の還元を行うことが明らかとされ [15]、ヒドロゲナーゼの関与が示唆されている。また、*G. metallireducens* から抽出したシトクロム *c* が、溶液中の Au (III) を含む様々な金属イオンに電子を供与することができることが示されていることから [16]、細菌内のシトクロム *c* が還元に関与しているのではないかと考えられている。

繰り返しになるが、メカニズムが不明なことや特殊な条件でのみ金属イオンに対する還元機能を発現することから、汎用的な利用は困難と考えられる。

### 2-1-3. 遺伝子組換え大腸菌を利用した金属ナノ粒子の合成

近年、遺伝子レベルまで研究が進んでいる大腸菌に対して、遺伝子操作を行うことで、バイオミネラリゼーション機能を付与する試みが報告された [17]。phytochelatin (PC) 合成酵素である phytochelatin synthetase (PCS) および PC の前駆体であるグルタチオンの合成酵素  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase をコードする遺伝子を大腸菌に導入し、発現させることで、量子ドットである CdS ナノ粒子の調製に成功している。さらに、2010年には PCS と metallothionein (MT) を共発現するように遺伝子操作を行った組換え大腸菌により、金ナノ粒子を含む様々な金属ナノ粒子が調製可能であり、加える金属イオン濃度により金属ナノ粒子のサイズの制御が可能であることが報告され [18]、組換え大腸菌での金属ナノ粒子合成プロセスの可能性を大きく広げた。PC および MT はシステイン残基 (Cys) に富んだタンパク質で、重金属イオンとの結

合能を持つことが知られている。このように、金属イオンと親和性の高いタンパク質を過剰発現させることで容易に様々な金属ナノ粒子を調製できることが明らかとなった。しかしながら、形成したナノ粒子表面にはCys残基を多く有するタンパク質が結合し、凝集体となってしまふ。その結果、単離精製が困難であることや、それに続くナノ粒子表面への機能性分子の修飾が困難なことが考えられる。

#### 2-1-4. 酸化還元酵素が触媒する酵素反応による金属イオンの還元

酸化還元酵素は、呼吸によって得られる酸素を体内で利用する際にもたいへん重要な酵素である。多くの酸化還元酵素はコファクターとして金属イオンや補酵素を必要としている。これらの補酵素は、しばしば電子伝達酵素鎖の一つの酵素に酸化/還元され、生成した酸化型/還元型の補酵素が、その電子伝達過程の次の酵素の基質になるか、それとも酸化型/還元型補酵素が次の酵素によって還元/酸化される補酵素になるかである。このようにして補酵素は生体内で「再生 (regeneration)」され、一連の酵素過程の下、別の酵素により再び使用される [19]。

近年、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の酵素反応により再生される NADH を用いて、金イオンの還元ができることが示された (Figure 2-1) [20]。NAD<sup>+</sup>から NADH を再生後に、塩化金酸および核としての金ナノ粒子を加えることで、核粒子の周囲に金が還元されることが示された。これを用い、金ナノ粒子の粒径増大に伴うスペクトル変化を利用して酵素センサーとして応用している。また、同研究者らは NADH が Cu (II) の還元もできることを示しており [21]、電子供与体としての NADH が金属イオン還元にも有用な化学物質であることを示した。酵素反応を利用した金属イオンの還元は、乳酸デヒドロゲナーゼ/NADH の他にもアルカリフォスファターゼ (AP)/p-アミノフェノールによる銀イオンの還元や [22]、アセチルコリンエステラーゼ (AChE)/チオコリン [23]、グルコースオキシダーゼ/過酸化水素 [24]、チロシナーゼ/ドーパミン誘導体 [25] による金イオンの還元などが報告されている。特にチロシナーゼ/ドーパミンは種粒子無しで金ナノ粒子の調製に成功している。

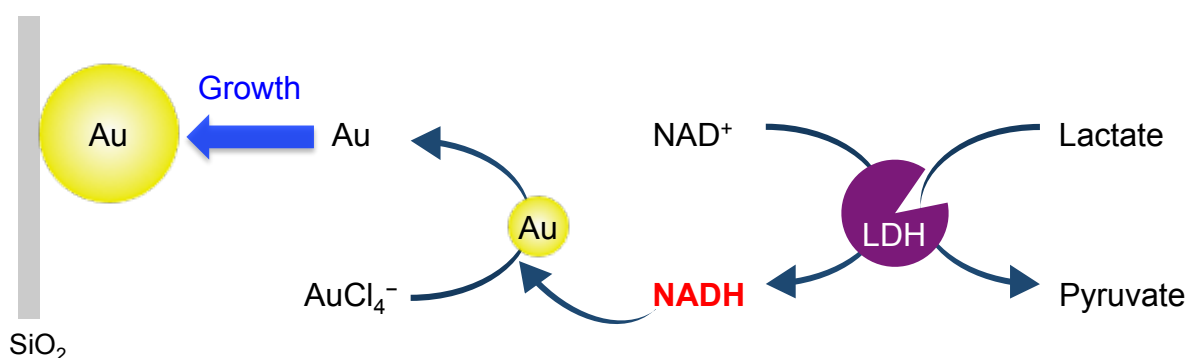


Figure 2-1. 乳酸脱水素酵素により産出される NADH を利用した金イオンの還元と金ナノ粒子の増大 [20]

本研究では、このような酸化還元酵素の酵素反応を大腸菌内で構築することで、大腸菌にバイオミネラルリゼーション機能を付与することを目指した。このような系を大腸菌内で構築して、金属ナノ粒子を調製した例はなく、バイオミネラルリゼーションのメカニズムの理解とその応用に関して意義深いものと考えられる。

### 2-1-5. 補酵素 NADH

補酵素とは、生体内で原子団の授受を行い、酵素反応の化学基の授受を行う低分子量の有機化合物である。酵素による多くの酸化あるいは還元反応に補酵素が必要である。補酵素の多くはビタミンの誘導体である。補酵素の分類は主たる構造によっておこなわれているが、電子伝達に関する補酵素に関しては電子伝達体と呼ばれている。中でも本研究では Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) に着目し研究を進めている。NAD は全ての真核生物、あるいは多くの原核生物内で電子伝達をおこなう補酵素であり、酸化型 ( $\text{NAD}^+$ ) と還元型 (NADH) の2つの状態を取る (Figure 2-2)。二電子還元を受けるが、中間型は生じない。還元型の NADH は一見、プロトンが1つだけ付加されたように見えるが、ニコチン酸アミドの  $\text{N}^+$  が電子によって還元されるために、結果として2つのプロトンを運搬している。酸化還元電位 ( $E_0'$ ) は  $-0.32 \text{ V}$  (vs SHE) である。

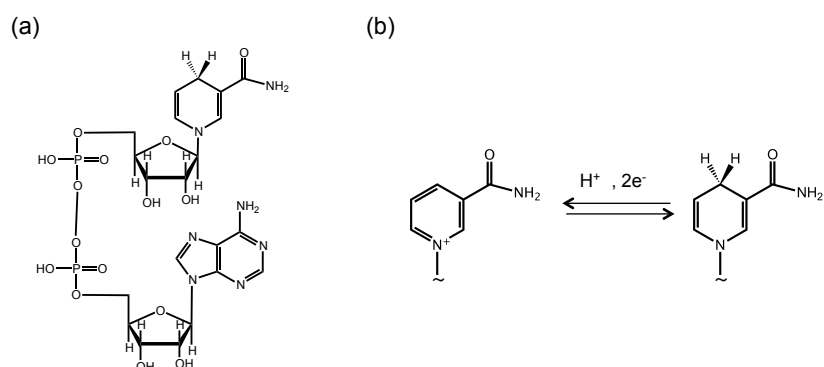


Figure 2-2. (a) NADH の構造および (b) その酸化・還元状態での構造

### 2-1-6. *Escherichia coli* 由来グリセロールデヒドロゲナーゼの酵素学的特性

グリセロールデヒドロゲナーゼ (GLD, EC. 1.1.1.6) は細菌 [26, 27] や酵母 [28, 29]、カビ [30]、哺乳類の細胞 [31] など様々な生物から単離されており、これらはグリセロールの酸化部位と補因子要求性により、3つのクラスに分類される。嫌気性条件下において、多くの微生物はグリセロールを炭素源として利用することが知られている [28, 32]。はじめに作用するのが GLD であり、補因子として  $\text{NAD}^+$  を要し、グリセロールから dihydroxyacetone への酸化反応を触媒する (Figure 2-3)。この際、同時に  $\text{NAD}^+$  は  $\text{NADH}$  へ



と変換される。その後、dihydroxyacetone は dihydroxyacetone kinase によりリン酸化を受け、解糖系へと移行することで更なる分解反応が起こる [33]。

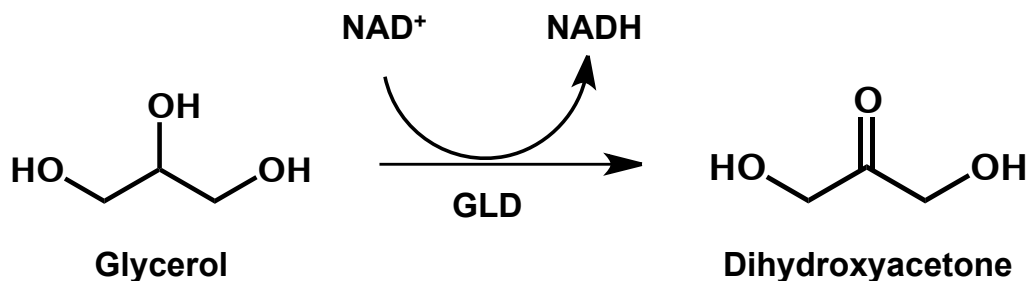


Figure 2-3. GLD によるグリセロールの酸化スキーム

また、大腸菌由来 GLD は、1つのサブユニットに1つの  $\text{Zn}^{2+}$  イオン含み、グリセロールから dihydroxyacetone への触媒反応における至適 pH は 9.5–10.0 である。一方で、pH 7.0 の条件下において、dihydroxyacetone は GLD に対して、グリセロールよりも高い親和性を示すことが報告された [34]。この報告によると、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の条件下において、GLD に対する dihydroxyacetone およびグリセロールの  $K_m$  値はそれぞれ 0.3、56 mM であり、dihydroxyacetone の  $k_{cat}/K_m$  はグリセロールの場合に比べて約 100 倍高いことが示されている。従って、中性付近の pH 条件では、逆反応が優先することが明らかとなっている。

また、大腸菌由来 GLD はこれまで結晶構造が取られておらず、詳細な高次構造は不明ではあるが、既に結晶構造が明らかとなっている *B. stearothermophilus* 由来 GLD (BsGLD) と 49% は一致することが報告されており [35]、大腸菌由来 GLD は BsGLD と近い構造をとっていることが示唆される。BsGLD は 370 アミノ酸残基から構成され、39.5 kDa で、溶液中で八量体をとる。BsGLD については、第4章でさらに詳しく説明する。

## 2-1-7. 本研究の戦略

ここまで紹介してきたように、バイオミネラリゼーションは、無機構造体の調製法における優れた手法である。なかでも、細菌を利用した金属ナノ粒子の合成は、細菌の有する金属イオンに対する解毒性や恒常性を維持するための還元能や集積能を、利用したユニークな手法であり、金イオンやその他の金属イオンのナノ粒子を調製できる新たな手法として注目を集めてきた。さらに、近年では遺伝子組換え大腸菌がバイオミネラリゼーションに利用できることが報告された [17, 18]。大腸菌は、細胞内構成要素を比較的自由に制御可能であることから、今後魅力的なナノ材料の合成系となる可能性がある。しかし、これまでの報告では、Cys を多く含むペプチドやタンパク質を大腸菌に過剰発現させた方法のみであった。

そこで本研究では、酸化還元酵素である GLD を大腸菌内に発現させ、GLD から産出される NADH を還元剤として利用することで、大腸菌内での金ナノ粒子の調製を目的とした (Figure 2-4)。酵素反応から産出される NADH を利用して Au (III) から Au (0) へ還元できることは既に知られており [20]、GLD 酵素反応を利用して金イオンから金ナノ粒子を調製できると考えた。さらに、GLD を大腸菌に発現させることで、大腸菌にバイオミネラリゼーション機能を付与できると考えた。

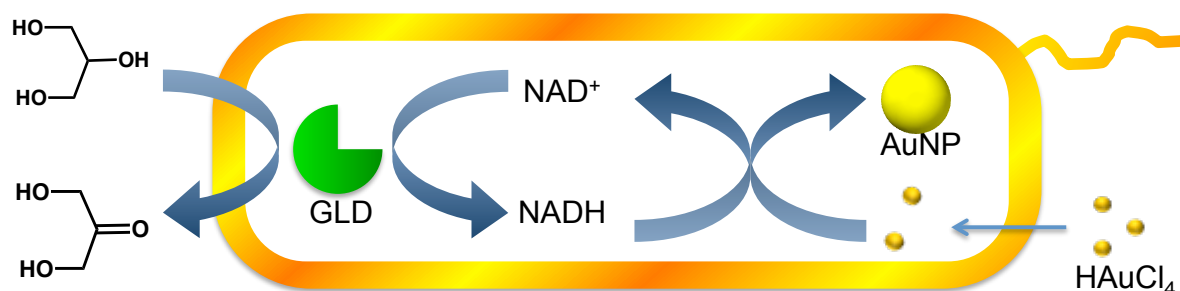


Figure 2-4. 本研究の概念図

[Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

## 2-2. 結果と考察

### 2-2-1. グリセロールデヒドロゲナーゼの発現および精製

精製後の GLD についての SDS-PAGE の結果を Figure 2-5 に示す。結果より、アミノ酸配列から予想される GLD の分子量の位置に単一なバンドが得られたことから、タンパク質の発現および精製に成功した。また、BCA 法による GLD 濃度測定の結果 GLD は 13.3 mg/mL と高濃度で回収できた。

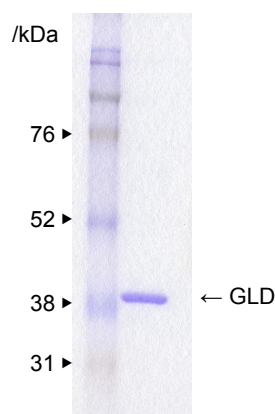


Figure 2-5. SDS PAGE による調製した GLD (39 kDa) の精製確認

[Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

### 2-2-2. グリセロールデヒドロゲナーゼへの緩衝種および pH の影響

まず、GLD による NADH の再生反応の検討を行った。その結果、GLD の基質である Glycerol が系中に無い場合 (ii) や NAD<sup>+</sup>が無い場合 (iii)、GLD が無い場合 (iv) は、NADH の生成に由来する 340 nm の吸光度は増加しなかった(Figure 2-6)。一方で、GLD、Glycerol、NAD<sup>+</sup>が共に系中に存在する場合 (i)、340 nm の吸光度が増加した。この結果より、本実験で調製した GLD による酵素反応により、NAD<sup>+</sup>から NADH へ再生することが確認された。

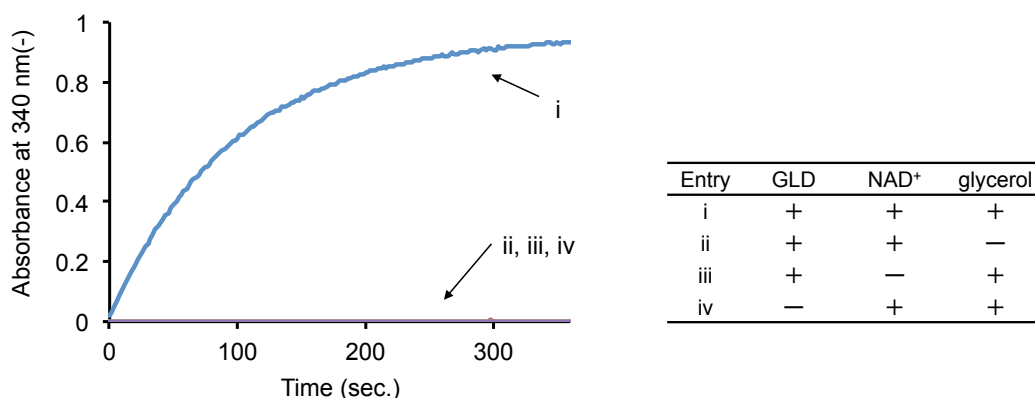


Figure 2-6. GLD 酵素反応による NADH の再生

[Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

酵素反応において、反応溶媒の pH 及び緩衝種は酵素活性に大きな影響を与える因子である。そこで、GLD 反応における pH 及び緩衝種を変化させて、酵素活性に与える影響を評価した。活性測定の結果を Figure 2-7 に、各値を Table 2-1 に示す。緩衝液および pH の違いによって GLD 酵素の活性に違いが見られた。GLD は、Glycine-NaOH 緩衝液 (▲) と炭酸-重炭酸 緩衝液 (●) を用いた pH 10.0–11.0 付近の塩基性条件下で活性が高いことがわかる。一方で、リン酸ナトリウム 緩衝液 (◆)、Tris-HCl 緩衝液 (■) の pH 7.0 付近では活性が低いことが示された。Tris-HCl 緩衝液に関しては pH 9.0, 10.0 においても活性の上昇が見られなかった。このことから GLD の活性は高 pH 領域だけでなく緩衝液の種類によっても変化することがわかった。

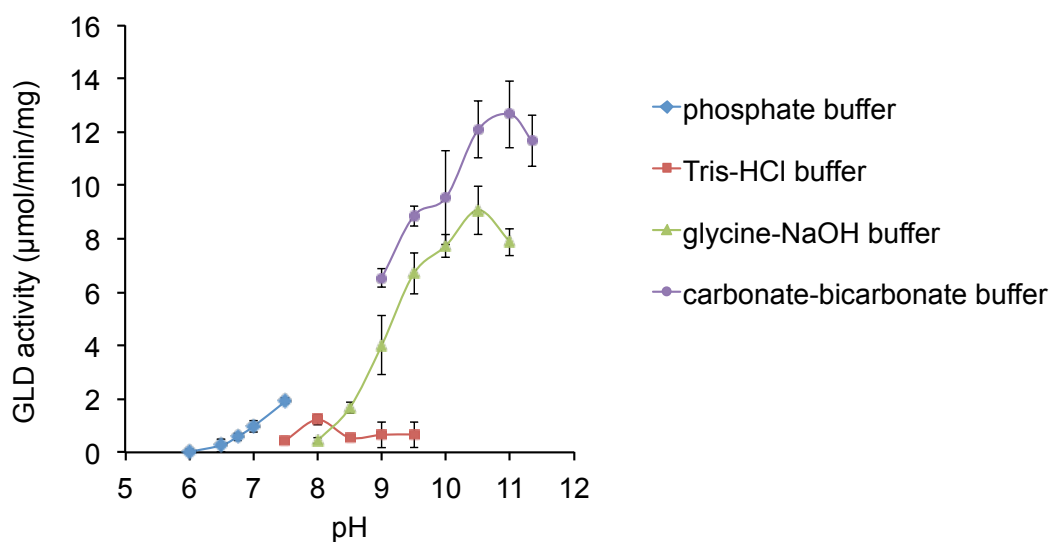


Figure 2-7. GLD 酵素活性の緩衝種および pH の影響

Table 2-1. 各 pH における GLD 活性 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )

Phosphate buffer		Tris-HCl buffer		Gly-NaOH buffer		Carbonate-bicarbonate buffer	
pH	GLD activity	pH	GLD activity	pH	GLD activity	pH	GLD activity
6.0	$0.02 \pm 0.11$	7.5	$0.43 \pm 0.06$	8.0	$0.43 \pm 0.11$	9.0	$6.52 \pm 0.34$
6.5	$0.27 \pm 0.25$	8	$1.22 \pm 0.19$	8.5	$1.67 \pm 0.20$	9.5	$8.86 \pm 0.38$
6.75	$0.58 \pm 0.15$	8.5	$0.55 \pm 0.06$	9.0	$4.01 \pm 1.10$	10.0	$9.55 \pm 1.77$
7.0	$0.97 \pm 0.22$	9	$0.66 \pm 0.49$	9.5	$6.70 \pm 0.77$	10.5	$12.08 \pm 1.06$
7.5	$1.91 \pm 0.11$	9.5	$0.67 \pm 0.49$	10.0	$7.75 \pm 0.44$	11.0	$12.67 \pm 1.25$
				10.5	$9.08 \pm 0.91$	11.34	$11.66 \pm 0.95$
				11.0	$7.88 \pm 0.51$		

### 2-2-3. グリセロールデヒドロゲナーゼによる金ナノ粒子の調製

次に、実際に GLD 酵素反応により金ナノ粒子が調製できるかを評価した。Figure 2-8 に GLD 添加後 24 時間後および 48 時間後の UV/Vis 吸収スペクトル測定結果を示す。24 時間後の吸収スペクトル測定結果より、GLD (1  $\mu\text{M}$ )、 $\text{NAD}^+$  (400  $\mu\text{M}$ )、Glycerol (50 mM) のすべてが溶液中に存在する場合のみ、NADH に由来する 340 nm の吸収と、530 nm に金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴 (SPR) に由来する小さな消失スペクトルが観測された (Figure 2-8a)。さらに、48 時間後では、金ナノ粒子由来の SPR 帯の増加がみられ、溶液が赤く呈色した (Figure 2-8b)。一方で、サンプル (ii)–(iv) は、金ナノ粒子に由来する消失スペクトルが確認されなかった。以上の結果から、GLD、 $\text{NAD}^+$ 、Glycerol すべてが存在する場合でのみ、金ナノ粒子が得られることが示された。よって、本系における金ナノ粒子の生成は、GLD の反応によって生成する NADH が大きく関与していることが考えられ、金ナノ粒子の形成は NADH の再生によって起こることが強く示唆された。

また、グリセロール濃度が半分の 50 mM の場合についても同様にコントロール実験を行った。その結果を Figure 2-9 に示す。グリセロール濃度が 50 mM の場合においても、GLD 酵素反応が進行する場合でのみ、NADH の再生とそれに伴う金ナノ粒子の形成が確認された。また、興味深いことに、今回の 50 mM グリセロールの条件は、100 mM の場合と比べ、NADH および金ナノ粒子に由来するスペクトル強度が低いことが明らかとなった。特に、GLD による NADH の再生は、グリセロール濃度に依存することが示され、最終的に金ナノ粒子の形成速度に影響を与えると考えられる。

Entry	GLD	NAD <sup>+</sup>	Glycerol
i	+	+	+
ii	+	+	-
iii	+	-	+
iv	-	+	+

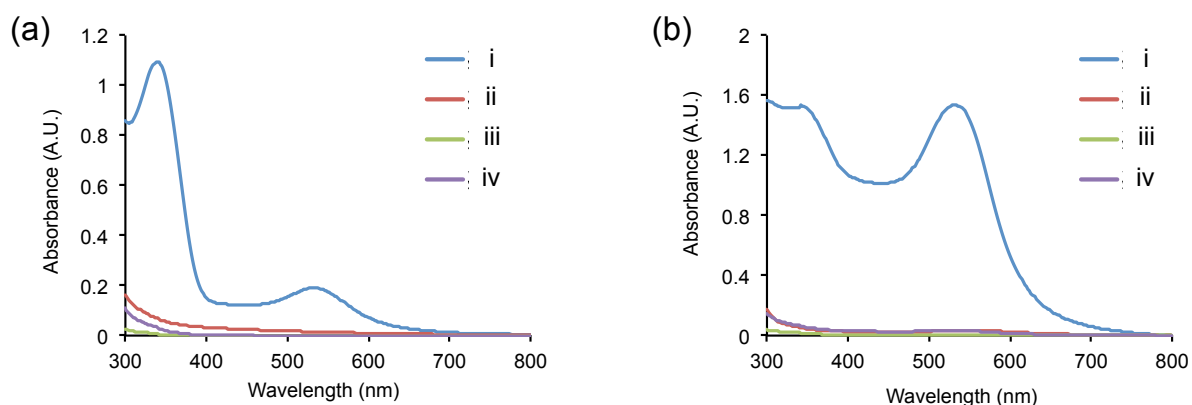


Figure 2-8. 100 mM グリセロールにおける UV/Vis 吸収スペクトル測定結果 (a) 24 時間後、(b) 48 時間後

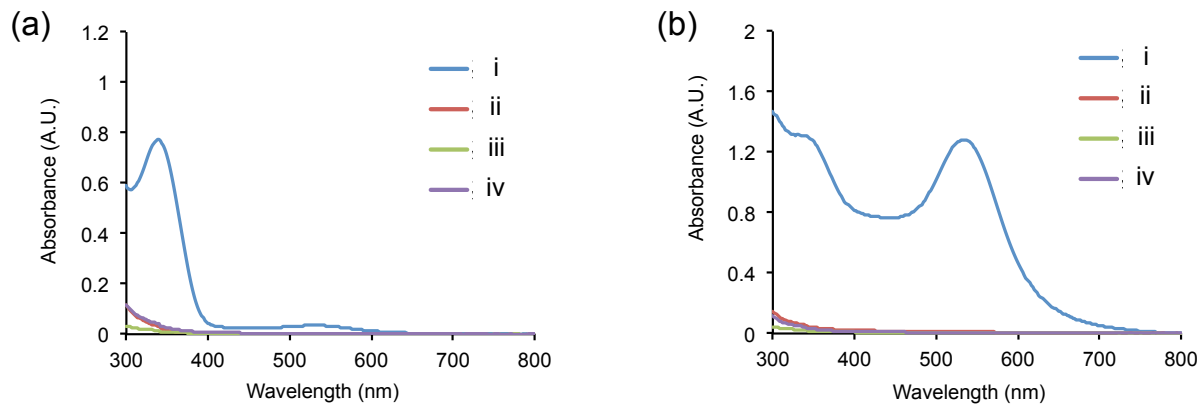


Figure 2-9. 50 mM グリセロールにおける UV/Vis 吸収スペクトル測定結果 (a) 24 時間後、(b) 48 時間後

[Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

次に、グリセロール濃度が金ナノ粒子形成に及ぼす影響について評価した。グリセロール濃度を 0–200 mM と変化させて、24 時間後の金ナノ粒子溶液の UV/Vis 吸収スペクトルを測定した。また、得られた吸収スペクトルから、SPR 帯に由来する 526 nm とグリセロール濃度の関係の評価した。その結果を Figure 2-10 に示す。その結果、金ナノ粒子はグリセロール濃度に依存して表面プラズモン共鳴に由来する吸収の増大が確認された。グリセロール濃度は、グリセロールから直接還元が起こらないと考えられる濃度に設定し

ている。このことから、グリセロール濃度に依存して表面プラズモン共鳴バンドが増加したことは、酵素反応の進行により金ナノ粒子が調製されていることを示唆する結果である。

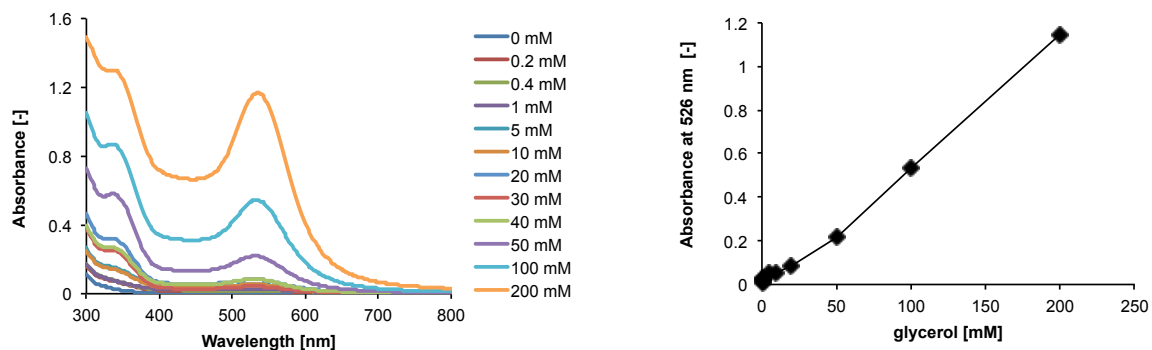


Figure. 2-10. グリセロール濃度が金ナノ粒子形成に与える影響

#### 2-2-4. 調製した金ナノ粒子の評価

得られた金ナノ粒子について、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察および動的光散乱 (DLS) 測定により評価した。GLD 酵素による金イオンの還元反応の開始から 48 時間後の溶液の TEM 像と DLS 測定結果を Figure 2-11 に示す。TEM 像より、粒径約 20 nm の比較的単分散な金ナノ粒子が確認できた。これより、GLD 酵素反応により金ナノ粒子が調製可能であることが TEM 像からも示すことができた。また、DLS 測定結果より、平均粒径が 30.8 nm の粒子であることが明らかとなった。TEM 像と DLS 測定によって得られた平均粒径の差は、金ナノ粒子表面に GLD が被覆されていることを示唆する結果であると考えられる。

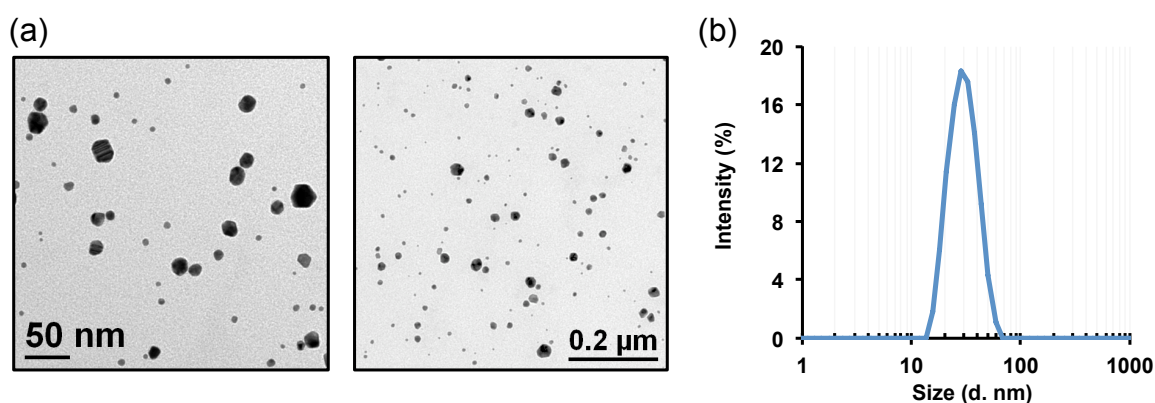


Figure 2-11. 反応開始から 48 時間後の溶液の TEM 像および DLS 測定結果

[Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

次に、TEM 像と DLS 測定によって得られた金ナノ粒子の粒子径について詳細に比較した。GLD 酵素反応によって得られた金ナノ粒子の粒径分布を Figure 2-12 に示す。粒径分布は TEM 像 ( $n = 100$ , Figure 2-11a) と DLS (Figure 2-11b) から求めた。TEM 像から調製された金ナノ粒子はおよそ 4–35 nm の間に広く分布していることがわかった。考えられることは、金表面に強く配位する保護剤が存在しないことが大きな要因であると考えられる。また、核形成が一定ではないために、金ナノ粒子の成長が逐次的に進行し、粒径にばらつきがみられると考察している。TEM 像より算出された金ナノ粒子の平均粒径は  $10.4 \pm 6.4$  nm であった。また、DLS により算出された平均粒径は  $30.8 \pm 0.2$  nm であった。同様のサンプルにもかかわらず平均粒径が一致しなかった要因としては、金ナノ粒子表面には GLD が物理吸着して見かけの粒径が大きくなっていることが考えられる。

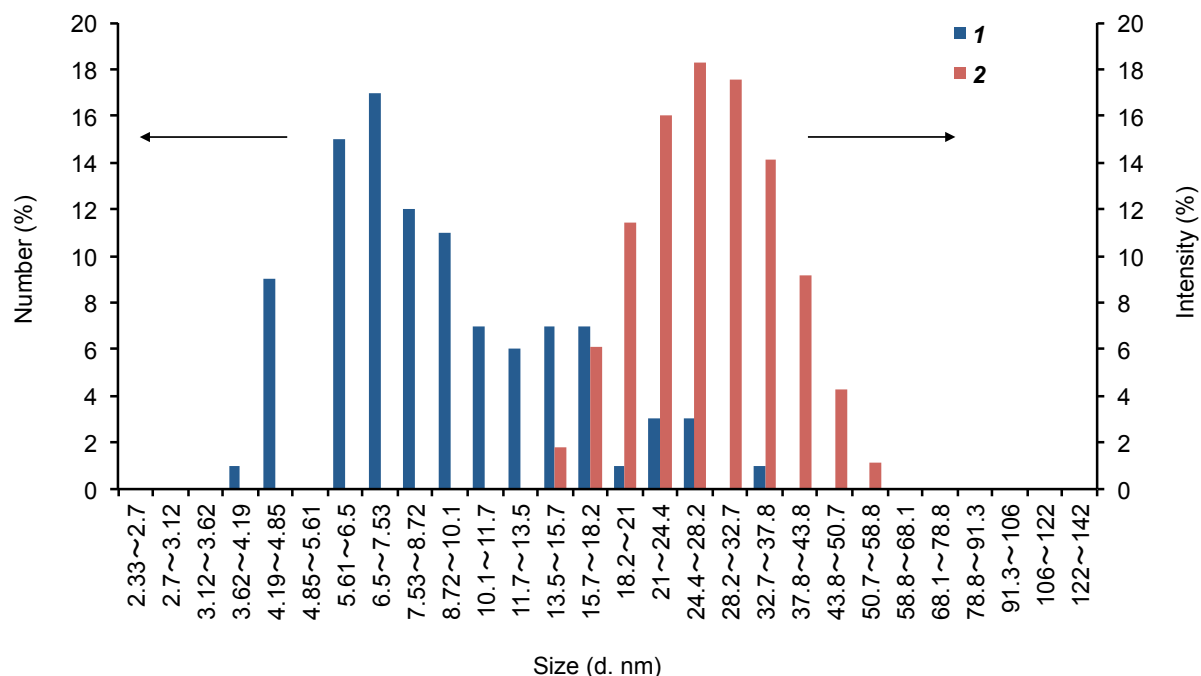


Figure 2-12. TEM と DLS で得られた粒径の比較

[Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

最後に、走査型電子顕微鏡 (SEM) に備え付けられたエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) により、得られた金ナノ粒子の組成分析を行った。今回の SEM 観察においては金などによるスパッタリング処理は行っていない。そのため、得られた SEM 像の輝度の高い部分は導電性である金ナノ粒子と考えられる。得られた SEM 像および EDS 分析結果を Figure 2-13 に示す。その結果、1.5 kV 付近に金原子に由来する強いシグナルを確認することができた。また、その他にも C、N、O、Cl、Cu、Zn などの元素も検出された。C、N、O においては GLD や  $\text{NAD}^+$  や グリシン-NaOH 緩衝液に、Cu と Zn は真鍮製の SEM 試料台 (バックグラウンドは Cu:Zn=60:40) に由来するものであると考えられる。Cl については  $\text{AuCl}_4^-$  に由来



するものと考えられる。また、Naが観察できなかったのは、Znとほぼ同位置に検出されるためにZnのシグナルと重なっていることも考えられる。このことからGLDが金ナノ粒子表面に吸着していることを強く示唆する結果が得られた。

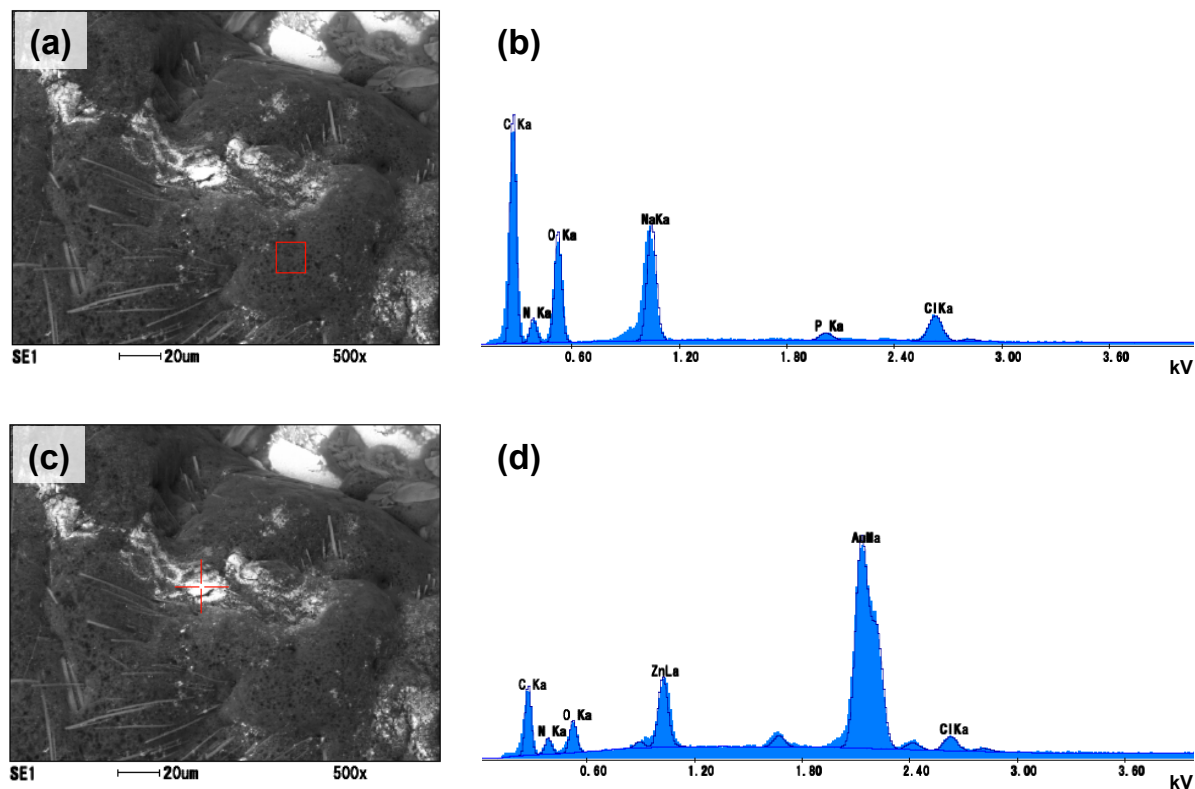


Figure 2-13. SEM-EDXによるGLD酵素反応により調製した金ナノ粒子の元素分析

### 2-2-5. グリセロールデヒドロゲナーゼ発現大腸菌による金ナノ粒子の合成

GLD発現菌体を利用して金ナノ粒子の調製を行った。GLD (1 μM)、 $\text{NAD}^+$  (400 μM)、glycerol (50 mM) を含む 50 mM グリシン NaOH 緩衝液 (pH 9.5) 中に  $\text{HAuCl}_4$  (0.5 mM) を加え十分に攪拌した後、37°C で 48–72 時間静置した。その後、UV/Vis 吸光光度計により溶液の吸収スペクトルを測定した。72 時間後の溶液の様子を Figure 2-14 に、UV/Vis 吸収スペクトルの結果を Figure 2-15 に示す。72 時間後のサンプルにおいて、IPTG、GLD、 $\text{NAD}^+$  が共に存在する場合 (i) において溶液が赤く呈色し、520 nm 付近に金ナノ粒子に由来する表面プラズモン吸収が見られた。さらに IPTG および Glycerol が存在する場合 (iii) においても若干ながら 530 nm 付近の吸収が見られ、金ナノ粒子の生成が確認された。これは大腸菌が本来有する  $\text{NAD}^+$  を利用して反応が進んだことが考えられる。補酵素である  $\text{NAD}^+$  は高価であるため産業利用な際にネックとなる可能性が高い。GLD発現菌体を用いた本システムは細胞内の  $\text{NAD}^+$  を利用できる可能性が示唆され、産業利用の際に有利となり得る。さらに、IPTG を添加していない場合においては、GLD はほとんど発現していないと考えられ、どの場合 (v–viii) においても金ナノ粒子の生成は確認されなかった。

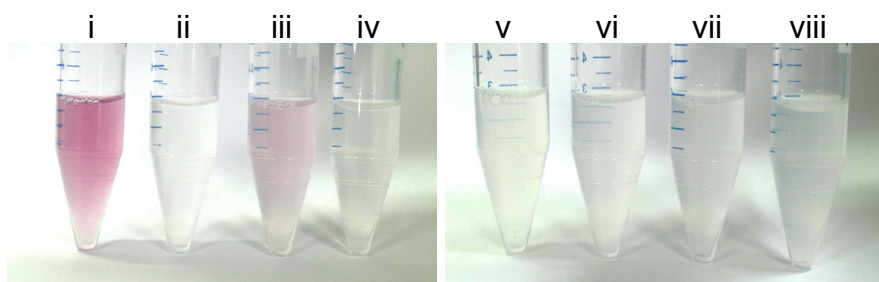
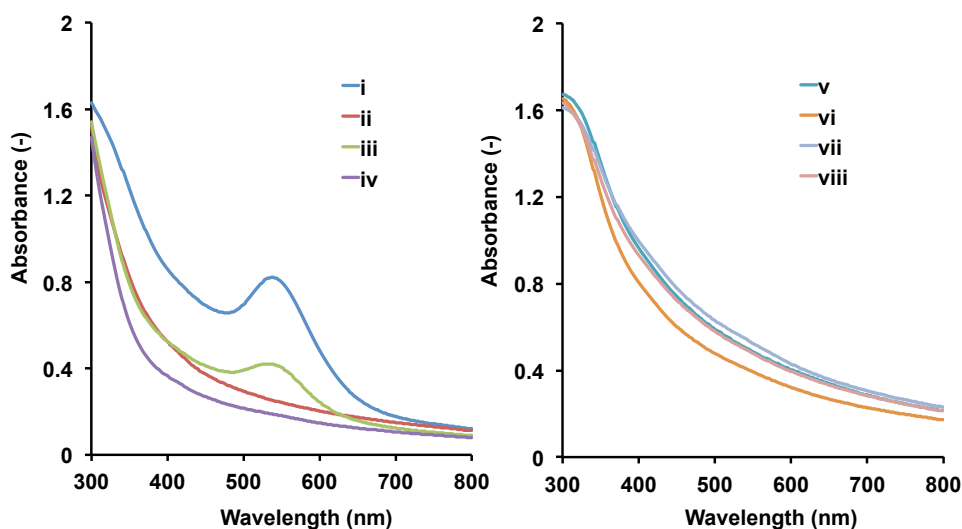


Figure 2-14. 反応開始後 72 時間後の溶液の写真



Sample	i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii
IPTG induction	+	+	+	+	-	-	-	-
NAD <sup>+</sup>	+	+	-	-	+	+	-	-
glycerol	+	-	+	-	+	-	+	-

Figure 2-15. 反応開始後 72 時間後の UV/vis 吸収スペクトル

[Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

#### 2-2-6. 大腸菌細胞触媒により調製した金ナノ粒子の評価

HAuCl<sub>4</sub>の添加から72時間後のサンプル(i)についてTEMにより評価した。その結果をFigure 2-16に示す。大腸菌が黒くなり、大腸菌内部に多くの粒子の存在が確認できる。通常、四酸化オスミウムなどにより染色しなければこのようなコントラストを得ることは難しい。しかし、今回染色無しで明瞭なコントラストが得られているのは内部に金ナノ粒子が形成しているのではないかと考えられる。大腸菌の内容物が漏れたと思われる像の拡大図(Figure 2-16c)から金ナノ粒子の様子が確認できる。以上のことから大腸菌内部で金ナノ粒子の形成を示唆する結果が得られた。

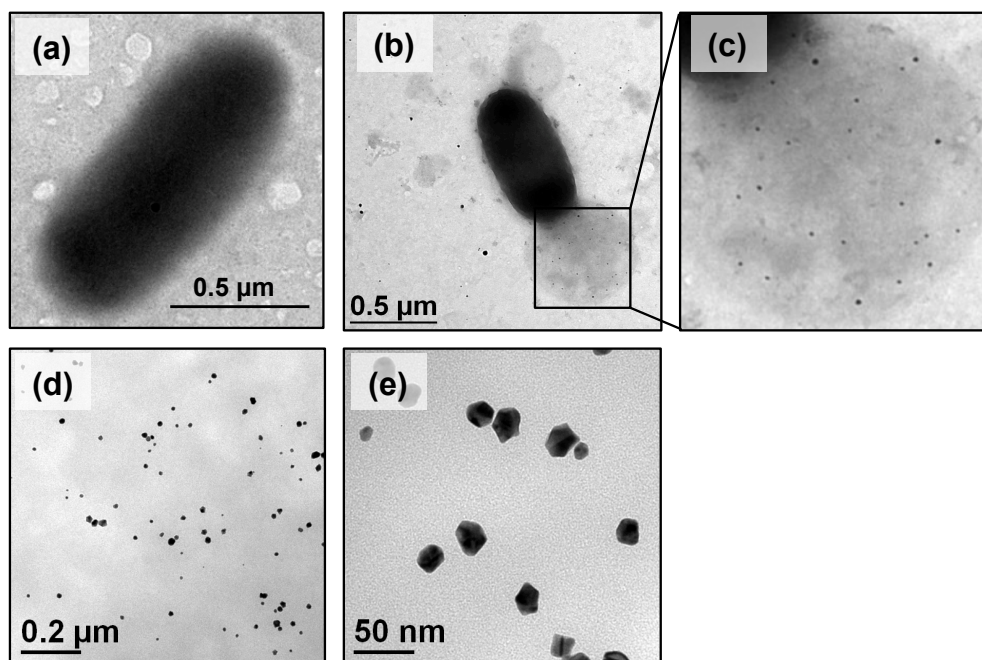


Figure 2-16. GLD 発現菌体により調製した金ナノ粒子の TEM 像、(a, b & c) 破砕前、(d & e) 破砕後  
 [Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

GLD を過剰発現させた大腸菌によって得られた金ナノ粒子の粒径分布を Figure 2-17 に示す。粒径分布は TEM 像 ( $n = 100$ ) から求めた。TEM 像から調製された金ナノ粒子は 7.2–30 nm の間に広く分布していることがわかった。また金ナノ粒子の約 75% が 15 nm 以上であることがわかり、GLD 酵素反応の *in vitro* の系で調製された金ナノ粒子と比較すると、大きなものができるようである。理由は明確ではないが、大腸菌内には様々な生体分子が存在しており、それら分子と金イオンが非特異的な相互作用することで核成長が遅くなり、結果として粒径が大きくなっていると考えている。

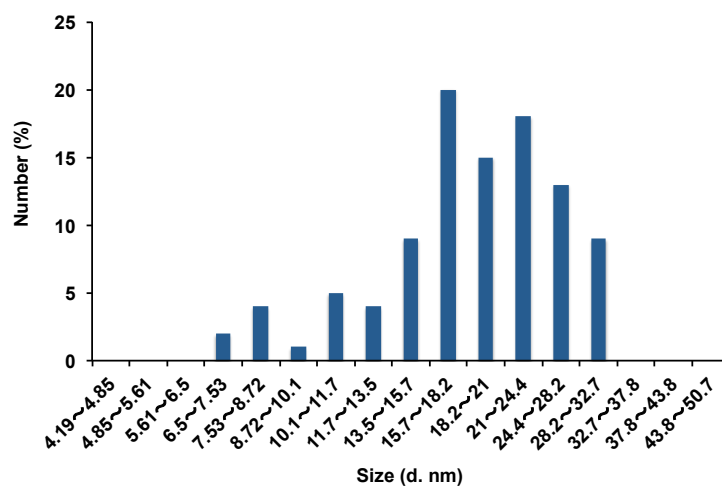


Figure 2-17. GLD 発現菌体により調製した金ナノ粒子の粒径分布

[Reproduced from Chemical Communications, 2011, 47, 7350–7352 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

### 2-3. 結語

本章では以下のことが明らかとなった。

まず、NADH 補酵素再生系を Glycerol dehydrogenase (GLD) で構築した。GLD をコードする発現用のプラスミドベクターは、九州大学農学研究院一瀬博文博士により構築されたものを用いた。GLD を発現用の大腸菌で調製した。その後、アフィニティーカラムにより精製し、これに続く金ナノ粒子の調製へと用いた。その結果、グリセロールおよび  $\text{NAD}^+$  を含む、GLD 酵素が NADH を再生する条件でのみ、金イオンから金ナノ粒子を調製できることが明らかとなった。このことから、NADH が金イオンの還元に関与していることが強く示唆され、酵素反応をトリガーとした金ナノ粒子の調製に成功した。

次に、金イオンはイオン化傾向が小さく、酸性条件以外では特に電子を受け取りやすい。さらには、アルコールを電子供与源として金イオンの還元が起こることから、一般的な金ナノ粒子の調製法にメタノールなどのアルコールが用いられることもある。本研究で用いたグリセロールはヒドロキシル基を3つ有するアルコールであるため、高濃度条件において、金イオンはグリセロールから直接電子を受け取り還元してしまう。本研究においても溶液中に 500 mM のグリセロールが存在する場合には、数十分ほどで直接電子を受け取り、金イオンの還元が起こり、青く凝集した金の凝集体が得られた。本研究で経験的に明らかになったことは、常にフレッシュなグリセロールおよび緩衝液を用い、グリセロール濃度は 100 mM 以下にすることで直接的な還元は起きないことを確かめた。

GLD をコードしたプラスミドを大腸菌へ形質転換し、GLD 酵素を過剰発現させた大腸菌を調製した。この GLD 発現菌体を用いて金ナノ粒子の調製に成功した。さらに、金ナノ粒子は大腸菌内部でできていることが TEM により確認された。これにより大腸菌内で酵素反応に連動した金ナノ粒子の調製が強く示唆され、GLD により大腸菌にバイオミネラリゼーション機能を付加することに成功した。また、GLD とは別のタンパク質を大腸菌内で発現させることで、調製と同時に機能性タンパク質を金ナノ粒子表面へ修飾することができる可能性が示唆された。

このように本章では、酸化還元酵素である大腸菌由来 GLD により、生体内電子伝達系に関与する NADH を再生させ、金ナノ粒子の調製に成功した。さらに、大腸菌でも同様に金ナノ粒子を調製でき、これまで報告されているバイオミネラリゼーションに、NADH が電子供与体として関与していることを示唆する結果が得られた。

## 2-4. 実験操作

## 2-4-1. 試薬

- The plasmid (pET 22b+) in coding in GLD from *Escherichia coli*: 毛利剛博士より提供
- Ni-NTA column (HisTrap HP column 5 mL): GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
- PD-10 column: GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
- Bicinchoninic acid (BCA) assay kit: Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
- Centrifugal filter unit for ultrafiltration (Amicon<sup>®</sup> Ultra): Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
- $\beta$ -nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized form (NAD<sup>+</sup>): Oriental Yeast Co., ltd. (Tokyo, Japan)
- Hydrogen tetrachloroaurate (III) tetrahydrate: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan)
- Cu TEM grid covered by elastic carbon film (20–25 nm), grid pich 100  $\mu$ m: Oken Shoji (Tokyo, Japan)

All other reagents were commercially available, and were of analytical grade.

## 2-4-2. 測定機器

- BioLogic DuoFlow Chromatography System: Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
- UV/Vis spectroscopy: Ubest V-570, JASCO (Tokyo, Japan)
- Transmission electron microscopy (TEM): JEM-2010 instrument, JEOL (Tokyo, Japan)
- Hydrophilization treatment instrument for TEM grid: HDT-400, JEOL (Tokyo, Japan)
- Dynamic light scattering (DLS) instrument: Zetasizer Nano-ZS, Malvern (Worcestershire, UK)
- Atomic absorption spectroscopy (AAS): AA-7000, Shimadzu (Kyoto, Japan)
- Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES): Optima 5300 DV, Perkin Elmer, Inc. (Waltham, MA, USA)

## 2-4-3. グリセロールデヒドロゲナーゼの調製

GLD をコードしたプラスミド DNA は *Escheria coli* BL21 (DE3) 株に形質転換し、100  $\mu$ L/mL のアンピシリンを含む寒天培地でシングルコロニーを単離した。その後、100  $\mu$ L/mL のアンピシリンを含む LB 培地 10 mL に植菌し、37°C で一晩震盪培養を行った。次いで、培地溶液を 100  $\mu$ L/mL のアンピシリンを含む LB 培地 1 L に全て添加し、OD<sub>600</sub> 値が 0.5–0.6 まで 37°C で震盪培養した。次いで、isopropyl  $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度で 0.5 mM となるように培養液へと添加した。IPTG 添加後、15°C、200 rpm、24 時間でタンパク質の発現を行った。その後、菌体を遠心分離 (6,000g、10 min) で集菌し、洗浄バッファー(10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、EDTA 1 mM、pH 8.0) に再分散、遠心分離による回収の操作を 3 回繰り返し、洗浄を行った。洗浄後、再び洗浄バッファー 25 mL に再分散させ、液体窒素で凍結ならびに−80°C で保存した。凍結させた菌懸濁液を溶解させ、氷浴上でソニケーションすることで大腸菌を

破碎した。その後、20,400g、15 min で遠心分離を行い、無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を、0.45 および 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過した。GLD の精製は Ni-NTA カラムにて行った。その際の BioLogic DuoFlow Chromatography System にて 280 nm の吸光度を追跡することでタンパク質の分離を追跡した。精製後のタンパク質は、PD10 カラムにて 20 mM Tris-HCl へとバッファー交換をした。タンパク質の濃度は BCA 法により算出した。また、タンパク質の精製度は、SDS-PAGE にて確認した。

#### 2-2-4. 活性測定

##### 活性測定

酵素反応は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中に、終濃度が 100  $\mu\text{M}$ 、500 mM となるように NAD<sup>+</sup>、glycerol を加え、それらをよく攪拌し、25°C で 5 min 間静置後、1  $\mu\text{M}$  となるように GLD を加え、活性測定を行った。GLD の触媒活性は、反応によって生成する NADH の 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) の吸収を測定することにより評価した。

##### pH 依存性

GLD 反応における pH の影響は、各 50 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0–7.5)、Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5–9.5)、Glycine-NaOH 緩衝液 (pH 8.0–11.0)、炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 9.0–11.3) を用いて評価した。各 50 mM 緩衝液中に、終濃度が 100  $\mu\text{M}$ 、500 mM となるように NAD<sup>+</sup>、glycerol を加え、それらをよく攪拌し、25°C で 5 min 間静置後、1  $\mu\text{M}$  となるように GLD を加え、活性測定を行った。GLD の触媒活性は、反応によって生成する NADH の 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) の吸収を測定することにより評価した。

#### 2-2-5. 金ナノ粒子の調製

##### コントロール実験

NAD<sup>+</sup> (400  $\mu\text{M}$ )、グリセロール (100 mM) が溶解した 50 mM のグリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.5) に対して、GLD を終濃度でそれぞれ 1  $\mu\text{M}$  となるように添加した。次いで、HAuCl<sub>4</sub> 水溶液を 0.5 mM となるように添加し、37°C で 24–48 時間静置することでタンパク質修飾金ナノ粒子を得た。得られた金ナノ粒子溶液は、UV/Vis 吸収スペクトル測定により溶液の吸収スペクトルを測定した。

##### 経時変化測定

GLD (1  $\mu\text{M}$ )、NAD<sup>+</sup> (400  $\mu\text{M}$ )、glycerol (50 mM) を含む 50 mM グリシン NaOH 緩衝液 (pH 9.5) 中に HAuCl<sub>4</sub> (0.5 mM) を加え十分に攪拌した後、37°C で 0–108 時間静置した。その後、UV-vis 吸光度計により溶液の吸収スペクトルを測定した。

### グリセロール濃度依存性

グリセロール濃度が高すぎると、グリセロールのみで金イオンが還元してしまう。そこでまずグリセロールが直接影響を及ぼさない濃度を探索した。その結果、200 mM までは還元が起こらないことが分かった (data not shown)。今回の実験では、その 200 mM を最大としてグリセロール濃度を変化させて金ナノ粒子調製の影響を評価した。

GLD (1  $\mu$ M)、NAD<sup>+</sup> (400  $\mu$ M)、glycerol (100 mM) を含む 50 mM グリシン NaOH 緩衝液 (pH 9.5) 中に HAuCl<sub>4</sub> (0.5 mM) を加え十分に攪拌した後、37°C で 48 時間静置した。その後、UV/Vis 吸光光度計により溶液の吸収スペクトルを測定した。

### 2-2-6. 調製した金ナノ粒子の評価

#### TEM 観察

TEM 観察には炭素が被服された銅製のグリッドを親水化処理したものをを用いた。サンプルをキャスト後、陰圧下で乾燥を行った後、加速電圧 120 kV で TEM 観察を行った。得られた TEM 像より平均粒径を算出した。

#### DLS 測定

Zetasizer Nano-ZS (Malvern 社) を用い、25°C の条件下で動的光散乱測定を行った。

### 2-4-7. グリセロールデヒドロゲナーゼ発現菌体の調製

pET22b-GLD 発現ベクターを、大腸菌 BL21 株へ形質転換し、形質転換体 100  $\mu$ L を 40 mL の LB 液体培地 (アンピシリン (100 mg/L) を含む) にて、前培養を行った。アンピシリン (100 mg/L) を含む LB 液体培地中 (1 L) へ、形質転換体を移し、OD<sub>600</sub> = 0.6 に達するまで 37°C、200 rpm で培養を行い、IPTG を終濃度で 0.5 mM になるように添加した。IPTG 添加後、15°C、200 rpm で 24 時間培養を行った。その後、得られた菌体を遠心分離により集菌し、Tris-HCl (pH 7.4) で 3 回洗浄を行い、再び同緩衝液中に溶菌した。洗浄した菌体を液体窒素により予備乾燥し、凍結乾燥機により 24 時間凍結乾燥することで GLD 発現させた BL21 株の乾燥菌体を得た。これら乾燥菌体は -80°C にて保存した。さらに、陰性対照として、IPTG を添加せず GLD が過剰発現していないものも同時に調製した。調製スキームを Figure 2-18 に示す。

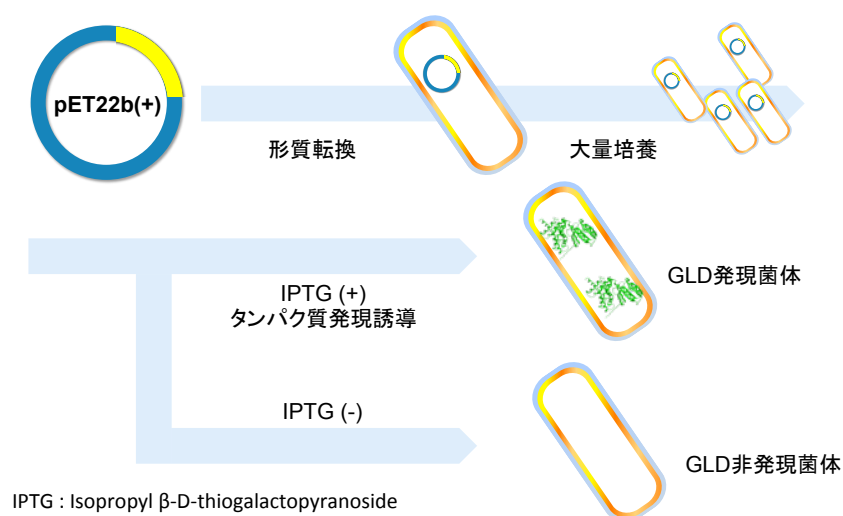


Figure 2-18. GLD 発現菌体の調製スキーム

#### 2-4-8. グリセロールデヒドロゲナーゼ発現大腸菌による金ナノ粒子の合成

GLD 発現菌体により AuNPs の調製を行った。NAD<sup>+</sup> (400 μM)、グリセロール (100 mM) が溶解した 50 mM のグリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.0–10.5) に対して、GLD 発現菌体を終濃度で 1 mg/mL となるように添加した。次いで、HAuCl<sub>4</sub> 水溶液を 0.5 mM となるように添加し、37°C で 72 時間静置した。得られた金ナノ粒子溶液は、UV/Vis 吸収スペクトル測定により評価した。

#### 2-4-9. 大腸菌により調製した金ナノ粒子の評価

大腸菌を超音波破碎前後での TEM 観察を行った。TEM 観察には炭素が被服された銅製のグリッドを親水化処理したものを用いた。サンプルをキャスト後、陰圧下で乾燥を行った後、加速電圧 120 kV で TEM 観察を行った。金ナノ粒子の平均粒径は *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) にて見積もった。



## 2-5. 参考文献

- [1] Mann, S. Molecular Recognition in Biomineralization. *Nature* **1988**, 332, 119–124
- [2] Nudelman, F.; Sommerdijk, N. A. J. M. Biomineralization as an Inspiration for Materials Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6582–6596
- [3] Galloway, J. M.; Bramble, J. P.; Staniland, S. S. Biomimetic Synthesis of Materials for Technology. *Chem.—Eur. J.* **2013**, 19, 8710–8725
- [4] N. Leonardos, N.; Read, B.; Thake, B.; Young, J. R. No Mechanistic Dependence of Photosynthesis on Calcification in the Coccolithophorid *Emiliana Huxleyi*. *J. Phycol.* **2009**, 45, 1046–1051
- [5] P. Y. Chen, P. Y.; Lin, A. Y. M.; Lin, Y. -S.; Seki, Y.; Stokes, A. G.; Peyras, J.; Olevsky, E. A.; Meyers, M. A.; McKittrick, J. Structure and Mechanical Properties of Selected Biomaterials. *J. Mech. Behav. Biomed.* **2008**, 1, 208–226
- [6] Fantner, G. E.; Rabinovich, O.; Schitter, G.; Thurner, P.; Kindt, J. H.; Finch, M. M.; Weaver, J. C.; Golde, L. S.; Morse, D. E.; Lipman, E. A.; Rangelow, I. W.; and Hansma, P. K. Hierarchical Interconnections in the Nano-Composite Material Bone: Fibrillar Cross-Links Resist Fracture on Several Length Scales. *Compos. Sci. Technol.* **2006**, 66, 1205–1211
- [7] Arakaki, A.; Nakazawa, H.; Nemoto, M.; Mori, T.; Matsunaga, T. Formation of Magnetite by Bacteria and Its Application. *J. R. Soc. Interface* **2008**, 5, 977–999
- [8] 渡部哲光、バイオミネラルイゼーション –生物が鉱物を作ることの不思議– **1997**
- [9] Thakkar, K. N.; Mhatre, S. S.; Parikh, R. Y. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles. *Nanomedicine* **2010**, 6, 257–262
- [10] Bansal, V.; Bharde, A.; Ramanathan, R.; Bhargava, S. K. Inorganic Materials Using ‘Unusual’ Microorganisms. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, 179–182, 150–168
- [11] Johnston, C. W.; Wyatt, M. A.; Li, X.; Ibrahim, A.; Shuster, J.; Southam, G.; Magarvey, N. A. Gold Biomineralization by a Metallophore from a Gold-Associated Microbe. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 241–243
- [12] Mukherjee, P.; Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Sainkar, S. R.; Khan, M. I.; Ramani, R.; Parischa, R.; Ajayakumar, P. V.; Alam, M.; Sastry, M., Kumar, R. Bioreduction of  $\text{AuCl}_4^-$  Ions by the Fungus, *Verticillium* sp. and Surface Trapping of the Gold Nanoparticles Formed. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 3585–3588
- [13] K. Kashefi, J. M. Tor, K. P. Nevin, D. R. Lovley, Reductive Precipitation of Gold by Dissimilatory Fe(III)-Reducing Bacteria and Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67, 3275–3279
- [14] Konishi, Y.; Tsukiyama, T.; Ohno, K.; Saitoh, N.; Nomura, T.; Nagamine, S. Intracellular Recovery of Gold by Microbial Reduction of  $\text{AuCl}_4^-$  Ions Using the Anaerobic Bacterium *Shewanella* Algae. *Hydrometallurgy*, **2006**, 81, 24–29
- [15] Lloyd, J. R.; Cole, J. A.; Macaskie, L. E. Reduction and Removal of Heptavalent Technetium from Solution by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1997**, 179, 2014–2021

- [16] Lovley, D. R.; Giovannoni, S. J.; White, D. C.; Champine, J. E.; Phillips, E. J. P.; Gorby, Y. A.; Goodwin, S. *Geobacter-Metallireducens* gen. nov. sp. nov., a Microorganism Capable of Coupling the Complete Oxidation of Organic-Compounds to the Reduction of Iron and Other Metals. *Arch. Microbiol.* **1993**, 159, 336–344
- [17] Kang, S. H.; Bozhilov, K. N.; Myung, N. V.; Mulchandani, A.; Chen, W. Microbial Synthesis of CdS Nanocrystals in Genetically Engineered *E. coli*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5186–5189
- [18] Park, T. J.; Lee, S. Y.; Heo, N. S.; Seo, T. S. In Vivo Synthesis of Diverse Metal Nanoparticles by Recombinant *Escherichia coli*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 7019–7024
- [19] E. ゼフレン、P. L. ホール [著]、田伏岩夫 [訳]、酵素反応機構、学会出版センター **1993**
- [20] Xiao, Y.; Pavlov, V.; Levine, S.; Niazov, T.; Markovitch, G. Willner, I. Catalytic Growth of Au Nanoparticles by NAD(P)H Cofactors: Optical Sensors for NAD(P)<sup>+</sup>-Dependent Biocatalyzed Transformations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4519–4522
- [21] Shlyahovsky, B.; Katz, E.; Xiao, Y.; Pavlov, V.; Willner, I. Optical and Electrochemical Detection of NADH and of NAD<sup>+</sup>-Dependent Biocatalyzed Processes by the Catalytic Deposition of Copper on Gold Nanoparticles. *Small* **2005**, 1, 213–216
- [22] Basnar, B.; Weizmann, Y.; Cheglakov, Z.; Willner, I. Synthesis of Nanowires Using Dip-Pen Nanolithography and Biocatalytic Inks. *Adv. Mater.* **2006**, 18, 713–718
- [23] Pavlov, V.; Xiao, Y.; Willner, I. Inhibition of the Acetylcholine Esterase-Stimulated Growth of Au Nanoparticles: Nanotechnology-Based Sensing of Nerve Gases. *Nano Lett.* **2005**, 5, 649–653
- [24] Zayats, M.; Baron, R.; Popov, I.; Willner, I. Biocatalytic Growth of Au Nanoparticles: From Mechanistic Aspects to Biosensors Design. *Nano Lett.* **2005**, 5, 21–25
- [25] Baron, R.; Zayats, M.; Willner, I. Dopamine-, L-DOPA-, Adrenaline-, and Noradrenaline-Induced Growth of Au Nanoparticles: Assays for the Detection of Neurotransmitters and of Tyrosinase Activity. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1566–1571
- [26] Scharschmidt, M.; Pfeleiderer, G.; Metz, H.; Brummer, W. Isolation and Characterization of Glycerol Dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1983**, 364, 911–921
- [27] Spencer, P.; Bown, K.J.; Scawen, M. D.; Atkinson, T.; Gore, M. G. Isolation and Characterisation of the Glycerol Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 994, 270–279
- [28] May, J.W.; Sloan, J. Glycerol Utilization by *Schizosaccharomyces pombe*: Dehydration as the Initial Step. *J. Gen. Microbiol.* **1981**, 123, 183–185.
- [29] Morgunov, I.G.; Ilchenko, A.P. Isolation, Purification, and Some Properties of Glycerol Dehydrogenase from the Yeast *Candida valida*. *Biochem-Moscow* **1995**, 60, 659–664
- [30] Viswanath-Reddy, M.; Pyle, J.E.; Branch-Howe, H. Purification and Properties of NAD<sup>+</sup>-Linked Glycerol Dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **1978**, 107, 289–296
- [31] Kormann, A.W.; Hurst, R.O.; Flynn, T.G. Purification and Properties of an NADP<sup>+</sup> Dependent Glycerol Dehydrogenase from Rabbit Skeletal Muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 258, 40–55

- [32] Lin, E. C. C. Glycerol Dissimilation and Its Regulation in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1976, 30, 535–578
- [33] Forage, R. G.; Lin, E. C. C. *Dha* System, Mediating Aerobic and Anaerobic Dissimilation of Glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J. Bacteriol.* **1982**, 151, 591–599
- [34] Subedi K. P.; Kim, I.; Kim, J.; Min, B.; Park, C.; Role of GldA in Dihydroxyacetone and Methylglyoxal Metabolism of *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, 279, 180–187
- [35] Ruzheinikov, S. N.; Burke, J.; Sedelnikova, S.; Baker, P. J.; Taylor, R.; Bullough, P. A.; Muir, N. M.; Gore, M. G.; Rice, D. W. Glycerol Dehydrogenase: Structure, Specificity, and Mechanism of a Family III Polyol Dehydrogenase. *Structure* **2001**, 9, 789–802

## 第3章

## 金結合性ペプチドを介したタンパク質被覆金ナノ粒子の合成

## 3-1. 緒言

近年のバイオテクノロジーの発展により、無機材料に特異的に結合するペプチドや核酸を単離・同定することができるようになった。これにより、生体分子と無機材料との界面分野に新たな研究領域を生み出し、バイオナノテクノロジーに新たな展開をもたらした。なかでも、無機材料に対して特異性を有するペプチドは、自然界にみられるバイオミネラリゼーションと密接に関係しており、新たな機能性ナノ構造体の創出につながるものと考えられる。

第2章では、GLD 酵素反応により産出される NADH により金ナノ粒子の調製が可能であることを明らかにした。しかしながら、金ナノ粒子とタンパク質の相互作用については議論しておらず、得られた金ナノ粒子についても特異な機能が付与されているわけではない。そこで本章では、金表面に対して高い親和性を有するペプチドをタグとして用いて、特定のタンパク質が特異的に固定化された金ナノ粒子を、GLD 酵素反応を介して調製することを試みた。

## 3-1-1. 自然界における無機表面を特異的に認識するタンパク質

骨や歯などをはじめとする生体由来の硬組織は、生物の進化の歴史のなかで多様な種類かつ機能を獲得した [1, 2]。過去十年の間に、骨や軟骨 [3-5]、歯 [6, 7]、貝の殻 [8, 9] の形成機構の解明を目指した研究が多くなされ、タンパク質が無機表面と相互作用することで組織が形成されることが次第に明らかとなった [10]。これら硬組織は、少量のタンパク質を含むことが知られている。例えば、真珠貝の貝殻内部には真珠層が存在し、炭酸カルシウムとタンパク質層が交互に積層した構造をとっている。模式図を Figure 3-1 に示す。この構造は、骨格分子としてのキチンと炭酸カルシウム結晶の間に、両者を繋ぐ接着タンパク質が存在し、これにより炭酸カルシウムが積層していることに由来している。このような硬組織形成機構は、真珠以外にもアメリカザリガニの外骨格形成においても、同様の構造で形成されていることが知られている [11]。このように、自然界におけるバイオミネラリゼーションは、タンパク質が無機表面を特異的に認識することや、表面上で自己組織化することにより、制御されていると考えられている [12, 13]。バイオミネラリゼーションは不明な点も多いが、炭酸カルシウムやリン酸カルシウムなどについては、タンパク質と無機材料の関係性が少しずつ明らかとなってきた。このような背景から、研究者はタンパク質の機能に学び、生体分子と無機材料の相互作用を利用することで、ナノレベルで制御された有機-無機ハイブリッド材料を作り出す試みがなされるようになった [14, 15]。自然界において、生物が対象としない金属 (e.g. Au, Ag, Cu, Cd, Se) については、相互作用を示すペプチドやタンパク質はほとんど無いと考えられるため、人為的に取得する必要がある。

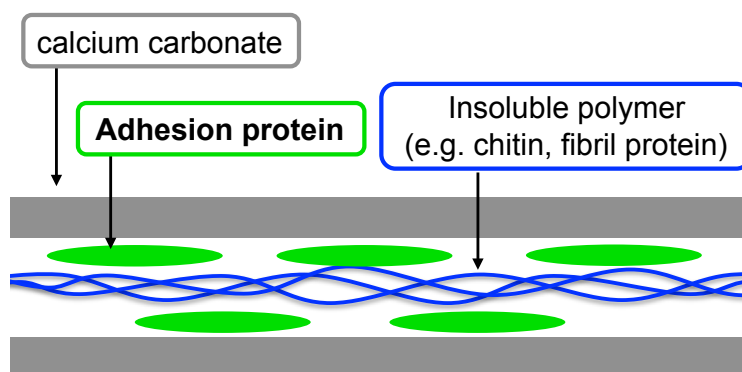


Figure 3-1. 真珠層の模式図

### 3-1-2. 金属表面に親和性を有するペプチドの探索法

本節では、無機物表面に高い親和性を持つペプチドと、その探索法について紹介する。

無機材料に対して親和性を有するペプチドは、一般に静電的相互作用、水素結合、van der Waals 力、疎水性相互作用など、非共有結合の組み合わせで無機表面に結合する。この結合様式は、無機材料とペプチドの電子配置やエントロピー変化で考えることができる。従って、コンピュータを使ったペプチドの合理的なデザインが可能であると考えられるが、これまでペプチドの合理的なデザインは達成されていない。しかし、現在までにそのようなペプチド断片を取得する方法としては、ファージディスプレイ法や細胞表面提示法などの進化分子工学が用いられてきた。進化分子工学とは、ダーウィンの進化論「地球上の生物は突然変異→淘汰→増殖を繰り返してきた」というプロセスを試験管内で行うことで、新規生体高分子の創出や既存の生体高分子の機能最適化を行う手法である [16]。

1992年に S. Brown により  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  に特異的なペプチドが取得された [17]。この論文では、大腸菌表面にランダムなペプチドを提示させ、進化分子工学的手法により、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  特異的に結合するペプチドを取得している。この研究が、進化分子工学を用いた無機材料特異的なペプチド探索の初めての例である。また、2000年には A. M. Belcher により、半導体材料に結合するペプチドが取得された [18]。この論文では、ファージディスプレイ法が用いられ、GaAs (100) に対して選択性のあるペプチドの探索を行っている。本論文では興味深いことに、得られたペプチドが結晶面の選択性も有していることも報告している。この論文以降、ファージディスプレイ法を用いて様々な無機材料に対して特異性を有するペプチドが取得された。以降に、ファージディスプレイ法の概念を示す。

ファージとは、大腸菌に感染するウイルスの総称であるが、特にファージディスプレイ法には繊維状ファージ M13 が用いられる。1985年に G. P. Smith がタンパク質断片をファージ M13 の表面に提示できることを報告し [19]、現在、ファージディスプレイ法として応用されている。このファージは、環状一本鎖 DNA ゲノムを持ち、その外殻を5つのコートタンパク質 (g3p, g6p, g7p, g8p, g9p) がコートした構造を持つ (Figure 3-2a)。ファージゲノムの Gene III の位置にランダムな配列を持った DNA 集団を挿入すると、その翻訳産物であるランダムなペプチド分子が gIII タンパク質と融合した形で発現される。ファージ1分子が

1つの大腸菌に感染し増殖するので、当該大腸菌のクローンから得られるファージは全て同じ配列のペプチドを提示していることになる。そこで、大腸菌を単離してファージゲノムの塩基配列を決定することで、無機材料と親和性のあるペプチド断片を特定することができる。従って、目的の無機表面に対して、ペプチドを提示したファージを結合、洗浄、脱離、増殖の操作を繰り返すことで、無機表面に対して親和性を有するペプチドを同定することができる (Figure 3-2b)。

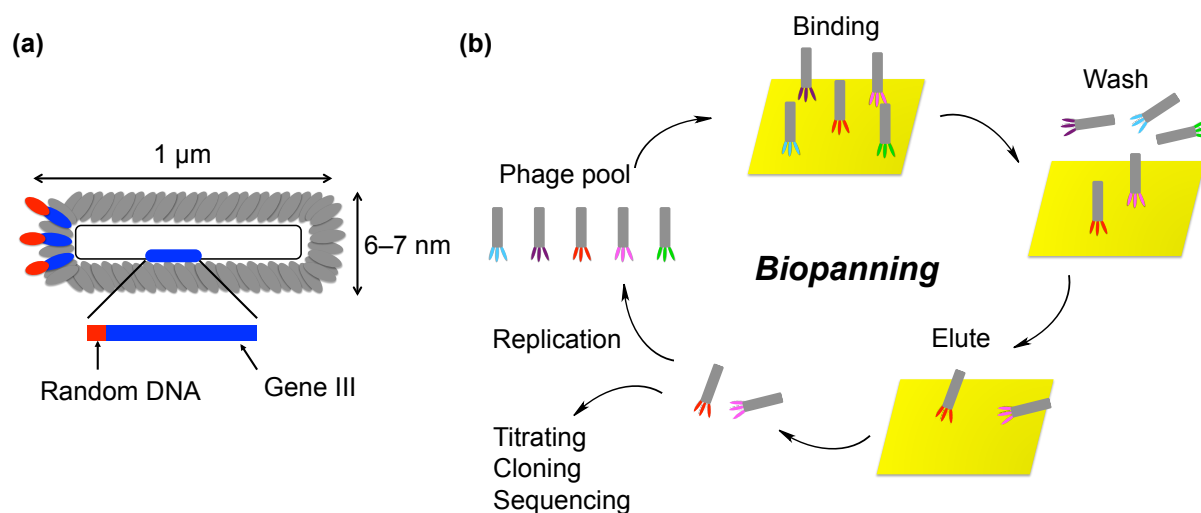


Figure 3-2. (a) ファージの構造、(b) ファージディスプレイ法の概略図

特定の無機表面に対して親和性を有するペプチドは、バイオミネラリゼーションプロセスへと拡張できるものも存在する [20]。

### 3-1-3. 金結合ペプチド

これまでに金表面に対してアフィニティーを有するペプチドの探索も行われてきた。S. Brown は 1997 年に大腸菌表層の LamB タンパク質を基体としたランダムペプチドライブラリーの細胞表層ディスプレイ法により金結合ペプチド (Gold Binding Peptide : GBP1) を取得している [21]。得られた金結合ペプチドをプロテイン A と融合させて、金基盤表面にプロテイン A を固定化させることで、バイオセンサーとしての応用を行っている [22]。2001 年には、金結合ペプチドとビオチン受容体ペプチドを遺伝子工学的に融合し、その後ビオチン修飾をすることで、金結合能とアビジン結合能を有する 2 指向性の融合タンパク質を調製している [23]。この融合タンパク質を用いて、金ナノ粒子とアビジン修飾ポリスチレンビーズを接着するといった、ナノ構造体を意識した実験も行っている。また、GBP1 (MHGKTQATSGTIQS) は SPR 分析により、3 回繰り返した配列のペプチド (3R-GBP1) の方が高い結合能を持つことが明らかとなっている [24]。その論文の中で、3R-GBP1 の結合定数は  $K_a = 10^{-7} \text{M}^{-1}$  (抗体-抗原の結合定数  $K_a = 10^7 - 10^9 \text{M}^{-1}$ )、結合エネルギーは  $-8.0 \text{ kcal/mol}$  と非常に高いアフィニティーを持つことが明らかとなった。また、最近では

原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、3R-GBP1 の金基盤 Au(111) への吸着後の様子が明らかとなった [25]。GBP1 は吸着後、金基盤表面上を拡散して、最終的には GBP 同士で自己集合することが確認されている。

また、2002 年に R. R. Naik らの研究グループがフェージデジスプレイ法により銀表面に対してアフィニティーを持つペプチド (A3 ペプチド: AYSSGAPPMPFF) を取得した [26]。この A3 ペプチドは、銀ナノ粒子のある特定の結晶面に強く結合することができ、銀ナノクラスターから銀ナノプレートへ異方成長させることができる。また興味深いことに、A3 ペプチドは金に対しても高いアフィニティーを有することも明らかとなった [27]。さらに、A3 ペプチドは HEPES 緩衝液中で単分散な金ナノ粒子を調製することが可能であることも示された [28]。HEPES は金イオンの還元剤として働く [29–31]。近年では、金表面の結合を理解するために、シミュレーションによる解析も行われている [32, 33]。モンテカルロ・シミュレーションにより、金基盤表面への A3 ペプチドの吸着と脱着を模擬実験している [32]。その結果、A3 ペプチドのどのアミノ酸残基も金基盤表面に近接することが明らかとなった。これより金基盤と A3 ペプチドとの相互作用は非常に強いことが見積もられた。

その他にもいくつか金結合ペプチドは報告されているので以下に纏める (Table 3-1)。

Table 3-1. 金結合ペプチドのアミノ酸配列

Peptide	Amino acid sequence	Ref.
GBP <sub>1</sub>	MHGKTQATSGTIQS	21
3R-GBP <sub>1</sub>	(MHGKTQATSGTIQS) <sub>3</sub>	24, 25, 38
AuBP1	WAGAKRLVLRRE	39
AuBP2	WALRRSIRRQSY	39
A3	AYSSGAPPMPFF	26–28, 32, 33
Flg	DYKDDDDK	32, 40

タンパク質を基盤に固定化することは、プロテインチップやプロテインマイクロアレイ、バイオセンサーといった重要な技術であり、盛んに研究がおこなわれている。一般的には、チオールやシランなどを介して共有結合的に結合させることが多い。そのため、タンパク質のコンフォメーション変化や活性の低下などが懸念され、特定の基盤特異的に且つ部位特異的な固定化の達成が課題である。これは、金属ナノ粒子とタンパク質の固定化も同様である。この課題に対して、アフィニティーペプチドを介した固定法が近年着目され、様々な分野に利用されている [34–36]。金結合ペプチドに関しては、アルカリフォスファターゼ (AP) の N 末端に 5R-GBP1 ペプチドを遺伝子工学的に融合し、金基盤への固定化を行っている [37]。それによると、ペプチドタグ無しの AP に比べて高い固定化率と活性を維持することができた。これより、金基盤に対してペプチドタグ選択的な吸着が起こり、AP の配向性を制御した固定化が達成できていると考えられる。

### 3-1-4. バイオテンプレートを用いた金ナノ粒子の調製法

一般に、タンパク質修飾金ナノ粒子は多段階の操作が必要である。具体的には、保護剤と還元剤を用い金イオンから金ナノ粒子を調製後、静電的相互作用や化学結合法により目的のタンパク質を金ナノ粒子表面へ固定化する。詳細な固定化手法については、第1章を参照にされたい。しかしながら、これらの手法ではタンパク質の配向性を制御できないことや、官能基選択的な化学結合によるタンパク質の機能損失が懸念される。

そこで近年、従来の手法に代わる、ペプチドやタンパク質、核酸などの生体分子をバイオテンプレートとした金属ナノ粒子調製法が注目されている [41–44]。この手法は、生体分子の金属表面との相互作用を利用したものであり、温和な反応条件で金属ナノ粒子を調製することができる。さらに、金属表面にアフィニティーを有する生体分子を用いているため、得られた金属ナノ粒子表面には生体分子がに固定化されており、固定化操作が不要となる。金ナノ粒子に関しては、ヒスチジンリッチペプチド (AHHAHHAAD) [45, 46] や poly(L-lysine) [47] をバイオテンプレートとして用いることで金ナノ粒子を調製できることが報告されている。しかしながら、ヒスチジンリッチペプチドでは、クエン酸や水素化ホウ素ナトリウムなどの生体分子には強い還元剤が必要なことや、poly(L-lysine) では高い温度により核形成と金ナノ粒子の成長を行うが必要である。最近では、His<sub>6</sub>Cys<sub>3</sub> ペプチドをプロテイン A の C 末端に遺伝子工学的に導入したタンパク質を用いてプロテイン A 修飾金ナノ粒子のワンポット合成が可能であることが報告された [48]。しかしながら、この場合も還元剤として水素化ホウ素ナトリウムが必要である。また、R. R. Naik らが同定した A3 ペプチドもまた金ナノ粒子の合成に利用することができる [26, 28]。A3 ペプチドは、HEPES を還元剤とした金ナノ粒子合成において、効果的な金ナノ粒子の保護剤として働く [49–52]。また、K. Shimojo らによって HEPES 緩衝液を用い、ZZ ドメイン固定化金ナノ粒子のワンポット合成も報告されている [53]。



## 3-1-4. 本研究の戦略

本章は、GLD 酵素反応と金結合ペプチド融合タンパク質を利用し、タンパク質修飾金ナノ粒子の一段階合成の開発を目的とする。バイオテクノロジー分野において、金ナノ粒子は生体分子と複合化して用いられることが多く、その調製法は多段階操作と生体分子の配向の制御が困難なため、生体分子の機能損失が問題となっている。近年、生体分子をバイオテンプレートとした金ナノ粒子調製法が報告されているが [45–48]、高温条件や還元剤として水素化ホウ素ナトリウムが必要といった生体分子には過酷な条件が必要となっている。本論文の第2章において、GLD 酵素反応から産出される NADH を還元剤として用いることで、酵素反応依存的な金ナノ粒子の調製を報告した。

そこで、GLD 酵素反応で金ナノ粒子を調製できるこれまでの結果を元に、GLD と金結合ペプチドを融合した機能性タンパク質を組み合わせることで、生体触媒反応によるタンパク質修飾金ナノ粒子の一段階合成が達成できるのではないかと考えた (Figure 3-3)。モデルタンパク質として、抗体の Fc 部位に特異的に結合するプロテイン G およびプロテイン A を、金結合ペプチドとして A3 ペプチドを選択した。これらを遺伝子工学的手法により融合することで目的とする機能性タンパク質を調製した。機能性タンパク質の詳細な構造は、3-2-1 節で説明する。

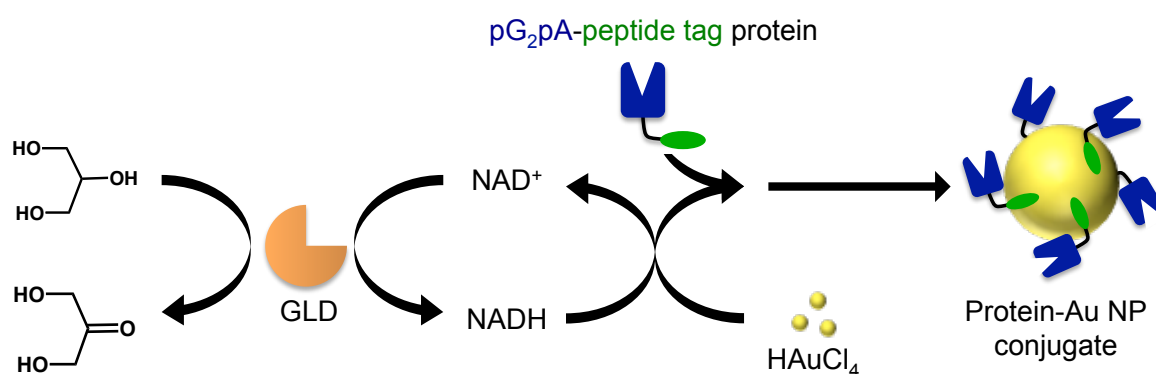


Figure 3-3. GLD 酵素反応をトリガーとしたタンパク質金ナノ粒子調製戦略

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, 29, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

## 3-2. 結果と考察

## 3-2-1. 金表面および抗体への結合能を有する機能性タンパク質のデザインと調製

機能性のモデルタンパク質として3つの異なる機能を有するタンパク質1をデザインした (Figure 3-4a)。タンパク質1は、精製用のタグとしてヘキサヒスチジンタグ (His タグ) およびグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、抗体結合ドメインとしてプロテイン G およびプロテイン A、金結合ペプチドとして A3 ペプチドから構成される。抗体結合ドメインの構造は、プロテイン G の B1 および B2 ドメイン、プロテイン A の B ドメインを直列に繋いだ B1-B2-B となるようにデザインとした。これは、B1 ドメイン単独の場合の解離定数  $K_d$  は、およそ 100 nM なのに対して B1-B2 ドメインでは 23–32 nM と結合能が上昇することが報告されていること [54]、さらにプロテイン A とプロテイン G では抗体に対する結合特性が異なることから、より強固で幅広い抗体に対応できる抗体結合性タンパク質を目指したものである。加えて、Maeda らの報告より、プロテイン G とルシフェラーゼとを GGGG リンカーを介して融合させたキメラタンパク質は、プロテイン G のフォールディングがうまく起こらないためか、抗体結合能を示さないが、プロテイン A をプロテイン G とルシフェラーゼ間に導入することで抗体結合能を示すことが報告されており [55]、プロテイン G と金結合ペプチド間にプロテイン A を導入することで、抗体結合能と金結合能を損なわずに機能させることができるのではないかと考えた。

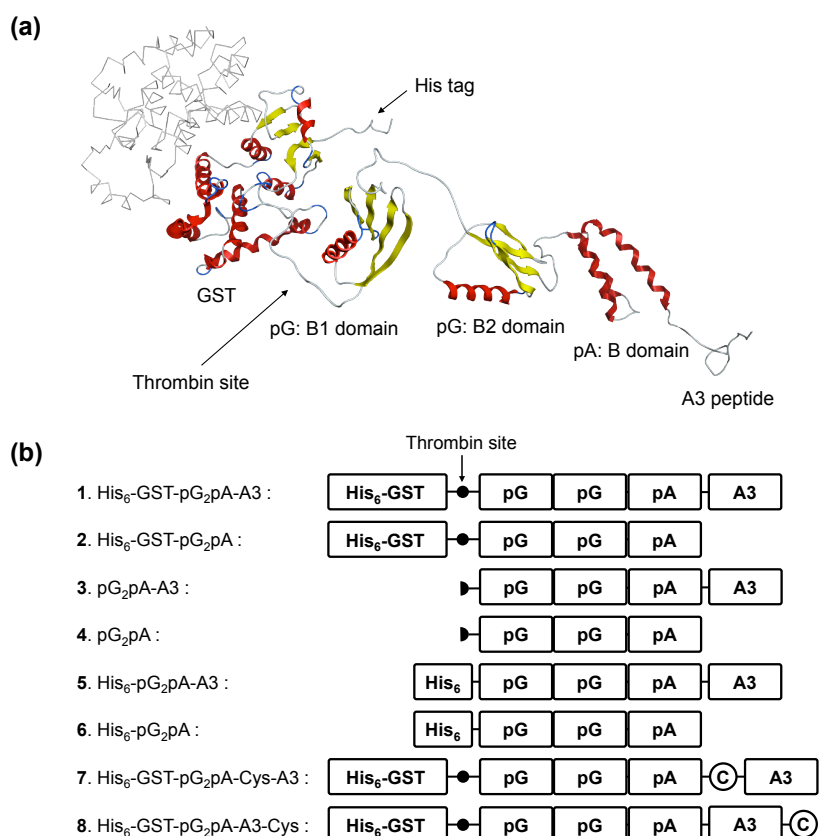


Figure 3-4. pG<sub>2</sub>pA タンパク質の構造 (a) タンパク質1の三次元リボン構造モデル、

(b) 本研究で調製した pG<sub>2</sub>pA タンパク質 1–8 の構造

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, 29, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

さらに、機能的タンパク質の各ドメインの影響を検討するために、 $\Delta A3$  ペプチドであるタンパク質 **2**、**4**、**6**、および  $\Delta His_6$ -GST であるタンパク質 **3**、**4**、 $\Delta GST$  であるタンパク質 **5**、**6** も調製して以下の実験に用いた (Figure 3-4b)。加えて、タンパク質 **1** に対して、プロテイン A と A3 ペプチド間にシステインを導入した融合タンパク質 (**7**)、C 末端にシステインを導入した融合タンパク質 (**8**) も調製した。各 pG<sub>2</sub>pA タンパク質 **1-8** の精製度と分子量は、SDS-PAGE によって確認した (Figure 3-5)。その結果、理論分子量と一致するバンドが確認されたことから、組換えタンパク質の調製に成功した。

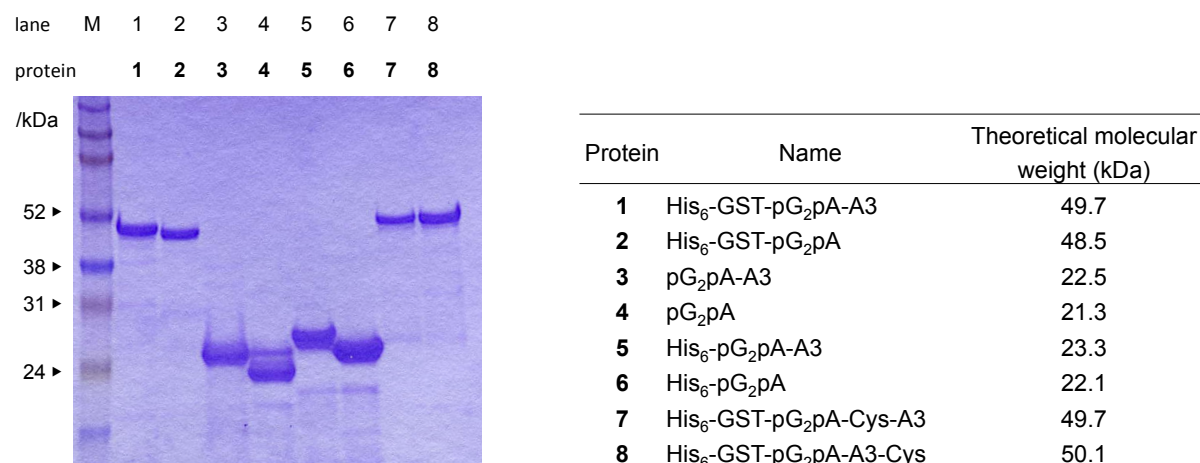


Figure 3-5. pG<sub>2</sub>pA タンパク質の SDS-PAGE 分析

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, **29**, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

### 3-2-2. 機能的タンパク質存在下での金ナノ粒子の調製

まず、各 pG<sub>2</sub>pA タンパク質 **1-6** 共存下において、GLD 酵素反応を介した NADH の再生により金ナノ粒子が合成されるか否かを評価した。GLD (0.2 μM)、pG<sub>2</sub>pA (2 μM)、NAD<sup>+</sup> (400 μM)、グリセロール (100 mM) が溶解した 50 mM グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.5) に HAuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> (0.5 mM) を加え十分に攪拌した後、37°C で 24-48 時間静置し、金ナノ粒子の合成を行った。その後、溶液の様子を確認および UV/Vis 吸光度計により金ナノ粒子の形成を評価した。

反応開始から 24 時間後と 48 時間後の UV/Vis 吸収スペクトルの測定結果および溶液の様子を Figure 3-6、3-7 にそれぞれ示す。pG<sub>2</sub>pA タンパク質を添加していないサンプル **0** では、551 nm に強い吸収を示し、溶液は紫色に呈色した (Figure 3-6-0)。第 2 章で示したこれまでの研究と同様に pG<sub>2</sub>pA が存在していない状況で異なる結果が得られたのは、反応溶液中の GLD 濃度が 5 分の 1 と低いいため、金ナノ粒子の形成とその表面の安定性に影響を与えたためであると考えられる。

タンパク質 **1** を加えたサンプルにおいて、反応開始から 24 時間後では溶液は赤く呈色し、531 nm に分散した金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴 (SPR) 帯に由来する吸収が確認された (Figure 3-6-1)。一方で、タンパク質 **2** を添加したサンプルでは、24 時間後において、金ナノ粒子に由来する SPR 帯は確認されな

かった (Figure 3-6-2)。48時間後では、547 nm に弱い吸収が確認され、溶液は紫色へと変化した (Figure 3-7-2)。このスペクトルと溶液の色は、金ナノ粒子の凝集に由来するものである [56]。この結果より、タンパク質 **2** を加えたサンプルでは、タンパク質 **1** と比べて金ナノ粒子の形成に時間がかかること、さらに形成された金ナノ粒子は凝集体であることが明らかとなった。

次に、異なる構造を有するタンパク質 **3-6** をもちいて、タンパク質の各部分が金ナノ粒子の形成に及ぼす影響を評価した。その結果、全てのサンプルにおいて、溶液は赤く呈色し、分散した金ナノ粒子に特徴的な SPR 帯が確認された。タンパク質 **2** と **6** のサンプルの比較から、His-tag は金ナノ粒子の形成を阻害しないことが示唆された (Figure 3-6, 3-7)。一方、A3 ペプチドの有無によらず、タンパク質 **2** を除く全てのサンプルで金ナノ粒子の形成が確認された。タンパク質 **2** が存在する溶液において、金ナノ粒子の形成が阻害された原因は不明であるが、タンパク質 **1** の存在下では金ナノ粒子の形成が見られたことから、A3 ペプチドは金ナノ粒子の形成を促進していることが示唆された。金ナノ粒子の形成メカニズムは、複雑な因子を含んでいると考えられ、各セグメントの寄与だけでなく、タンパク質全体の構造を考慮する必要があることが示唆された。

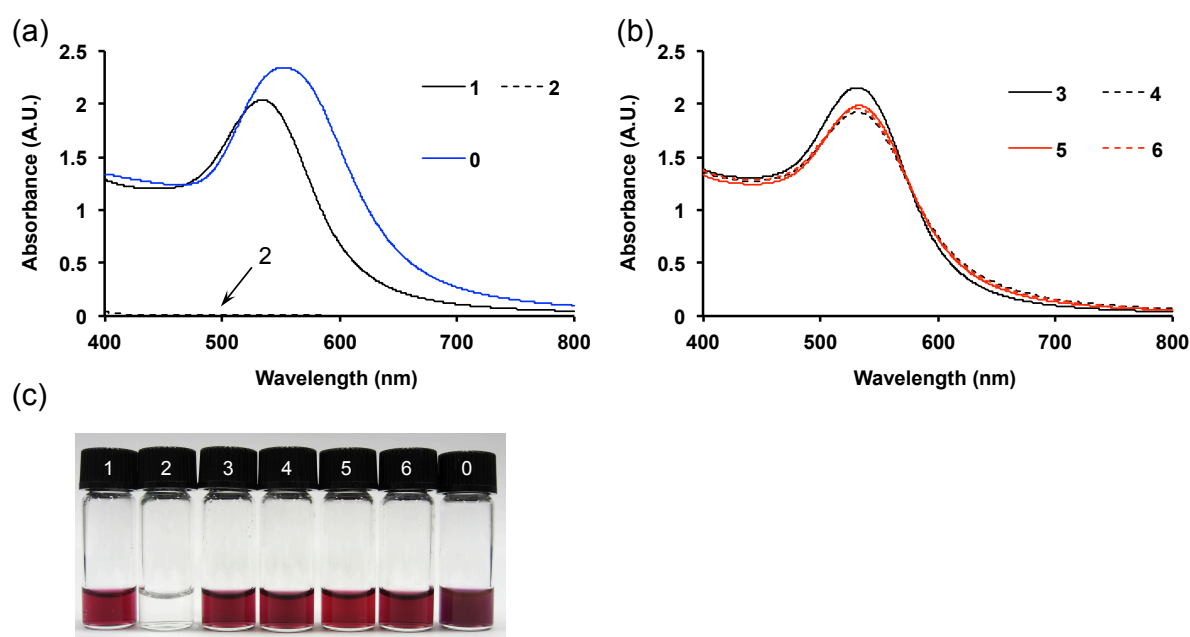


Figure 3-6. (a), (b) 反応開始から 24 時間後の pG<sub>2</sub>pA-Au NP 複合体の UV/Vis 吸収スペクトル、  
(c) 24 時間後の金ナノ粒子溶液の様子、1-6: in the presence of protein 1-6, 0: without pG<sub>2</sub>pA protein.

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, **29**, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

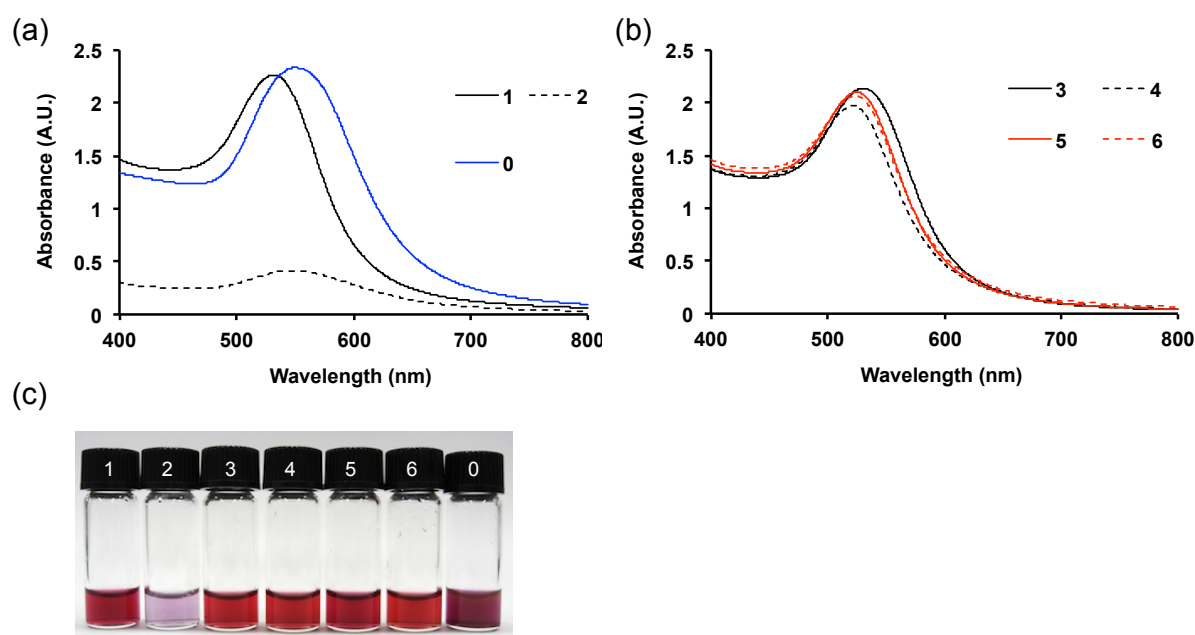


Figure 3-7. (a), (b) 反応開始から 48 時間後の pG<sub>2</sub>pA-Au NP 複合体の UV/Vis 吸収スペクトル、  
(c) 48 時間後の金ナノ粒子溶液の様子、1-6: in the presence of protein 1-6, 0: without pG<sub>2</sub>pA protein.

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, 29, 15596– 15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

### 3-2-3. 形状観察および溶液中における金ナノ粒子の安定性の評価

各 pG<sub>2</sub>pA 共存下において GLD 酵素反応により調製した金ナノ粒子を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて評価した。Figure 3-8 に得られた金ナノ粒子の TEM 像を示す。Figure 3-8-1 より、タンパク質 1 を用いて調製したサンプルは、平均粒径が  $10.3 \pm 7.8$  nm ( $n=259$ ) の金ナノ粒子であることが示された。タンパク質 2 を用いたサンプルは、金ナノ粒子が凝集している様子が観察された (Figure 3-8-2)。 $\Delta$ His<sub>6</sub>-GST であるタンパク質 3、4 を比較すると、タンパク質 3 を用いて調製した金ナノ粒子は、 $\Delta$ A3 であるタンパク質 4 によって調製されたものよりも、良く分散した像が観察された (Figure 3-8-3, 4)。さらに、 $\Delta$ A3 であるタンパク質 4 は、タンパク質 3 と比べ、溶液中のイオン強度の影響を受けやすいことが明らかとなった (Figure 3-9-3, 4)。この結果は、タンパク質に導入された A3 ペプチドが金ナノ粒子表面に相互作用することで、溶液分散を助けていることを示唆する結果である。興味深いことに、 $\Delta$ GST のタンパク質 5、6 に関しては、TEM 像観察およびイオン強度依存性試験において、A3 ペプチド有無による差異は見られなかった (Figure 3-8-3, 4, Figure 3-9-3, 4)。以上の結果から、His-tag が金ナノ粒子の形成と溶液中での分散に寄与していることが示唆された。以上より、A3 ペプチドおよび His-tag が融合された pG<sub>2</sub>pA タンパク質は、金ナノ粒子の凝集を抑制することができることが明らかとなった。

pG<sub>2</sub>pA タンパク質非共存下で調製した金ナノ粒子は、粒径が大きく、粒子の凝集が確認された (Figure 3-8-0)。第二章で示した結果では、GLD が金ナノ粒子表面に結合して表面を安定させていることを述べた

が、GLD濃度が $0.2\ \mu\text{M}$ と低い今回の条件では(第2章では $1\ \mu\text{M}$ )、金ナノ粒子表面を十分に被覆できず、粒径の増大と分散安定性の低下につながったものと考えられる。

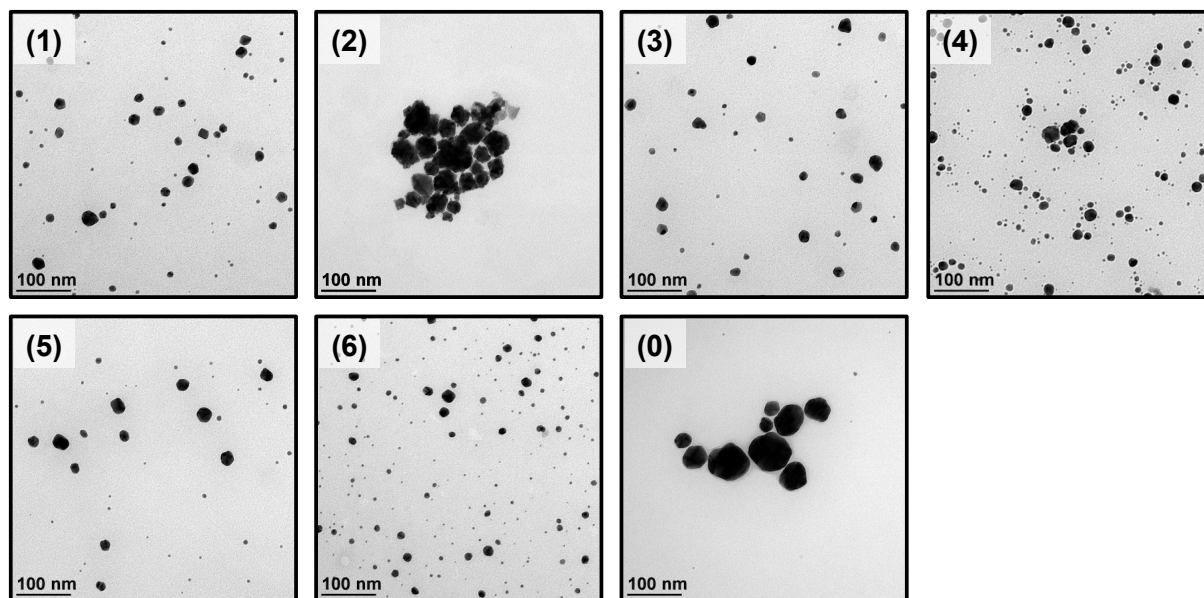
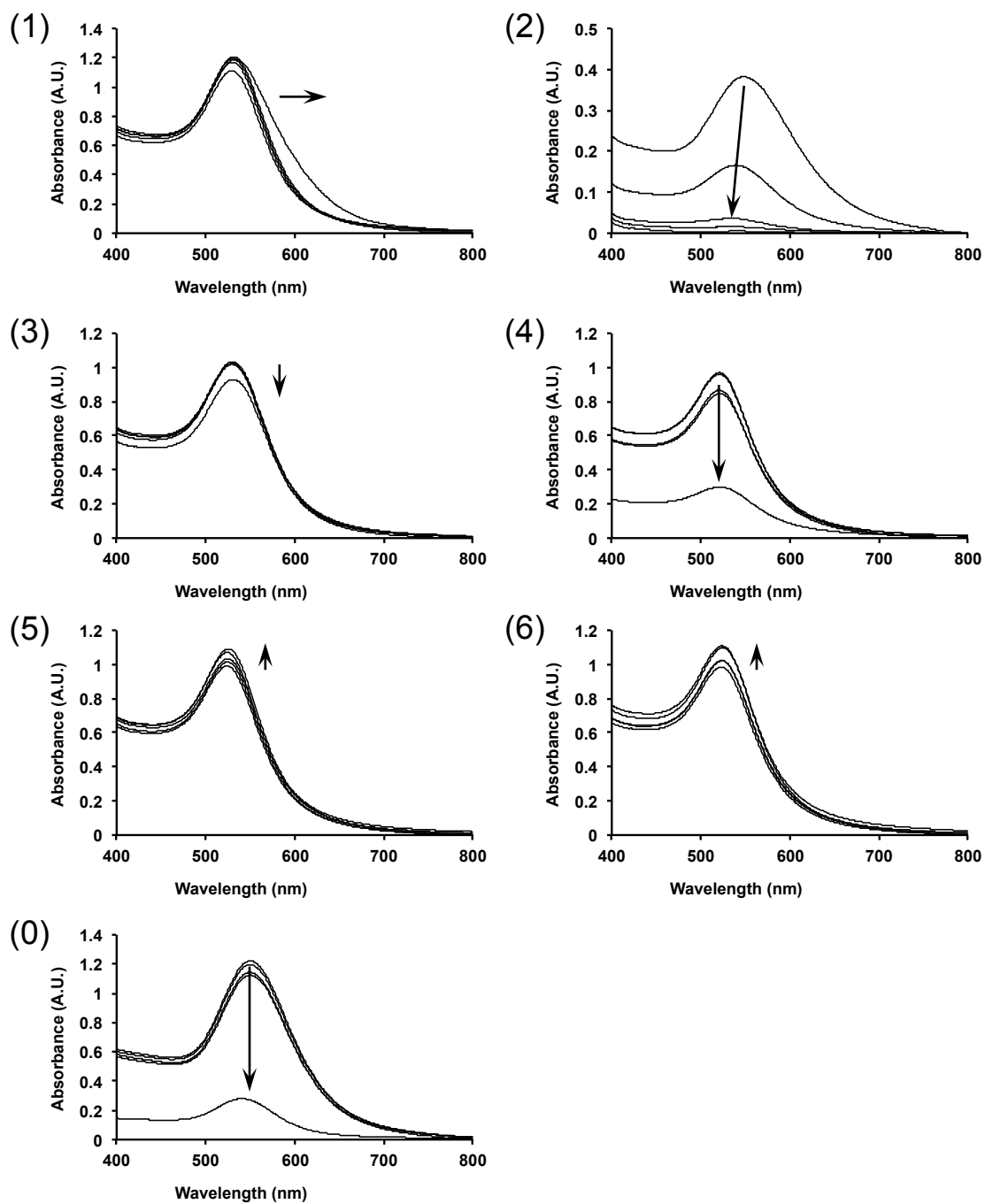


Figure 3-8. 各 pG<sub>2</sub>pA と GLD 酵素反応で調製した金ナノ粒子の TEM 像: (1) with protein 1 ( $10.3 \pm 7.8\ \text{nm}$ ), (2) with protein 2 (aggregation), (3) with protein 3 ( $12.4 \pm 7.9\ \text{nm}$ ), (4) with protein 4 (partial aggregation), (5) with protein 5 ( $12.1 \pm 7.5\ \text{nm}$ ), (6) with protein 6 ( $12.5 \pm 8.7\ \text{nm}$ ), and (0) without pG<sub>2</sub>pA protein ( $32.9 \pm 33.9\ \text{nm}$ ).

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, 29, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

Figure 3-9. pG<sub>2</sub>pA タンパク質のイオン強度に対する安定性評価

(NaCl 濃度: 0 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM, 1 M)

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, 29, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

### 3-2-4. 動的光散乱測定による金ナノ粒子上の機能性部位の評価

更なる金ナノ粒子の評価を行うために動的光散乱 (DLS) 測定を行った。タンパク質 **1** 存在下で調製した金ナノ粒子の流体力学的粒子径は、 $42.7 \pm 15.4$  nm であった (Table 3-2)。DLS 測定から算出された粒子径は、TEM 像から得られた平均粒径と比べて大きな値を示したが、これはタンパク質が金ナノ粒子表面を覆っていることを示唆する結果である。次に、金ナノ粒子上に pG<sub>2</sub>pA タンパク質が固定化されて、且つ抗体結合能を保持しているかを評価するために、タンパク質-金ナノ粒子溶液に、pG<sub>2</sub>pA タンパク質に対して当モルのウサギ由来 Anti-ovalbumin (OVA) IgG 抗体を添加して DLS 測定をおこなった。その結果、抗体の添加によって、流体力学的粒子径は  $42.7 \pm 15.4$  nm から  $56.0 \pm 25.0$  nm へと増加することが確認された (Table 3-2)。一方で、pG<sub>2</sub>pA タンパク質未添加のサンプルでは、抗体の添加に伴う粒子径の変化は、 $83.6 \pm 34.3$  nm から  $87.7 \pm 41.7$  nm と非常に小さいものであった (Table 3-2)。今回の DLS 測定結果からの考察は定性的なものではあるが、抗体は金ナノ粒子上のタンパク質 **1** に特異的に結合していることを示す結果である。

また、タンパク質 **3-6**-金ナノ粒子に関しても、抗体の添加に伴う流体力学的粒子径の増大が見られた (Table 3-2)。A3 ペプチドおよび His-tag を有していないタンパク質 **4** についても粒子径の増大が見られたことは、タンパク質 **4** が金ナノ粒子上に非特異的に物理吸着しているため、抗体の結合が起こったためであると考えられる。以上の結果から、pG<sub>2</sub>pA タンパク質固定化金ナノ粒子は、A3 ペプチドや His-tag を介した特異的な結合と、非特異的な物理吸着によって調製されていることを示している。加えて、定性的ではあるが金ナノ粒子上の pG<sub>2</sub>pA タンパク質は抗体結合能を保持していることが明らかとなった。

Table 3-2. DLS による金ナノ粒子の粒径変化測定

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, **29**, 15596– 15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

entry	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>0</b>
Particle size (nm)	$42.7 \pm 15.4$	$33.0 \pm 11.8$	$26.5 \pm 12.1$	$41.4 \pm 12.9$	$40.1 \pm 12.6$	$46.0 \pm 17.2$	$48.0 \pm 22.4$	$83.6 \pm 34.3$
PDI	0.147	0.192	0.163	0.107	0.099	0.182	0.222	0.139
Particle size (nm) with IgG	$56.0 \pm 25.0$	$44.8 \pm 26.3$	$46.4 \pm 37.6$	$51.8 \pm 22.4$	$49.5 \pm 22.1$	$63.5 \pm 26.4$	$68.7 \pm 28.4$	$87.7 \pm 41.7$
PDI with IgG	0.178	0.254	0.300	0.170	0.168	0.159	0.165	0.157

Mean  $\pm$  distribution width,  $n = 3$

### 3-2-5. 金ナノ粒子上のタンパク質の同定

SDS-PAGE により、金ナノ粒子上のタンパク質の同定をおこなった。遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) により未結合のタンパク質を除去した後、メルカプトエタノールおよび SDS 存在下での熱変性により、金ナノ粒子からのタンパク質の脱離を行い、SDS-PAGE によりタンパク質を同定した [57]。結



果を Figure 3-10 に示す。脱離したタンパク質の移動度は、元のタンパク質の移動度と一致した。Figure 3-10 の lane 1 より、タンパク質 **1** (49.7 kDa) が SDS-PAGE より確認できた。GLD (39 kDa) も同様に確認されたが、タンパク質 **1** と比べ、バンド強度は低いものであった。このことから、金ナノ粒子上には、主にタンパク質 **1** が固定化されていることが強く示唆された。また、GLD は His-tag を有しており、His-tag が金ナノ粒子への固定化に影響していることが示唆された。一方で、 $\Delta$ His<sub>6</sub>-GST であるタンパク質 **3**, **4** 共存下で調製した金ナノ粒子については、pG<sub>2</sub>pA タンパク質由来の明瞭なバンドは見られず、GLD 由来のバンドのみが確認された (Figure 3-10 lane 2, 3)。加えて、 $\Delta$ GST であるタンパク質 **5**, **6** 共存下で調製した金ナノ粒子については、pG<sub>2</sub>pA と GLD に対応する二つのバンドが確認された (Figure 3-10 lane 4, 5)。この結果から、本実験により調製した金ナノ粒子において、His-tag は A3 ペプチドよりも強く金ナノ粒子表面へと固定化されることが明らかとなった。実際に、ヒスチジン側鎖のイミダゾールが、金ナノ粒子上へのペプチドやタンパク質の自己集合に関与していることが報告されている [58, 59]。また、近年、His<sub>6</sub> ペプチドと金ナノ粒子の解離定数  $K_d$  は  $10^{-6}$  M 以下と非常に強いアフィニティーを示すことが明らかとなった [60]。従って、A3 ペプチドは金ナノ粒子表面と相互作用するが、His-tag の方がその相互作用は強く、最終的には His-tag が金ナノ粒子表面に特異的に結合していると考えられる。

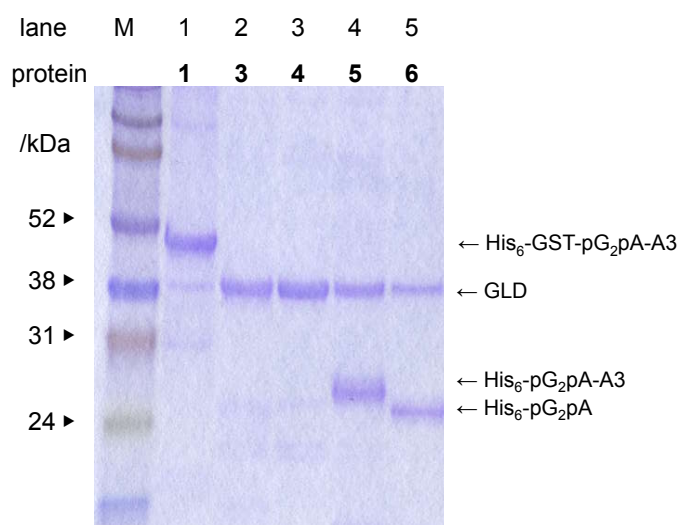


Figure 3-10. 精製後の金ナノ粒子上に存在するタンパク質の評価

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, **29**, 15596– 15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

Table 3-2 の DLS 測定結果により、金ナノ粒子上の pG<sub>2</sub>pA タンパク質は抗体結合能を保持していることを示した。そこで、IgG 抗体が固定化後の金ナノ粒子の機能を評価するために、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を行った。モデル抗原として OVA を用い、各 pG<sub>2</sub>pA-金ナノ粒子 (**1**, **3–6**) について評価した。今回構築した ELISA の概要を Figure 3-11a に示す。まず、プレートに抗原タンパク質である OVA を敷き、1% カゼイン Na によりブロッキングし、anti-OVA 抗体 (ウサギ由来) を添加した。次いで、ブロッキング剤である 1%カゼイン Na 水溶液で、金イオン濃度 10  $\mu$ M まで希釈した各 pG<sub>2</sub>pA-金ナノ粒子溶液を

プレートにそれぞれ添加した。最後に、HRP 標識 anti-mouse IgG 抗体 (ウサギ由来) を添加し、HRP の反応により生じた生成物を追跡することで各 pG<sub>2</sub>pA-金ナノ粒子の評価を行った。

結果を Figure 3-11b に示す。その結果、全てのサンプルで OVA を検出できることが示され、pG<sub>2</sub>pA タンパク質が抗体と特異的に結合できることを支持する結果が得られた。また、His-tag を含むタンパク質 **1**、**5**、**6** 固定化金ナノ粒子は、His-tag を含まない **3**、**4** よりも高いシグナルを確認した。この結果は、Figure 3-10 で得られた SDS-PAGE の結果を支持するものであり、金ナノ粒子に結合した pG<sub>2</sub>pA タンパク質の量を反映しているものと考えられる。His-tag を含まない **3**、**4** も金ナノ粒子上にわずかに存在していることが示唆される。加えて、タンパク質 **5** と **6** では、検出シグナルに大きな差は観察されなかった。

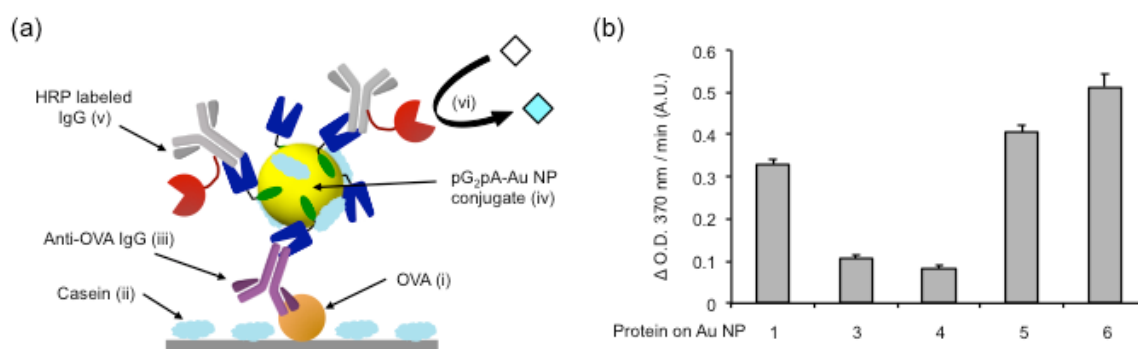


Figure 3-11. (a) 本研究で構築した ELISA の概念図、  
(b) 各 pG<sub>2</sub>pA 修飾金ナノ粒子を用いた ELISA による OVA の検出

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, **29**, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

これまで得られた結果より、以下のことが明らかとなった。(i) タンパク質 **1**、**3** と **2**、**4** の比較より、A3 ペプチドを導入により溶液分散性 (Figure 3-8) と表面安定性 (Figure 3-9) を付与することができる。(ii) タンパク質 **1**、**5**、**6** より、His-tag は A3 ペプチドよりも強く金ナノ粒子に結合する (Figure 3-10, 3-11)。

### 3-2-6. システイン導入 pG<sub>2</sub>pA 融合タンパク質共存下での金ナノ粒子の調製

これまで得られた結果から、A3 ペプチドだけでは、金ナノ粒子上への安定な固定化は達成できないことが明らかとなった。そこで、pG<sub>2</sub>pA ドメインの安定かつ配向性を持った固定化を達成するために、pG<sub>2</sub>pA へのシステイン残基の導入を行った。システインの導入位置は、pG<sub>2</sub>pA ドメインと A3 ペプチドの間、または pG<sub>2</sub>pA タンパク質の C 末端へ導入したタンパク質を調製した (タンパク質 **7**、**8**)。His-tag は A3 ペプチドよりも強く金ナノ粒子に結合することが明らかとなったが (Figure 3-10, 3-11)、システインは金表面と Au-S 結合を形成するため [61]、金ナノ粒子上への pG<sub>2</sub>pA ドメインの安定な固定化が達成できると考えた。タンパク質 **7** と **8** のアミノ酸配列は実験項に、精製度の確認は Figure 3-5 にそれぞれ示す。

まず、システイン導入 pG<sub>2</sub>pA タンパク質 (7, 8) でも金ナノ粒子が形成可能か否を評価した。その結果、溶液は赤く呈色し、金ナノ粒子の SPR 帯に由来する吸収極大波長 (535 および 536 nm) を示す UV/Vis 吸収スペクトルが得られた (Figure 3-12a)。TEM 観察によって得られた平均粒径は、それぞれ  $16.2 \pm 9.8$  nm ( $n = 128$ )、 $11.0 \pm 7.2$  nm ( $n = 118$ ) であった (Figure 3-12b)。加えて、DLS 測定の結果は Table 3-2 に示すとおり、抗体の添加に伴い流体力学的粒子径が増大することが確認された。以上の結果から、システイン導入 pG<sub>2</sub>pA タンパク質を用いて、pG<sub>2</sub>pA 固定化金ナノ粒子の調製に成功した。

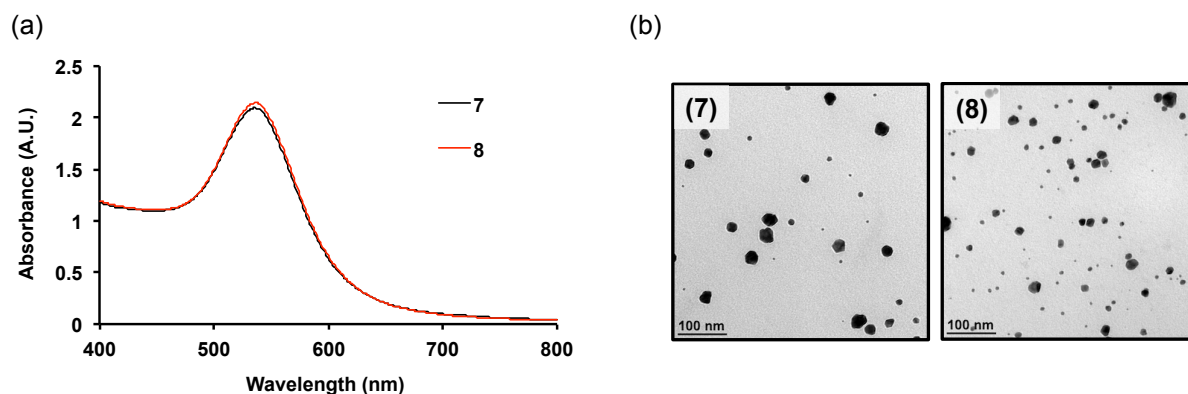


Figure 3-12. (a) Cys-tag 導入 pG<sub>2</sub>pA タンパク質を用いて調製した金ナノ粒子の UV/Vis 吸収スペクトル結果、(b) pG<sub>2</sub>pA 修飾金ナノ粒子の TEM 像: protein 7 ( $16.2 \pm 9.8$  nm), protein 8 ( $11.0 \pm 7.2$  nm).

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, 29, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

### 3-2-7. タンパク質の金ナノ粒子上への固定化におけるシステインの効果

タンパク質 1、7、8 において、GST とプロテイン G の B1 ドメインとの間にトロンビン認識配列を導入している。金ナノ粒子表面への pG<sub>2</sub>pA タンパク質の吸着について更なる情報を得るために、pG<sub>2</sub>pA-金ナノ粒子に対してトロンビンを添加することで、*in situ* での切断反応を行った (Figure 3-13)。遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) により精製した pG<sub>2</sub>pA-金ナノ粒子を用いて、金ナノ粒子上の pG<sub>2</sub>pA がトロンビンにより切断される様子を SDS-PAGE により追跡した。トロンビン添加により、タンパク質 1、7、8 に対応するバンドが減少し、新たに His<sub>6</sub>-GST (ca. 27 kDa) および pG<sub>2</sub>pA ドメイン (ca. 23 kDa) に対応するバンドが出現した (Figure 3-13 lane 2–5)。この結果から、金ナノ粒子上の各 pG<sub>2</sub>pA タンパク質は、固体表面上でトロンビンにより切断可能であることが明らかとなった。また、時間の経過と共に His<sub>6</sub>-GST とトロンビンに対応するバンドが減少することが観察された。この結果は、トロンビンによって His<sub>6</sub>-GST およびトロンビン自身が非特異的に切断されていることが考えられる。実際に、トロンビンを添加した後の lane 2–5 においては、ゲル下方に低分子量のバンドが確認され、His<sub>6</sub>-GST とトロンビンが非特異的に切断されていることを裏付ける結果である。pG<sub>2</sub>pA ドメインに関しては、変性が起こりにくい安定なタンパク質であるため、非特異的なトロンビン切断が起こらなかったと考えられる。また、金ナノ粒子上に固定化されたタンパク質は表面で変性し、内部のシステインが Au-S 結合形成してしまうため、結合は不可逆であると

いう報告がなされている [60]。この報告に従うと、His<sub>6</sub>-GST の His-tag 側の切断された断片は、金ナノ粒子表面に残っている可能性がある。

トロンビン添加から 24 時間後、タンパク質-金ナノ粒子を遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) を用いて精製することで、最終的に残ったタンパク質断片を分析した。本検討は、タンパク質がトロンビン消化の際に凝集が起こらず、限外濾過膜により金ナノ粒子に結合したタンパク質と未結合のタンパク質を分離できていると仮定している。その結果を lane 6 に示す。タンパク質 1-、7-金ナノ粒子複合体では、pG<sub>2</sub>pA ドメインのバンドが確認できなかった。これは pG<sub>2</sub>pA-A3 も pG<sub>2</sub>pA-Cys-A3 も金ナノ粒子表面に安定に固定化されていないことを示唆する結果である。一方で、タンパク質 8-金ナノ粒子複合体については、精製プロセス後においても、pG<sub>2</sub>pA-A3-Cys に由来するバンドが確認された。この結果は、タンパク質 8 が金ナノ粒子表面で Au-S 結合を形成していることを示す結果である。

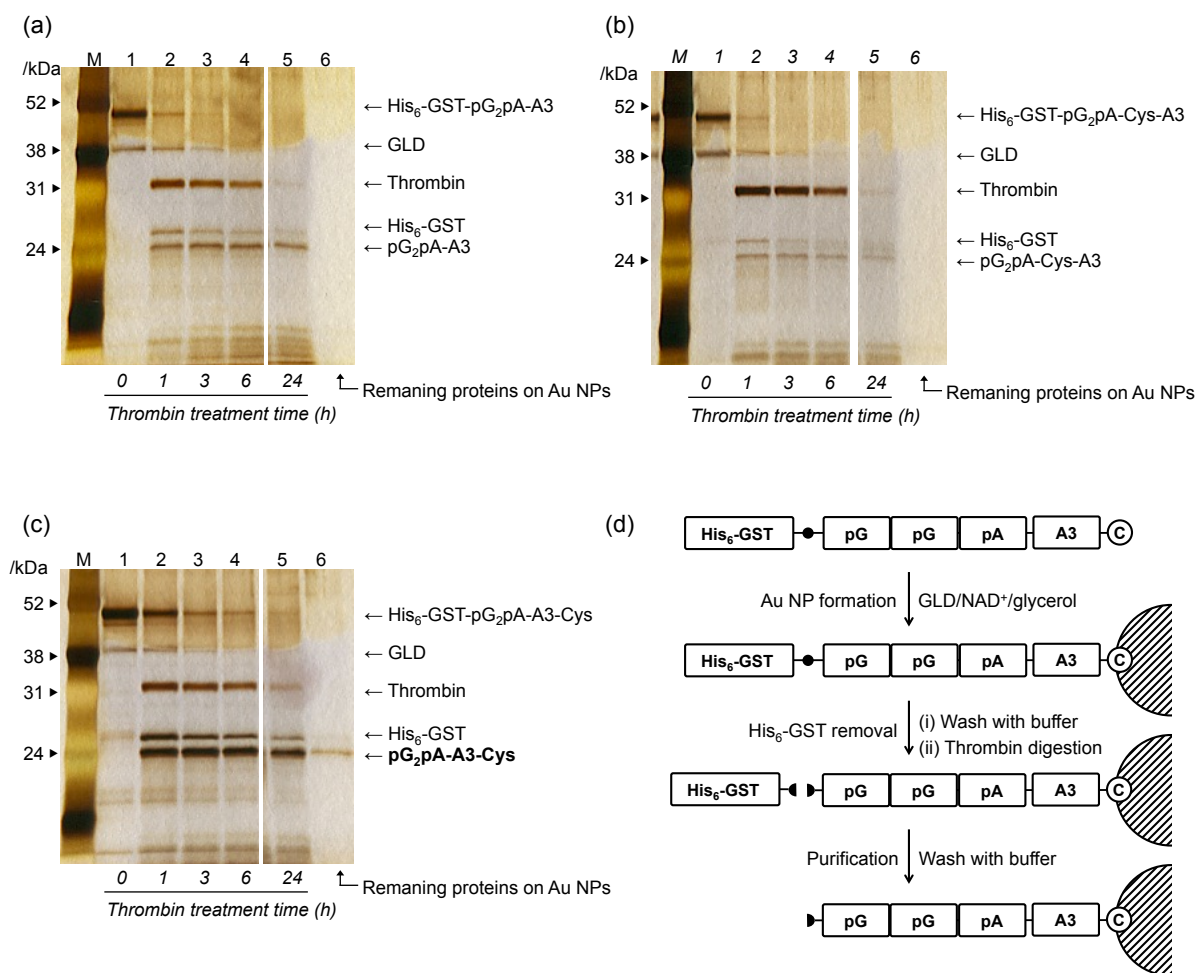


Figure 3-13. トロンビンによる金ナノ粒子上での pG<sub>2</sub>pA タンパク質の切断、(a) 1-Au NP、(b) 7-Au NP、(c) 8-Au NP: (Lane 1) トロンビン未添加、(Lane 2-5) トロンビン添加 1-24 時間後、(Lane 6) トロンビン添加 24 時間後の pG<sub>2</sub>pA 修飾金ナノ粒子の精製後、(c) タンパク質 8 の *in situ* トロンビン消化の概念図

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, 29, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

3-2-8. ELISA による pG<sub>2</sub>pA 融合タンパク質の機能評価

システイン導入 pG<sub>2</sub>pA タンパク質の抗体結合能を ELISA により評価した。構築した ELISA は Figure 3-11 と同様である。トロンビン消化 pG<sub>2</sub>pA-金ナノ粒子 (td-1、7、8-金ナノ粒子) は遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) で精製後、1%カゼイン Na 水溶液で、 $\lambda_{\max, \text{SPR band}}$  の吸光度が 0.05 (a.u.) まで希釈したものをを用いた。

ELISA による OVA 検出の結果を Figure 3-14 に示す。その結果、td-8-金ナノ粒子複合体は、td-1 および td-7 と比べ、それぞれ約 20 倍、13 倍の強いシグナルが観測された。td-1-金ナノ粒子でシグナル低かった理由として、トロンビン処理後の pG<sub>2</sub>pA 断片は金結合部位として A3 ペプチドが残るのみであり、His-tag を有している His<sub>6</sub>-GST や GLD の断片が主に吸着していることが原因と考えられる。また、td-7-金ナノ粒子に関しては、プロテイン A と A3 ペプチドの間に導入したシステインが金ナノ粒子との結合に十分機能していないと考えられる。これらの結果より、C 末端へのシステイン残基の導入により、金ナノ粒子へのタンパク質の固定化が改善されるということが明らかとなった。近年、タンパク質内部に導入したシステインの Au-S 結合形成速度は、末端チオール化ポリエチレングリコールと比べ、十分遅いことが報告された [62]。タンパク質と金ナノ粒子の相互作用は動的かつ複雑であるため、メカニズムの解明には更なる検討が必要ではあるが、タンパク質 8 の C 末端システイン残基はタンパク質 7 の内部に導入したシステイン残基よりも、金ナノ粒子表面に対する反応性が高いことが強く示唆された。

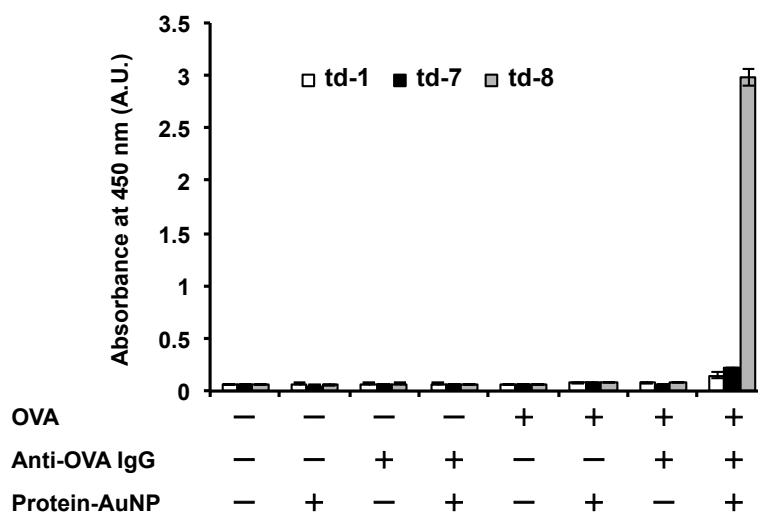


Figure 3-14. トロンビン消化後の 1, 7, 8-金ナノ粒子を用いての ELISA アッセイ

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, 29, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

最後に、金ナノ粒子上に結合したタンパク質 **8** の数を算出した。新たに調製したタンパク質 **8**-金ナノ粒子溶液に対して、遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) を用い、未結合のタンパク質およびフリーの金イオンを除去した。濾液から、フリーのタンパク質および金イオン濃度を、Bradford 法および誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) 測定にて定量した。Bradford アッセイより、金ナノ粒子上のタンパク質濃度 (タンパク質 **8** と GLD 混合) は 0.033 mg/mL であることが算出された。金ナノ粒子上のタンパク質 **8** と GLD の比率は SDS-PAGE のバンド強度を *ImageJ* により見積もった (Figure 3-15)。また、金ナノ粒子のモル数は以下に示す式 (1) および式 (2) にて算出した [63]。

$$N = \pi \rho N_A D^3 / 6 M = 30.89602 D^3 \quad (1)$$

$$C_{\text{Au NPs}} = C_{\text{Au}} / N \quad (2)$$

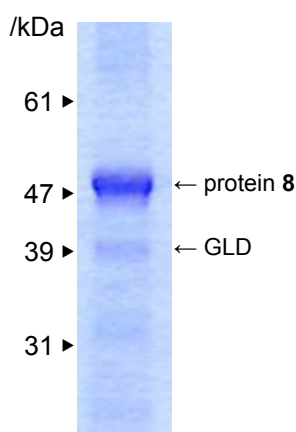


Figure 3-15. 精製後のタンパク質 **8**-金ナノ粒子複合体の SDS-PAGE 分析

[Reprinted with permission from Langmuir, 2013, **29**, 15596–15605. Copyright 2013 American Chemical Society.]

金ナノ粒子 1 個あたりの平均金原子数 ( $N$ ) は式 (1) より求めた。 $\rho$  は面心立方格子構造における金の密度 ( $19.3 \text{ g/cm}^3$ )、 $N_A$  はアボガドロ定数、 $D$  は金ナノ粒子の粒径、 $M$  は金の原子量 ( $197 \text{ g/mol}$ ) である。また、ICP-AES 測定より、金ナノ粒子として存在する金イオン濃度 ( $C_{\text{Au}}$ ) を求め、式 (2) に代入することで、金ナノ粒子の濃度 ( $C_{\text{Au NPs}}$ ) を算出した。 $C_{\text{Au NPs}}$  は  $0.010 \text{ }\mu\text{M}$  であった。以上より、金ナノ粒子一つあたりに、平均 57 分子のタンパク質 **8**、7 分子の GLD が結合していることが算出された。GST (二量体) およびプロテイン A の分子サイズを、それぞれ約  $5 \times 5 \times 6 \text{ nm}^3$  および  $1.7 \times 1.8 \times 3.0 \text{ nm}^3$ 、TEM 観察から求めた金ナノ粒子の平均粒径は約 11 nm であるとする、理論的には 30–70 分子のタンパク質 **8** が金ナノ粒子上に存在すると考えられる。以上より、実験値は理論値の範囲内に収まることから、得られた値は確からしいと考えられる。

### 3-3. 結語

本章では、酵素反応を利用して、タンパク質修飾金ナノ粒子のワンポット合成を行った。

まず、3つの異なる機能を有する機能性タンパク質**1**をデザインした。タンパク質**1**は、精製用のタグとしてヘキサヒスチジンタグ (His タグ) およびグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、抗体結合ドメインとしてプロテイン G およびプロテイン A、金結合ペプチドとして A3 ペプチドから構成される。また、各ドメインが金ナノ粒子の形成や結合に与える影響を評価するために、 $\Delta$ A3 ペプチドであるタンパク質**2**、**4**、**6**、および  $\Delta$ His<sub>6</sub>-GST であるタンパク質**3**、**4**、 $\Delta$ GST であるタンパク質**5**、**6**も調製し、評価に用いた。

次に、各タンパク質を用いて金ナノ粒子の合成を試みた。その結果、タンパク質**1**を加えたサンプルにおいて、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴 (SPR) 帯に由来する吸収が確認された。一方で、タンパク質**2**を添加したサンプルでは金ナノ粒子の凝集に由来する SPR 帯が確認された。また、異なる構造を有するタンパク質**3-6**をもちいて、タンパク質の各部分が金ナノ粒子の形成に及ぼす影響を評価した。その結果、全てのサンプルにおいて、溶液は赤く呈色し、分散した金ナノ粒子に特徴的な SPR 帯が確認された。タンパク質**2**が存在する溶液において、金ナノ粒子の形成が阻害された原因は不明であるが、タンパク質**1**の存在下では金ナノ粒子の形成が見られたことから、A3 ペプチドは金ナノ粒子の形成を促進していることが示唆された。また、A3 ペプチドは溶液分散性を付与することが明らかとなった。

得られた金ナノ粒子を精製後、金ナノ粒子表面に結合しているタンパク質を SDS-PAGE により同定したところ、His-tag を有するタンパク質と GLD のバンドが主に確認された。GLD は His-tag を有している。これは、His-tag が金ナノ粒子への固定化に影響していることが示唆している。一方で、 $\Delta$ His<sub>6</sub>-GST であるタンパク質**3**、**4**共存下で調製した金ナノ粒子については、pG<sub>2</sub>pA タンパク質由来の明瞭なバンドは見られず、GLD 由来のバンドのみが確認された。加えて、 $\Delta$ GST であるタンパク質**5**、**6**共存下で調製した金ナノ粒子については、pG<sub>2</sub>pA と GLD に対応する二つのバンドが確認された。従って、A3 ペプチドは金ナノ粒子表面と相互作用するが、His-tag の方がその相互作用は強く、最終的には His-tag が金ナノ粒子表面に特異的に結合していると考えられる。

A3 ペプチドだけでは、金ナノ粒子上への安定な固定化は達成できないことが明らかとなった。そこで、pG<sub>2</sub>pA ドメインの安定かつ配向性を持った固定化を達成するために、pG<sub>2</sub>pA へのシステイン残基の導入を行った。C 末端へのシステイン残基の導入により、金ナノ粒子へのタンパク質の固定化が改善されるということが明らかとなった。

### 3-4. 実験操作

#### 3-4-1. 試薬

- The plasmid (pET22b+) coding in GLD: 毛利剛博士より提供
- The plasmid (pUC18) coding in N-His BsGLD: Integrated DNA technologies, Inc. (Coralville, IA, USA)
- Glutathione Sepharose column (GSTrap HP column 5 mL): GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
- Ni-NTA column (HisTrap HP column 5 mL): GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
- Benzamidine column (HiTrap Benzamidine FF 5 mL): GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
- PD-10 column: GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
- Thrombin from human plasma: Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
- Bicinchoninic acid (BCA) assay kit: Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
- Bradford reagent: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Centrifugal filter unit for ultrafiltration (Amicon<sup>®</sup> Ultra): Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
- $\beta$ -nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized form (NAD<sup>+</sup>): Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
- Hydrogen tetrachloroaurate (III) tetrahydrate: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan)
- Cu TEM grid covered by elastic carbon film (20–25 nm): Oken Shoji (Tokyo, Japan)
- 96-well Nunc Maxisorp flat-bottom plate: Nunc (Rochester, NY, USA)
- Bovine casein (sodium salt): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Casein Na: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Ovalbumin (OVA): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Rabbit anti-OVA IgG: Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA)
- Horseradish peroxidase (HRP)-labeled rabbit anti-mouse IgG antibody: Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA)
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

All other reagents were commercially available, and were of analytical grade.

#### 3-4-2. 測定機器

- BioLogic DuoFlow Chromatography System: Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
- UV/Vis spectroscopy: Ubest U-570, JASCO (Tokyo, Japan)
- Transmission electron microscopy (TEM): JEM-2010 instrument, JEOL (Tokyo, Japan)
- Hydrophilization treatment instrument for TEM grid: HDT-400, JEOL (Tokyo, Japan)
- Dynamic light scattering (DLS) instrument: Zetasizer Nano-ZS, Malvern (Worcestershire, UK)
- Atomic absorption spectroscopy (AAS): AA-7000, Shimadzu (Kyoto, Japan)



- Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES): Optima 5300 DV, Perkin Elmer, Inc. (Waltham, MA, USA)
- Microplate washer: ImmunoWash 1575, Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
- Microplate reader: PowerWave X, BioTek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA)

### 3-4-3. pG<sub>2</sub>pA 融合タンパク質発現用プラスミドの構築

pUC His-GST-pG<sub>2</sub>pA-A3 (entry 1) は、Integrated DNA technologies 社に委託合成した。pET22b+ entry 1 の調製スキームを Figure 3-16 に示す。pUC entry 1 および pET22b+ を制限酵素 *Nde* I、*Hind* III により切断した。pET22b+ に関しては、制限酵素処理後、仔ウシ腸由来アルカリフォスファターゼによる脱リン酸化反応を行った。その後、entry 1 および pET22b+ の制限酵素処理断片 DNA を混合し、DNA リガーゼによるライゲーション反応を行うことで、pET22b+ entry 1 を得た。調製した pET22b+ entry 1 は大腸菌 (JM109 株) へ形質転換し、-80°C で保存した。

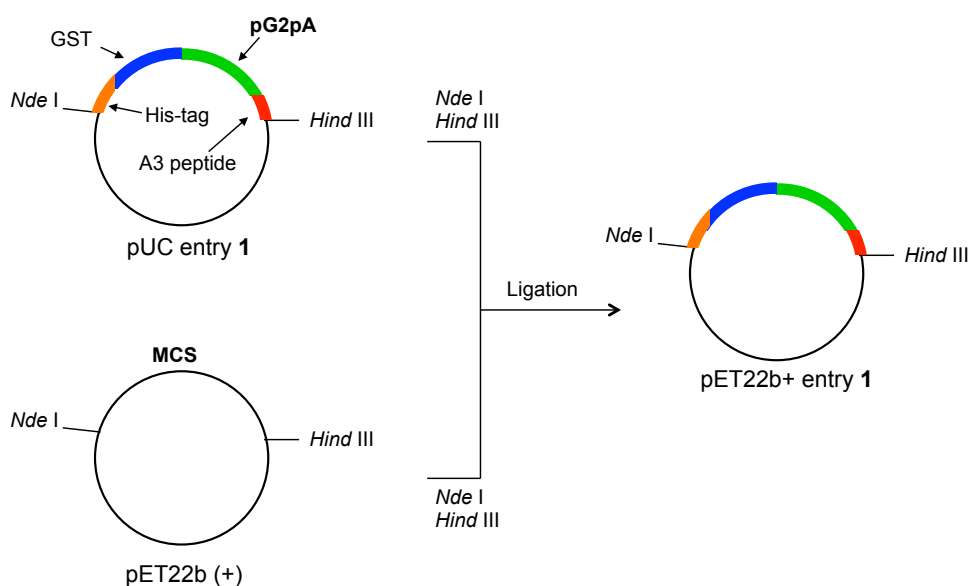


Figure 3-16. pET22b+ entry 1 の調製スキーム

本研究では、タンパク質の各ドメインが金ナノ粒子の形成に及ぼす影響を評価するために、様々な pG<sub>2</sub>pA タンパク質 (1-8) を調製し、検討に用いた。特に、タンパク質 2, 5-8 はインバース PCR 法により調製した。インバース PCR 法とは、通常の PCR の伸張方向とは反対向きに伸張するように設計したプライマーを用いて行う PCR 法である。プラスミド DNA を鋳型として用いた場合は、インバース PCR によりプラスミド全体を増幅することができる。この際、適切に設計されたプライマーを用いることにより、任意配列の置換、挿入、欠損を行うことができる。本実験の遺伝子組換え操作に使用したプライマーのリストは Table 3-3 に示す通りである。

pET22b+ entry 2 は pET22b+ entry 1 を鋳型 DNA として用いて調製した。具体的には、A3 ペプチドをコードする領域をインバース PCR 法にて除去した。pET22b+ entry 2 の調製スキームを Figure 3-17 に示す。pET22b+ entry 1 を鋳型 DNA として、Primer 1 および Primer 2 を用いて pET22b+ entry 2 を構築した。調製した pET22b+ entry 1 は大腸菌 (JM109 株) へ形質転換し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

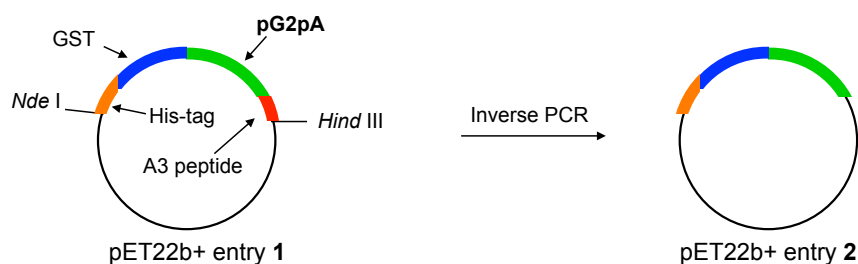


Figure 3-17. pET22b+ entry 2 の調製スキーム

pET22b+ entry 3 は pET22b+ entry 1 を、pET22b+ entry 4 は pET22b+ entry 2 を鋳型 DNA として用いて調製した。具体的には、GST をコードする領域をインバース PCR 法にて除去した。pET22b+ entry 3 および pET22b+ entry 4 の調製スキームを Figure 3-18 に示す。pET22b+ entry 5 は、pET22b+ entry 1 を鋳型 DNA として、Primer 1 および Primer 2 により構築した (Figure 3-19a)。pET22b+ entry 6 は、pET22b+ entry 2 を鋳型 DNA として、Primer 1 および Primer 2 により構築した (Figure 3-19b)。調製した pET22b+ entry 5、pET22b+ entry 5 は、大腸菌 (JM109 株) へそれぞれ形質転換し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

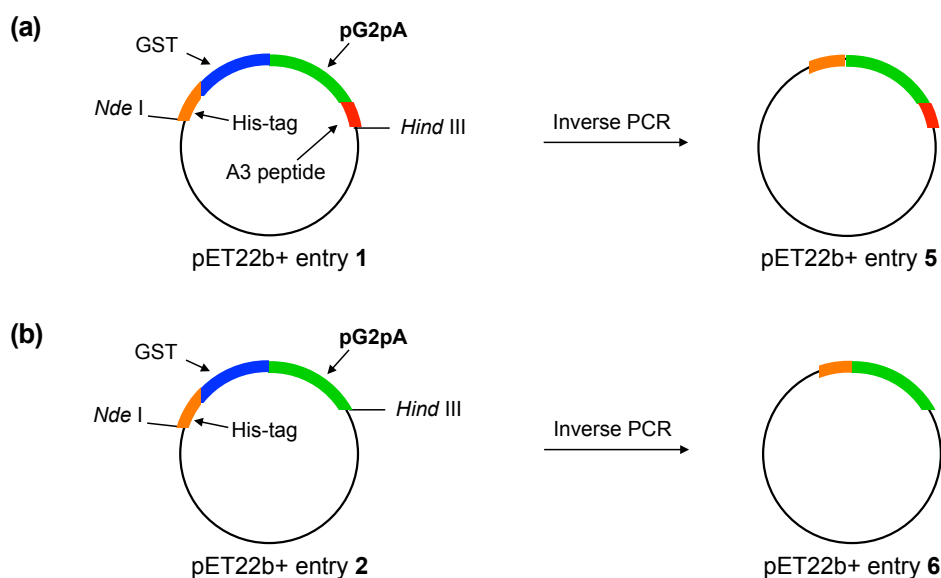


Figure 3-18. pET22b+ entry 5 および pET22b+ entry 6 の調製スキーム

pET22b+ entry 7、pET22b+ entry 8 は pET22b+ entry 1 を鋳型 DNA として用いて調製した。pET22b+ entry 7 はインバーサ PCR 法にて、pET22b+ entry 1 における pA と A3 ペプチドを繋ぐリンカー内のグリシンをシステインへ変異させた。pET22b+ entry 8 はインバーサ PCR 法にて、pET22b+ entry 1 における A3 ペプチドの末端へのシステインの導入を行った。pET22b+ entry 7 および pET22b+ entry 8 の調製スキームを Figure 3-19 に示す。pET22b+ entry 7 および pET22b+ entry 8 は、pET22b+ entry 1 を鋳型 DNA として、Primer 5-8 により構築した。調製した pET22b+ entry 7、pET22b+ entry 8 は、大腸菌 (JM109 株) へそれぞれ形質転換し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

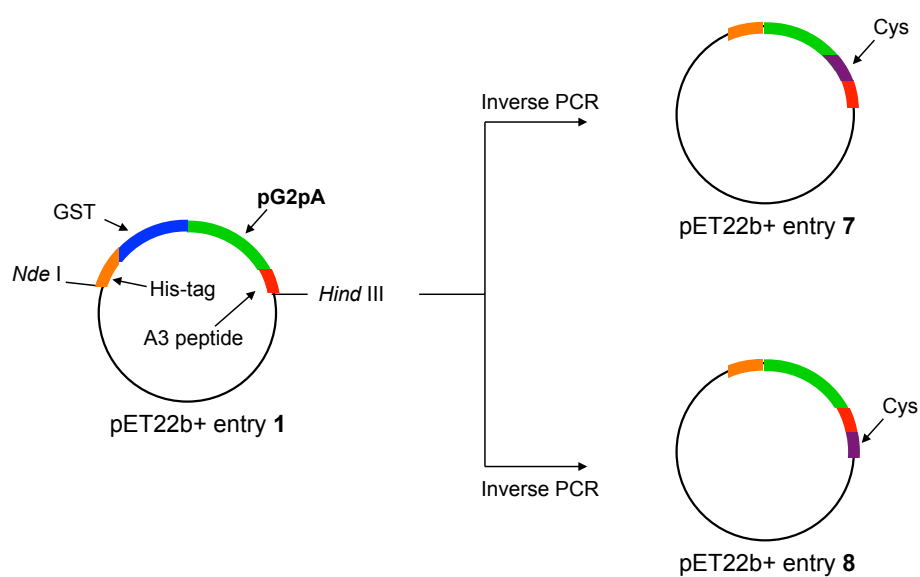


Figure 3-19. pET22b+ entry 7 および pET22b+ entry 8 の調製スキーム

調製した pG<sub>2</sub>pA 融合タンパク質 (protein 1) の全アミノ酸配列以下に示す。また、各 pG<sub>2</sub>pA 融合タンパク質 (1-8) の N 末端及び C 末端アミノ酸配列を Table 3-3 に、これら調製に用いたプライマーを Table 3-4 に示す。

Protein sequence of His<sub>6</sub>-GST-thrombin cleavage site-pG<sub>2</sub>pA-A3 (protein 1):

MHHHHHHGSMSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID  
 GDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDLFLSKLPEML  
 KMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLVYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYI  
 AWPLQGWQATFGGGDHPKGS~~L~~VPRGGGSTYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGV  
 DGEWTYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNG  
 VDGWVWYDDATKTFTVTEGGGSDVDNKFNKEQQNAFWELHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANL  
 LAEAKKLNDAPKGGGGSAYSSGAPMPPF

Table 3-3. 各 pG<sub>2</sub>pA タンパク質の N 末端および C 末端のアミノ酸配列

Protein	Abbreviation	Amino acid sequence
1	His <sub>6</sub> -GST-pG <sub>2</sub> pA-A3	MHHHHHHGSMSPIL----QAPKGGGGSAYSSGAPMPPF
2	His <sub>6</sub> -GST-pG <sub>2</sub> pA	MHHHHHHGSMSPIL----QAPKGGGGS
3	pG <sub>2</sub> pA-A3	GGGSTYKLVIN----QAPKGGGGSAYSSGAPMPPF
4	pG <sub>2</sub> pA	GGGSTYKLVIN----QAPKGGGGS
5	His <sub>6</sub> -pG <sub>2</sub> pA-A3	MHHHHHHGSTYKLV----QAPKGGGGSAYSSGAPMPPF
6	His <sub>6</sub> -pG <sub>2</sub> pA	MHHHHHHGSTYKLV----QAPKGGGGS
7	His <sub>6</sub> -GST-pG <sub>2</sub> pA-Cys-A3	MHHHHHHGSMSPIL----QAPKGGG <u>C</u> SAYSSGAPMPPF
8	His <sub>6</sub> -GST-pG <sub>2</sub> pA-A3-Cys	MHHHHHHGSMSPIL----QAPKGGGGSAYSSGAPMPPF <u>GGGSC</u>

Table 3-4. 組換えタンパク質調製に用いたプライマーリスト

Entry	DNA sequence
1 (for 2)	5'-TAA GAA TTC AAG CTT GCG-3' (18 mer)
2 (for 2)	5'-GGA TCC ACC ACC GCC TTT CGG CGC-3' (24 mer)
3 (for 5 and 6)	5'-CAT CAT GGG AGT ACC TAT AAA CTT GTC ATT AAC GGT AAA-3' (39 mer)
4 (for 5 and 6)	5'-GTG GTG ATG GTG CAT ATG TAT ATC TCC-3' (27 mer)
5 (for 7)	5'- <u>TGC</u> GGA TCC GCG TAT TCT AGC GGC-3' (the cysteine is underlined, 24 mer)
6 (for 7)	5'-ACC GCC TTT CGG CGC TTG CGC-3' (21 mer)
7 (for 8)	5'- <u>GGA TCC</u> TGC TAA GAA TTC AAG CTT-3' (the part of cysteine-tag is underlined, 24 mer)
8 (for 8)	5'- <u>ACC ACC GCC</u> AAA CGG CGG CAT CGG-3' (the part of cysteine-tag is underlined, 24 mer)

#### 3-4-4. pG<sub>2</sub>pA 融合タンパク質の調製

タンパク質 **1, 2, 5-8** をコードしたプラスミド DNA を *Escheria coli* BL21 (DE3) 株に形質転換し、100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む寒天培地でシングルコロニーを単離した。その後、100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む LB 培地 10 mL に植菌し、37 °C で一晩震盪培養を行った。次いで、培地溶液を 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む LB 培地 1 L に全て添加し、OD<sub>600</sub> 値が 0.5–0.6 まで 37 °C で震盪培養した。次いで、isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度で 0.5 mM となるように培養液へと添加した。IPTG 添加後、25 °C、200 rpm、16 時間でタンパク質の発現を行った。その後、菌体を遠心分離 (6,000g、10 min) で集菌し、洗浄バッファー(10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、EDTA 1 mM、pH 8.0) に再分散、遠心分離による回収の操作を 3 回繰り返す、洗浄を行った。洗浄後、再び洗浄バッファー 25 mL に再分散させ、液体窒素で凍結ならびに -80 °C で保存した。凍結させた菌懸濁液を溶解させ、氷浴上でソニケーションすることで大腸菌を破碎した。その後、20,400g、15 min で遠心分離を行い、無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を、0.45 および 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過した。

タンパク質 **1, 2, 7, 8** は、glutathione sepharose カラムにて精製を行った。 $\Delta\text{GST}$  であるタンパク質 **5, 6** は、glutathione sepharose カラムの代わりに Ni-NTA カラムにて精製を行った。これらアフィニティカラムでの精製は、BioLogic DuoFlow Chromatography System にて行った。精製後のタンパク質は、PD10 カラムにて 20 mM Tris-HCl へとバッファー交換をした。タンパク質の濃度は BCA 法により算出した。また、タンパク質の精製度は、SDS-PAGE にて確認した。

タンパク質 **3, 4** は、タンパク質 **1, 2** をトロンビン消化することにより調製した。具体的には、タンパク質 **1, 2** が溶解した PBS 緩衝液 (pH 7.4) に対して、終濃度 10 unit  $\text{mg}^{-1}\text{protein}$  となるようにトロンビンを添加して 25 °C で 16 時間静置した。溶液は、glutathione sepharose カラムおよび benzamidine sepharose カラムにて精製を行った。これらアフィニティカラムでの精製は、BioLogic DuoFlow Chromatography System にて行った。精製後のタンパク質は、PD10 カラムにて 20 mM Tris-HCl へとバッファー交換をした。タンパク質の濃度は BCA 法により算出した。また、タンパク質の精製度は、SDS-PAGE にて確認した。

#### 3-4-5. タンパク質修飾金ナノ粒子の調製

##### 調製手順

タンパク質修飾金ナノ粒子は、各 pG<sub>2</sub>pA タンパク質の溶解した溶液中で、GLD 酵素反応を行うことで調製を行った。NAD<sup>+</sup> (400  $\mu\text{M}$ )、グリセロール (100 mM) が溶解した 50 mM のグリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.5) に対して、GLD および pG<sub>2</sub>pA タンパク質を終濃度でそれぞれ 0.2  $\mu\text{M}$ 、2  $\mu\text{M}$  となるように添加した。次いで、HAuCl<sub>4</sub> 水溶液を 0.5 mM となるように添加し、37 °C で 24–48 時間静置することでタンパク質修飾金ナノ粒子を得た。得られた金ナノ粒子溶液は、UV/Vis 吸収スペクトル測定により評価した。

### タンパク質金ナノ粒子の精製

得られた金ナノ粒子に対して、遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) を用いて 4°C 下で 4000g、5 分間遠心した。残渣に対して、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を添加し、再分散後に遠心分離する操作を 3 回行うことでタンパク質修飾金ナノ粒子と、未吸着のタンパク質および過剰の金イオンの分離を行った。金ナノ粒子上のタンパク質数の算出は、濾液中のタンパク質濃度および金イオン濃度を Bradford 法および ICP 測定にてそれぞれ定量することで求めた。

### 3-4-6. タンパク質修飾金ナノ粒子の評価

#### TEM 観察

TEM 観察には炭素が被服された銅製のグリッドを親水化処理したものをを用いた。サンプルをキャスト後、陰圧下で乾燥を行った後、加速電圧 120 kV で TEM 観察を行った。金ナノ粒子の平均粒径は *ImageJ* にて見積もった。

#### DLS 測定

Zetasizer Nano-ZS (Malvern 社) を用い、25°C の条件下で動的光散乱測定を行った。測定結果から、平均粒子径 (mean particle size)、多分散度 (poly dispersion index, PDI)、粒子径の分布幅 (distribution width) を得た。

#### SDS-PAGE による金ナノ粒子上のタンパク質の同定

金ナノ粒子に結合したタンパク質は SDS-PAGE にて評価した。タンパク質-金ナノ粒子複合体の溶液は、遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) を用いて、4,000g、5 分間遠心操作を行った。残渣のタンパク質-金ナノ粒子複合体の溶液を SDS 2×サンプルバッファー (0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)、4 wt% SDS、20 wt% グリセロール、0.01 wt% ブロモチモールブルー、12 wt% 2-メルカプトエタノール) に加え、94°C で 15 分間熱処理することで、金ナノ粒子からのタンパク質の脱離および変性を行った。熱変性させた溶液を 12.5% SDS ポリアクリルアミドゲルに添加した。また、タンパク質固定化金ナノ粒子に対してトロンビン処理を行う際は、精製した金ナノ粒子に対して、10 unit/mL となるようにヒト血清由来トロンビンを添加して 25°C で切断反応を行った。トロンビンの切断反応を追跡するために、反応溶液から少量のサンプルを 1, 3, 6, 24 時間後に分取した。分取した溶液は、SDS 2×サンプルバッファーと混合後、94°C で 15 分間熱処理することで反応を停止させた。トロンビン添加から 24 時間後の反応溶液は、遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) に添加後、4,000g で 5 分間遠心操作を行った。タンパク質-金ナノ粒子複合体溶液である残渣は、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で 3 回の洗浄により精製した。サンプルは上記した SDS-PAGE の操作により、最終的に金ナノ粒子に結合しているタンパク質を分析した。

### 3-4-7. ELISA 法による金ナノ粒子上のタンパク質の機能評価

タンパク質修飾金ナノ粒子は、それぞれの pG<sub>2</sub>pA タンパク質 (1-8) が存在あるいは非存在下の溶液において、GLD 酵素反応により調製した。詳細は 3-4-5 節に記載した通りである。酵素反応開始から 48 時間後のサンプルを遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) にて精製した。洗浄に用いた緩衝液は 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) である。金ナノ粒子の濃度は、原子吸光光度計、誘導結合プラズマ発光分光分析装置、UV/Vis 吸収スペクトル測定にて算出した。タンパク質-金ナノ粒子複合体は、1%カゼイン Na が溶解した PBS 緩衝液 (pH 7.4) を用いて希釈した。3-2-5 節で行った ELISA 実験では、全てのタンパク質-金ナノ粒子複合体において金イオン濃度が 10  $\mu$ M となるように希釈して用いた。また、3-2-8 節で行った ELISA 実験では、全てのタンパク質-金ナノ粒子複合体において  $\lambda_{\text{max, SPR band}}$  の吸光度が 0.05 (a.u.) となるように希釈して用いた。

- (1) 96 穴イムノプレート (Nunc Inc., Denmark) に 5.0 mg/mL の OVA を 100  $\mu$ L/well 添加し、4°C で一晩静置し、その後 0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (2) 1% Casein Na (in PBS) を 200  $\mu$ L/well で添加し、37°C で 2 時間静置後、0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (3) Anti-OVA (Rabbit) IgG 抗体を 100  $\mu$ L/well 添加し、37°C で 2 時間静置後、0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (4) GLD 酵素法によって調製した金ナノ粒子溶液サンプルを 100  $\mu$ L/well 添加し、37°C で 2 時間静置後、0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (5) HRP 標識 Anti-guinea pig IgG 抗体を 100  $\mu$ L/well 添加し、37°C で 2 時間静置後、0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (6) HRP 反応溶液を 100  $\mu$ L/well 添加し、37°C で 370 nm における吸光度 (O.D.) の時間変化を測定した。
- (7) 30 min 後、1 M HCl を 50  $\mu$ L/well 添加し、HRP 酵素反応を停止させた後、37°C で 450 nm における吸光度 (O.D.) を測定した。

## 3-5. 参考文献

- [1] Wang, X.H.; Schroder, H.C.; Muller, W.E.G. Giant Siliceous Spicules from the Deep-Sea Glass Sponge *Monorhaphis Chuni*. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **2009**, 273, 69–115
- [2] Marin, F.; Luquet, G.; Marie, B.; Medakovic, D. Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2008**, 80, 209–276
- [3] Salih, E.; Wang, J.X.; Mah, J.; Fluckiger, R. Natural Variation In The Extent of Phosphorylation of Bone Phosphoproteins as a Function of In Vivo New Bone Formation Induced by Demineralized Bone Matrix in Soft Tissue and Bony Environments. *Biochem. J.* **2002**, 364, 465–474
- [4] Alves, N.M.; Leonor, I.B.; Azevedo, H.S.; Reis, R.L.; Mano, J.F. Designing Biomaterials Based on Biom mineralization of Bone. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 2911–2921
- [5] Mahamid, J.; Aichmayer, B.; Shimoni, E.; Ziblat, R.; Li, C.H.; Siegel, S.; Paris, O.; Fratzl, P.; Weiner, S.; Addadi, L. Mapping Amorphous Calcium Phosphate Transformation into Crystalline Mineral from the Cell to the Bone in Zebrafish Fin Rays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, 107, 6316–6321
- [6] Busch, S. Regeneration of Human Tooth Enamel. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1428–1431
- [7] Baldassarri, M.; Margolis, H.C.; Beniash, E. Compositional Determinants of Mechanical Properties of Enamel. *J. Dent. Res.* **2008**, 87, 645–649
- [8] Lin, A.Y.; Chen, P.Y.; Meyers, M.A. The Growth of Nacre in the Abalone Shell. *Acta Biomater.* **2008**, 4, 131–138
- [9] Metzler, R.A.; Evans, J.S.; Killian, C.E.; Zhou, D.; Churchill, T.H.; Appathurai, N.P.; Coppersmith, S.N.; Gilbert, P.U. Nacre Protein Fragment Templates Lamellar Aragonite Growth. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6329–6234
- [10] George, A.; Ravindran, S. Protein Templates in Hard Tissue Engineering. *Nano Today* **2010**, 5, 254–266
- [11] 加藤隆史 [監修]、バイオミネラル化とそれに倣う新機能材料の創製、シーエムシー出版 **2007**, 101–109
- [12] He, G.; Dahl, T.; Veis, A.; George, A. Nucleation of Apatite Crystals In Vitro by Self-Assembled Dentin Matrix Protein. *Nat. Mater.* **2003**, 2, 552–558
- [13] Lakshminarayanan, R.; Vivekanandan, S.; Samy, R.P.; Banerjee, Y.; Chi-Jin, E.O.; Teo, K.W.; Jois, S.D.S.; Kini, R.M.; Valiyaveetil, S. Structure, Self-Assembly, and Dual Role of a Beta-Defensin-Like Peptide from the Chinese Soft-Shelled Turtle Eggshell Matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4660–4668
- [14] Chen, C.-L.; Rosi, N. L. Peptide-Based Methods for the Preparation of Nanostructured Inorganic Materials *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 1924–194
- [15] Patwardhan, S. V.; Emami, F. S.; Berry, R. J.; Jones, S. E.; Naik, R. R.; Deschaume, O.; Heinz, H.; Perry, C. C. Chemistry of Aqueous Silica Nanoparticle Surfaces and the Mechanism of Selective Peptide Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 6244–6256
- [16] 伏見 讓 [著]、進化分子工学—高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発、エヌ・ディー・エス、**2013**



- [17] Brown, S. Engineered Iron Oxide-Adhesion Mutants of the Escherichia coli Phage  $\lambda$  Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 8651–8655
- [18] Whaley, S. R.; English, D. S.; Hu, E. L.; Barbara, P. F.; Belcher, A. M. Selection of Peptides with Semiconductor Binding Specificity for Directed Nanocrystal Assembly. *Nature* **2000**, 405, 665–668
- [19] Smith, G. P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors that Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **1985**, 228, 1315–1317
- [20] Xu, A. W.; Ma, Y.; Cölfen, H. Biomimetic Mineralization. *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 415–449
- [21] Brown, S. Metal-Recognition by Repeating Polypeptides. *Nat. Biotechnol.*, **1997**, 15, 269–272
- [22] Woodbury, R. G.; Wendin, C.; Clendenning, J.; Melendez, J.; Elkind, J.; Bartholomew, D.; Brown, S.; Furlong, C. E. Construction of biosensors Using a Gold-Binding Polypeptide and a Miniature Integrated Surface Plasmon Resonance Sensor. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, 13, 1117–1126
- [23] Brown, S. Protein-Mediated Particle Assembly. *Nano Lett.* **2001**, 1, 391–394
- [24] Tamerler, C.; Oren, E. E.; Duman, M.; Venkatasubramanian, E.; Sarikaya, M. Adsorption Kinetics of an Engineered Gold Binding Peptide by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and a Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir* **2006**, 22, 7712–7718
- [25] So, C. R.; Tamerler, C.; Sarikaya, M. Adsorption, Diffusion, and Self-Assembly of an Engineered Gold-Binding Peptide on Au(111) Investigated by Atomic Force Microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5174–5177
- [26] Naik, R. R.; Stringer, S. J.; Agarwal, G.; Jones, S. E.; Stone, M. O. Biomimetic Synthesis and Patterning of Silver Nanoparticles. *Nat. Mater.* **2002**, 1, 169–172
- [27] Naik, R. R.; Brott, L. L.; Clarson, S. J.; Stone, M. O. Silica-Precipitating Peptides Isolated from a Combinatorial Phage Display Peptide Library. *J. Nanosci, Nanotechnol.* **2002**, 2, 95–100
- [28] Slocik, J. M.; Stone, M. O.; Naik, R. R. Synthesis of Gold Nanoparticles Using Multifunctional Peptides. *Small* **2005**, 1, 1048–1052
- [29] Habib, A.; Tabata, M.; Wu, Y. G. Formation of Gold Nanoparticles by Good's Buffers. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, 78, 262–269
- [30] Xie, J. P.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. C. Seedless, Surfactantless, High-Yield Synthesis of Branched Gold Nanocrystals in HEPES Buffer Solution. *Chem. Mater.* **2007**, 19, 2823–2830
- [31] Serizawa, T.; Hirai, Y.; Aizawa, M., Novel Synthetic Route to Peptide-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2009**, 25, 12229–12234
- [32] Heinz, H.; Farmer, B. L.; Pandey, R. B.; Slocik, J. M.; Patnaik, S. S.; Pachter, R.; Naik, R. R. Nature of Molecular Interactions of Peptides with Gold, Palladium, and Pd–Au Bimetal Surfaces in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9704–9714
- [33] Yu, J.; Becker, L.; Carri, G. A. A Molecular Dynamics Simulation of the Stability-Limited Growth Mechanism of Peptide-Mediated Gold-Nanoparticle Synthesis. *Small* **2010**, 6, 2242–2245

- [34] Ishikawa, K.; Yamada, K.; Kumagai, S.; Sano, K-I.; Shiba, K.; Yamashita, I.; Kobayashi, M. Adsorption Properties of a Gold-Binding Peptide Assessed by its Attachment to a Recombinant Apoferritin Molecule. *Appl. Phys. Expr.* **2008**, 1, 034006-1–034006-3
- [35] Kumada, Y.; Tokunaga, Y.; Imanaka, H.; Imamura, K.; Sakiyama, T.; Katoh, S.; Nakanishi, K. Screening and Characterization of Affinity Peptide Tags Specific to Polystyrene Supports for the Orientated Immobilization of Proteins. *Biotechnol. Prog.* **2006**, 22, 401–405
- [36] Park, T. J.; Lee, S. Y.; Lee, S. J.; Park, J. P.; Yang, K. S.; Lee, K. B.; Ko, S.; Park, J. B.; Kim, T.; Kim, S. K.; Shin, Y. B.; Chung, B. H.; Ku, S. J.; Kim do, H.; Choi, I. S. Protein Nanopatterns and Biosensors Using Gold Binding Polypeptide as a Fusion Partner. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7197–7205
- [37] Kacar, T.; Zin, M. T.; So, C.; Wilson, B.; Ma, H.; Gul-Karaguler, N.; Jen, A. K. Y.; Sarikaya, M.; Tamerler, C. Directed Self-Immobilization of Alkaline Phosphatase on Micro-Patterned Substrates via Genetically Fused Metal-Binding Peptide. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 103, 696–705
- [38] So, C. R.; Kulp, J. L.; Oren, E. E.; Zareie, H.; Tamerler, C.; Evans, J. S.; Sarikaya, M. Molecular Recognition and Supramolecular Self-Assembly of a Genetically Engineered Gold Binding Peptide on Au{111}. *ACS Nano* **2009**, 3, 1525–1531
- [39] M. Hnilova, E. E. Oren, U. O. S. Seker, B. R. Wilson, S. Collino, J. S. Evans, C. Tamerler, M. Sarikaya, Effect of Molecular Conformations on the Adsorption Behavior of Gold-Binding Peptides. *Langmuir* **2008**, 24, 12440–12445
- [40] Pandey, R. B.; Heinz, H.; Feng, J.; Farmer, B. L.; Slocik, J. M.; Drummy, L. F.; Naik, R. R. Adsorption of Peptides (A3, Flg, Pd2, Pd4) on Gold and Palladium Surfaces by a Coarse-Grained Monte Carlo Simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 1989–2001
- [41] Dickerson, M. B.; Sandhage, K. H.; Naik, R. R. Protein- and Peptide-Directed Syntheses of Inorganic Materials. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4935–4978
- [42] Feldheim, D. L.; Eaton, B. E. Selection of Biomolecules Capable of Mediating the Formation of Nanocrystals. *ACS Nano* **2007**, 1, 154–159
- [43] Zhou, W.; Schwartz, D. T.; Baneyx, F. Single-Pot Biofabrication of Zinc Sulfide Immuno-Quantum Dots. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4731–4738
- [44] Zhou, W. B.; Baneyx, F. Aqueous, Protein-Driven Synthesis of Transition Metal-Doped ZnS Immuno-Quantum Dots. *ACS Nano* **2011**, 5, 8013–8018
- [45] Slocik, J. M.; Moore, J. T.; Wright, D. W. Monoclonal Antibody Recognition of Histidine-Rich Peptide Encapsulated Nanoclusters. *Nano Letters* **2002**, 2, 169–173
- [46] Djalali, R.; Chen, Y.; Matsui, H. Au Nanowire Fabrication from Sequenced Histidine-Rich Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13660–13661
- [47] Yan, X. H.; Blacklock, J.; Li, J. B.; Mohwald, H. One-Pot Synthesis of Polypeptide-Gold Nanoconjugates for In Vitro Gene Transfection. *ACS Nano* **2012**, 6, 111–117

- [48] Colombo, M.; Mazzucchelli, S.; Collico, V.; Avvakumova, S.; Pandolfi, L.; Corsi, F.; Porta, F.; Prospero, D. Protein-Assisted One-Pot Synthesis and Biofunctionalization of Spherical Gold Nanoparticles for Selective Targeting of Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9272–9275
- [49] Slocik, J. M.; Naik, R. R. Biologically Programmed Synthesis of Bimetallic Nanostructures. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1988–1992
- [50] Chen, C. L.; Zhang, P. J.; Rosi, N. L. A New Peptide-Based Method for the Design and Synthesis of Nanoparticle Superstructures: Construction of Highly Ordered Gold Nanoparticle Double Helices. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13555–13557
- [51] Song, C. Y.; Zhao, G. P.; Zhang, P. J.; Rosi, N. L. Expedient Synthesis and Assembly of Sub-100 nm Hollow Spherical Gold Nanoparticle Superstructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14033–14035
- [52] Hwang, L.; Zhao, G. P.; Zhang, P. J.; Rosi, N. L. Size-Controlled Peptide-Directed Synthesis of Hollow Spherical Gold Nanoparticle Superstructures. *Small* **2011**, *7*, 1939–1942
- [53] Shimojo, K.; Niide, T.; Taguchi, T.; Naganawa, H.; Kamiya, N.; Goto, M. Facile, Rapid and Efficient Biofabrication of Gold Nanoparticles Decorated with Functional Proteins. *Analyst* **2012**, *137*, 2300–2303
- [54] Lee, J. M.; Park, H. K.; Jung, Y.; Kim, J. K.; Jung, S. O.; Bong Hyun Chung, B. H. Direct Immobilization of Protein G Variants with Various Numbers of Cysteine Residues on a Gold Surface. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2680–2687
- [55] Maeda, Y.; Ueda, H.; Kazami, J.; Kawano, G.; Suzuki, E.; Nagamune, T. Engineering of functional chimeric protein G—Vargula luciferase. *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 147–152
- [56] Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 735–743
- [57] Lee, J. M.; Park, H. K.; Jung, Y.; Kim, J. K.; Jung, S. O.; Chung, B. H. Direct Immobilization of Protein G Variants with Various Numbers of Cysteine Residues on a Gold Surface. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2680–2687
- [58] Kogot, J. M.; England, H. J.; Strouse, G. F.; Logan, T. M. Single Peptide Assembly onto a 1.5 nm Au Surface via a Histidine Tag. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16156–16157
- [59] Kogot, J. M.; Parker, A. M.; Lee, J.; Blaber, M.; Strouse, G. F.; Logan, T. M. Analysis of the Dynamics of Assembly and Structural Impact for a Histidine Tagged FGF1-1.5 nm Au Nanoparticle Bioconjugate. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2106–2113
- [60] Cohavi, O.; Reichmann, D.; Abramovich, R.; Tesler, A. B.; Bellapadrona, G.; Kokh, D. B.; Wade, R. C.; Vaskevich, A.; Rubinstein, I.; Schreiber, G., A Quantitative, Real-Time Assessment of Binding of Peptides and Proteins to Gold Surfaces. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1327–1336
- [61] Reed, A. M. W.; Metallo, S. J., Oriented Protein Adsorption to Gold Nanoparticles through a Genetically Encodable Binding Motif. *Langmuir* **2010**, *26*, 18945–18950

- [62] Siriwardana, K.; Wang, A.; Vangala, K.; Fitzkee, N.; Zhang, D., Probing the Effects of Cysteine Residues on Protein Adsorption onto Gold Nanoparticles Using Wild-Type and Mutated GB3 Proteins. *Langmuir* **2013**, *29*, 10990–10996
- [63] Liu, X. O.; Atwater, M.; Wang, J. H.; Huo, Q., Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloid Surface, B* **2007**, *58*, 3–7

## 第4章

### プロテインG融合グリセロールデヒドロゲナーゼによる タンパク質被覆金ナノ粒子の一段階合成

#### 4-1. 緒言

第3章において、金結合性ペプチドを融合した機能性タンパク質とGLD酵素反応を組み合わせることで、酵素反応に伴うタンパク質修飾金ナノ粒子の1ポット合成が可能であることを示した。特に、His-tagはA3ペプチドよりも金ナノ粒子表面と強く相互作用するという興味深い結果が得られた。さらに、Cysを導入することでCys選択的なタンパク質の固定化の達成が示唆され、各ペプチドタグの金ナノ粒子への結合はCys>His-tag>A3ペプチドの順で起こることが予想された。また、金ナノ粒子形成を促進する触媒として系中に存在するGLDにHis-tagを付与していたため、GLDも金ナノ粒子表面へ結合してしまうことが明らかとなった。第3章での研究では、タンパク質とナノ材料の界面での考察が十分になされておらず、機能を損なわずタンパク質を金ナノ粒子上に固定化する際には、より良い設計指針を立てる必要がある。そこで本章では、これまでに得られた知見をもとに、His-tagとCysを有する金結合性ペプチドタグを設計し、さらにGLDと機能性タンパク質を遺伝子工学的に連結させることで、金ナノ粒子上に機能性タンパク質を均一に提示することを目的とした。これまで使用してきたGLDは大腸菌由来のものであるが、結晶構造が得られていないため、結晶構造が入手可能な*B. stearothermophilus*由来GLDを用いることとした。加えて、*B. stearothermophilus*は好熱菌であるので、大腸菌由来GLDよりも高い安定性を期待出来る。ここではまず、タンパク質とナノ材料の界面に働く相互作用について紹介した後、本研究の戦略について述べる。

#### 4-1-1. ナノバイオ界面に働く力

これまで述べたように、金ナノ粒子をはじめとするナノ材料は、そのサイズに依存したユニークな物理化学的性質により、生物学分野への応用が盛んに検討されている。そのなかで、ナノ材料特有の性質を生体分子が存在する環境下で発揮させるため、生体分子とナノ材料との相互作用の理解が重要となる [1]。現在、ナノ材料が生理的な環境 (e.g. 細胞質、血液) に導入されると、すぐさまナノ材料表面にタンパク質が吸着され、タンパク質の層が形成される現象が起こることが広く支持されている [2]。特に、このようなナノ粒子表面のタンパク質層は、「タンパク質コロナ」と呼ばれ、ナノ材料が生体へ及ぼす影響の観点から、ナノ材料の粒子径、分散状態、表面状態を変化させる因子として注目されている。ナノ材料は広い表面積を有しており、非常に多くのタンパク質の吸着量が起こるため、これらの現象を制御することが必要となる。タンパク質とナノ材料の相互作用の理解と制御は、生体分子とナノ材料との複合体の利用の幅を広げることができると考えられる。本節では、特にナノ粒子とタンパク質との相互作用について扱うこととする。

ナノ粒子が血清などの生理的環境下に導入されると、タンパク質コロナが形成されることは先に述べた。

タンパク質のナノ粒子への吸着は、タンパク質-ナノ材料およびタンパク質-タンパク質の相互作用によって支配されている。強くナノ粒子に結合するタンパク質をハードコロナ、弱くナノ粒子に結合するものをソフトコロナと呼ばれ区別されている (Figure 4-1)。生理的環境中のタンパク質は、自由拡散やポテンシャルエネルギー勾配に従ってナノ粒子表面に移動し、熱力学的に安定な状態へと変化 (吸着) すると考えられる。すなわち、吸着ギブズエネルギー変化 ( $\Delta G_{\text{ads}} = \Delta H_{\text{ads}} - T\Delta S_{\text{ads}} < 0$ ) に従ってタンパク質コロナ形成が起こると言い換えられる ( $\Delta G_{\text{ads}}$ : ギブズエネルギー変化、 $\Delta H_{\text{ads}}$ : エンタルピー変化、 $T$ : 温度、 $\Delta S_{\text{ads}}$ : エントロピー変化)。エンタルピーやエントロピーを変化させる因子として、共有結合や非共有結合形成、水分子の再配列、タンパク質の構造変化などがあり [3, 4]、正確なメカニズムの理解にはタンパク質とナノ粒子の物理化学的性質を考慮する必要がある [5, 6]。

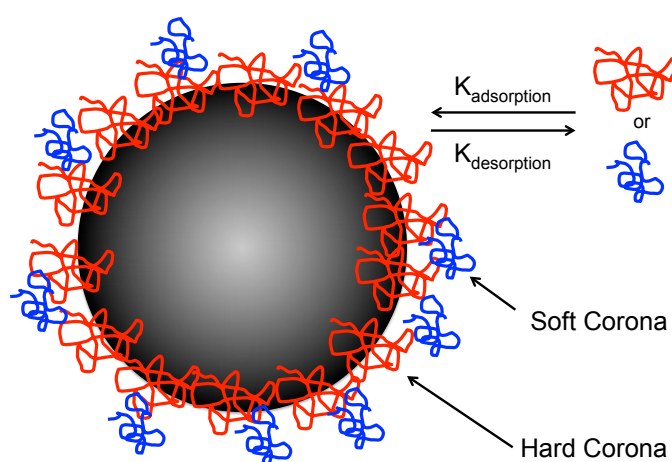


Figure 4-1. タンパク質コロナの模式図

タンパク質のナノ粒子への吸着は一様に起こるわけではなく、タンパク質中の特定の部位で起こると考えられている。例えば、血液中に存在する高分子量キノーゲンは、主に domain 5 (D5) と呼ばれる部位で酸化鉄ナノ粒子への吸着が起こる [7]。D5 は His に富んでおり、側鎖のイミダゾール基により酸化鉄ナノ粒子に結合していると示唆される。従って、タンパク質の吸着挙動は、タンパク質中の部位によって異なることができ、吸着初期の挙動は制御可能であると考えられる。

また、タンパク質コロナの安定性は、結合に伴う  $\Delta G_{\text{ads}}$  に依存する。結合に伴う  $\Delta G_{\text{ads}}$  が大きければ、結合したタンパク質はナノ粒子表面に安定に結合できる [3]。反対に、結合に伴う  $\Delta G_{\text{ads}}$  が小さければ、容易にナノ粒子表面から解離する。一般に、ナノ粒子表面が疎水性または電荷を帯びている場合、親水性の表面と比べ、タンパク質は強く吸着する傾向にある。これはタンパク質中の疎水性アミノ酸残基や電荷を有するアミノ酸残基が、ナノ粒子表面と熱力学的に安定となるように相互作用するためである [8]。従って、結合に伴い、ほとんどのタンパク質が構造変化を起こす [9]。その際のタンパク質の構造変化の度合いは、タンパク質およびナノ粒子の化学種と構造に依存する。

さらに、ナノ粒子へのタンパク質の吸着挙動は動的であると考えられている。従って、よりアフィニティの強い他の分子が系中に存在すれば、粒子表面のタンパク質は、動的な交換反応により置き換わる。

この挙動は Vroman 効果と呼ばれている [10, 11]。粒子表面への吸着モードは、ペプチドやタンパク質のアミノ酸配列や、溶媒や粒子表面に対する物理化学的特性などにより変化する [12, 13] (Figure 4-2)。一方で、ナノ粒子側から生体分子との吸着特性を考えた場合、化学成分と形やサイズなどの成分に加え、結晶化度や不均一性、表面の荒さなどにより生体分子との相互作用は変化する [13]。その他の要因としては溶液中 (多くは緩衝液中) の pH やイオン強度、緩衝液成分などが考えられる。

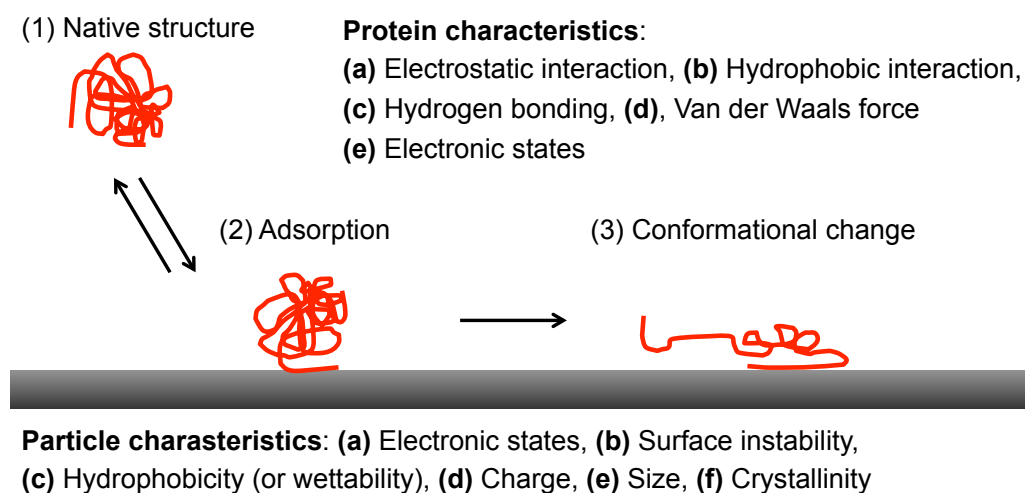


Figure 4-2. 固体表面上でのタンパク質の吸着とそれに伴う構造変化

現在、タンパク質とナノ粒子の正確な吸着メカニズムは不明のままである。それは、タンパク質の複雑な構造やアミノ酸組成、配列など様々な相互作用を考慮する必要があることに起因している。また、ペプチドとナノ材料との相互作用も不明な点が多く、目的のナノ粒子に特異的に結合するタンパク質やペプチドの合理的な設計は、現在のところ困難とされている。従って、第3章でも述べたように、特定のナノ材料に対して結合する生体分子の取得法は、コンビナトリアルケミストリーによるスクリーニング法に頼るところが大きい。

以上より、タンパク質とナノ粒子表面の相互作用は不明な点が多く、タンパク質修飾金ナノ粒子を調製する際においても同様に、得られる複合体上のタンパク質の状態を推定することは困難である。しかしながら、ナノ粒子と親和性のあるドメインを含み、さらにナノ粒子上でのタンパク質の機能性部位がナノ粒子表面と近接しない設計にすることで、配向性を持ち、タンパク質機能を保持した固定化が達成できるものと考えられる。

#### 4-1-3. *Bacillus stearothermophilus* 由来グリセロールデヒドロゲナーゼの酵素学的特性

これまでの検討において、我々は大腸菌由来のグリセロールデヒドロゲナーゼを利用した金ナノ粒子の調製を行ってきた。本章では、既に結晶構造が明らかとなっている好熱菌 *B. stearothermophilus* 由来グリセロールデヒドロゲナーゼ (BsGLD, PDB ID: 1JPU) [14] を用いた。

##### ・構造と酵素学的特性

BsGLD は大腸菌由来 GLD と同様、グリセロールから dihydroxyacetone の酸化反応と  $\text{NAD}^+$  から NADH の還元反応を同時に行う酸化還元酵素である (glycerol:  $\text{NAD}^+$  2-oxidoreductase, EC 1.1.1.6)。本酵素は好熱菌由来であるため、非常に安定性が高いことが知られている。BsGLD は活性中心に一つの  $\text{Zn}^{2+}$  を有しており、370 アミノ酸残基から構成される (ca. 39.5 kDa) [15]。一つのサブユニットは、一つのサブユニットが  $60 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$  の大きさを持ち、溶液中において、BsGLD はホモ八量体 ( $100 \times 100 \times 60 \text{ \AA}$ ) として存在する [14, 16]。また、BsGLD は、グリセロール以外にも様々なジオール化合物を基質として利用することができる [17, 18]。しかし、glyceraldehyde や 1,3-propandiol を基質として用いた場合は、酵素活性を示さず、BsGLD 阻害剤として働く [17]。従って、C2 位のヒドロキシル基を選択的に酸化する働きがある。また、酵素活性の pH 依存性については、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6–8.4) の pH の上昇に伴い、グリセロールに対するミカエリス定数 ( $K_m$  値) が 170 mM から 7 mM へと減少することから、高い pH 領域で基質に対する親和性が高いと言える [17]。 $\text{NAD}^+$  に対する  $K_m$  値は、グリセロール濃度に依存せず、高い pH 領域で減少することも明らかとなっている。

また、BsGLD は活性中心に  $\text{Zn}^{2+}$  イオンを持つため、EDTA などのキレート剤存在下において、 $\text{Zn}^{2+}$  イオンの脱離により活性が低下する [17]。不活性化した BsGLD に対して、 $\text{Zn}^{2+}$  イオンを添加することで、活性の回復が見られる。

##### ・推定反応機構

グリセロールと結合した BsGLD と、 $\text{NAD}^+$  と結合した BsGLD のそれぞれの結晶構造から、二つの基質が結合した状態の BsGLD の活性中心の様子を予測し、推定反応機構が示されている [14] (Figure 4-3)。活性中心である  $\text{Zn}^{2+}$  イオンは、BsGLD のクラフトの内部に存在し、またクラフト内の  $\text{NAD}^+$  に対して溶媒がアクセスしにくい環境となっている。これにより、溶媒環境の影響を受けずにグリセロールから  $\text{NAD}^+$  への水素の移動が達成できていると考えられる。さらに、グリセロールの C2 位の水酸基は、活性中心の  $\text{Zn}^{2+}$  により pKa が低下すると考えられ、水分子とのプロトンシャッフリングが起こると推定される。アルコールをケトンへと変化する酸化反応は、 $\text{NAD}^+$  が補因子として関与し、共役求核付加反応により、グリセロールから  $\text{NAD}^+$  のニコチンアミド環へのヒドリドイオンの移動起こると考えられる。



(d)

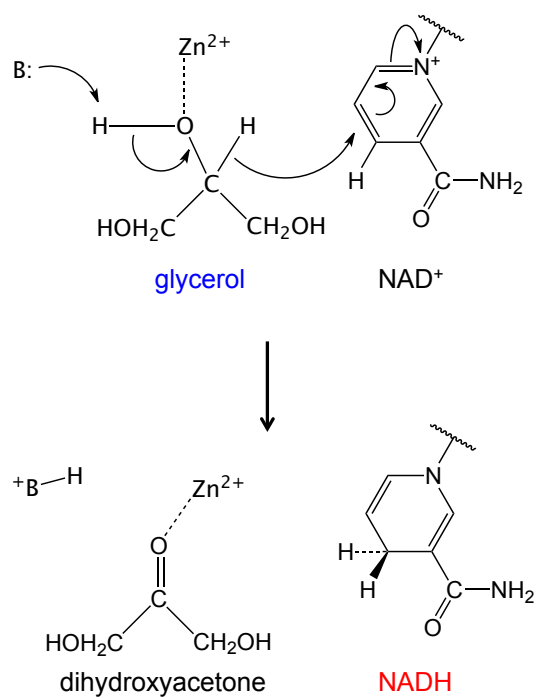


Figure 4-3. BsGLD の推定反応機構

## 4-1-3. 本研究の戦略

本研究では、第3章で得られた結果をもとに、タンパク質修飾金ナノ粒子の新規調製法を提案する。これまでの結果から、GLDと金結合ペプチド融合タンパク質を用い、タンパク質修飾金ナノ粒子を調製可能であることを報告した。そのなかで、A3ペプチドよりもHis-tagが金ナノ粒子表面に強く結合することを実験的に明らかにし、Cysがタンパク質の金ナノ粒子への固定化に大きく寄与することも示した。しかし、タンパク質と金ナノ粒子の界面では、様々な相互作用により、タンパク質の活性低下が懸念されることが知られており、これまでの検討においては、タンパク質の活性低下を考慮していなかった。

そこで、本章では結晶構造を取得可能なBsGLDを用い、機能性タンパク質と金結合ペプチドを融合した、キメラタンパク質を調製し、1ポット・1タンパク質成分系でのタンパク質修飾金ナノ粒子の調製を報告する。まず、第3章で得られた結果をもとに、新たに金結合性のペプチドを設計する。金ナノ粒子に強く結合するHis-tagとCysを連結させた金結合ペプチド(HHHHHHC)を設計し、BsGLDのC末端に導入する。また、機能性のモデルタンパク質として、プロテインGをBsGLDのN末端に導入した。設計したキメラBsGLD(pG-BsGLD-H<sub>6</sub>C)は、抗体結合能、NADH再性能、金結合能を有すると考えられる。さらに、金ナノ粒子へのpG-BsGLD-H<sub>6</sub>Cの固定化の際に、BsGLDが犠牲保護剤として働くことで、プロテインGの機能低下を抑制できると考えた(Figure 4-4)。

以上より、本研究で設計した多機能性の融合タンパク質を用いることで、タンパク質-金ナノ粒子の新たな合成ルートを示すことができるとともに、目的のタンパク質の活性を損なうことなく金ナノ粒子上に提示する新たな手法となると考えられる。

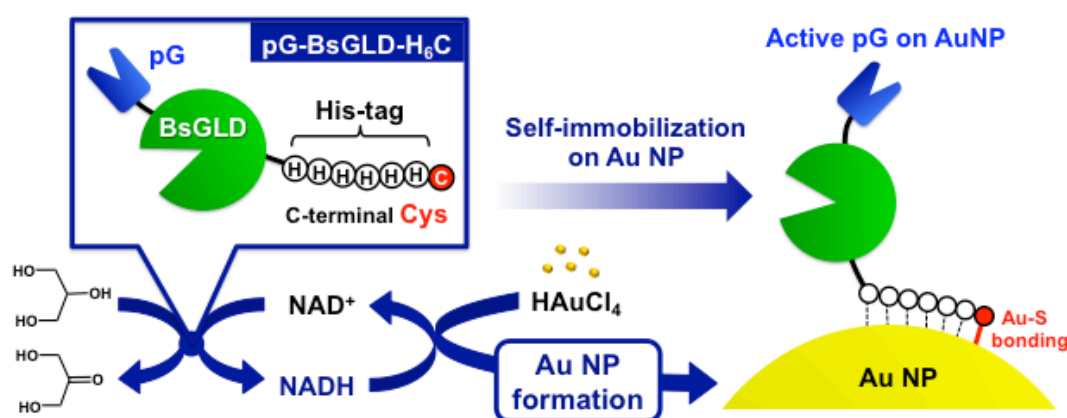


Figure 4-4. 本研究の提案する1ポット・1タンパク質成分系によるタンパク質修飾金ナノ粒子調製法  
[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

## 4-2. 結果と考察

## 4-2-1. プロテイン G 融合グリセロールデヒドロゲナーゼの設計と調製

GLD とプロテイン G のキメラタンパク質を作るにあたり、これまでに結晶構造が明らかとなっている *B. stearothermophilus* 由来 GLD (BsGLD) [R17] を選択し、組換体の設計に用いることとした (Figure 4-5)。さらに、*B. stearothermophilus* は好熱菌であるため、BsGLD は大腸菌由来の GLD と比べて高い構造安定性を示すことが期待される。まず、タンパク質修飾金ナノ粒子合成における、1 ポット・1 タンパク質成分系を実現するために、異なる三つの機能を有した BsGLD の設計を目指した。それぞれの機能は、(1) プロテイン G の B1 ドメインによる抗体結合機能、(2) BsGLD による NADH 再生機能、(3) His<sub>6</sub>Cys による金結合機能である。抗体結合能および金結合能をそれぞれ機能させるために、プロテイン G を BsGLD の N 末端に、His<sub>6</sub>Cys を C 末端に導入したキメラタンパク質 (pG-BsGLD-H<sub>6</sub>C) (3) を設計した。また、BsGLD とプロテイン G の間に Tobacco Etch Virus (TEV) プロテアーゼ認識配列 (ENLYFQG) を導入している。TEV プロテアーゼの表面から活性中心までの距離は約 10.6 Å であった (Figure 4-6)。立体障害による TEV 切断を阻害しないよう、プロテイン G と BsGLD の間に GS リンカー配列 (GGSGGGGS) を導入した。

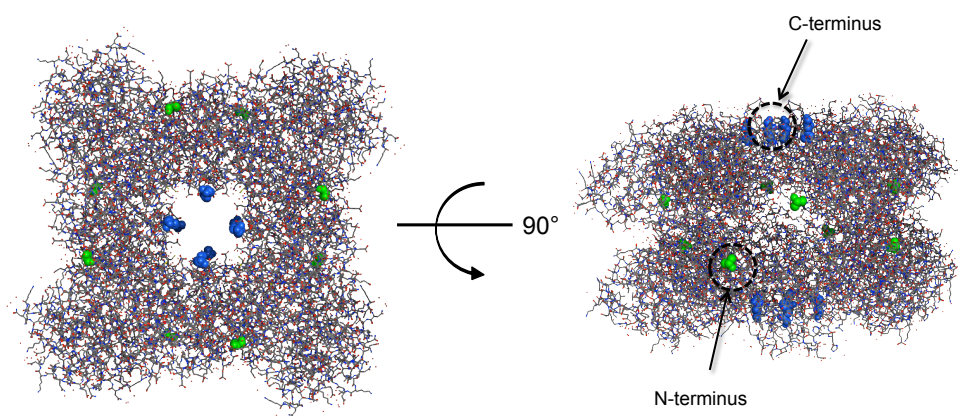


Figure 4-5. BsGLD の N 末端と C 末端の位置

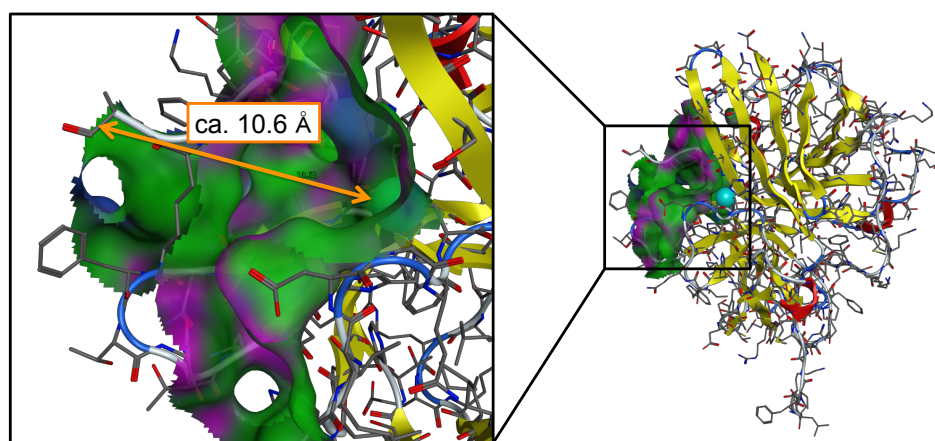


Figure 4-6. TEV プロテアーゼの構造と表面から活性中心までの距離

また、陰性対照としてプロテイン G を持たない BsGLD-H<sub>6</sub> (1) および BsGLD-H<sub>6</sub>C (2) も調製し実験に用いた。各キメラ BsGLD の分子量と N 末端および C 末端のアミノ酸配列を Table 4-1 に示す。

Table 4-1. 組換え BsGLD の理論分子量および N 末端、C 末端のアミノ酸配列

Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.

Entry	Abbreviation	MW (kDa)	Amino acid sequence
1	BsGLD-H <sub>6</sub>	42.0	MGSENLYFQGGGGSGGGS----BsGLD----HHHHHHH
2	BsGLD-H <sub>6</sub> C	42.1	MGSENLYFQGGGGSGGGS----BsGLD----HHHHHHHC
3	pG-BsGLD-H <sub>6</sub> C	49.3	pG----GSENLYFQGGGGSGGGS----BsGLD----HHHHHHHC

大腸菌により調製後、各キメラ BsGLD の精製度を SDS-PAGE により評価した (Figure 4-7)。その結果、理論分離量と一致する単一バンドが確認されたことから、各 BsGLD の調製に成功した。

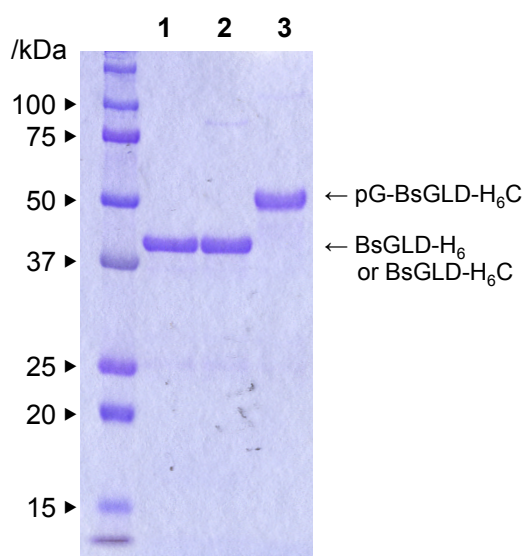
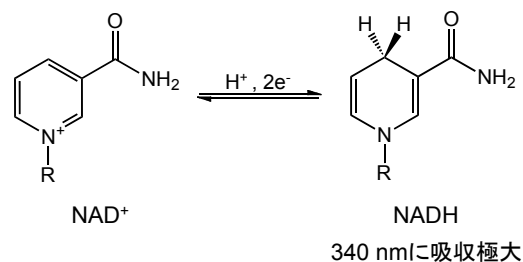


Figure 4-7. SDS-PAGE による各 BsGLD の精製度の確認

[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

## 4-2-2. プロテイン G 融合グリセロールデヒドロゲナーゼの活性評価

各 BsGLD について、比活性の比較および緩衝液が酵素活性に及ぼす影響を評価した (Figure 4-8)。1 の活性を 100 とした時の各 BsGLD の比活性を Figure 4-8a に示す。1 の活性が最も高く、プロテイン G を導入した 3 が最も低い活性であることが明らかとなった。しかし、3 においても 1 のおよそ 80%の活性を維持していた。次に、1



について、緩衝種および pH の酵素活性への影響を評価した (Figure 4-8b)。その結果、緩衝液および pH の違いによって BsGLD 酵素の活性に違いが見られた。BsGLD は、Glycine-NaOH 緩衝液と炭酸-重炭酸 緩衝液を用いた pH 10.0–11.0 付近の塩基性条件下で活性が高いことがわかる。これは、大腸菌由来 GLD と同様の挙動であった。また、リン酸ナトリウム 緩衝液においても比較的高い活性を示すことが明らかとなった。一方で、Tris-HCl 緩衝液はほとんど活性を示さないことも明らかとなった。このことから GLD の活性は高 pH 領域だけでなく緩衝液の種類によっても変化することがわかった。

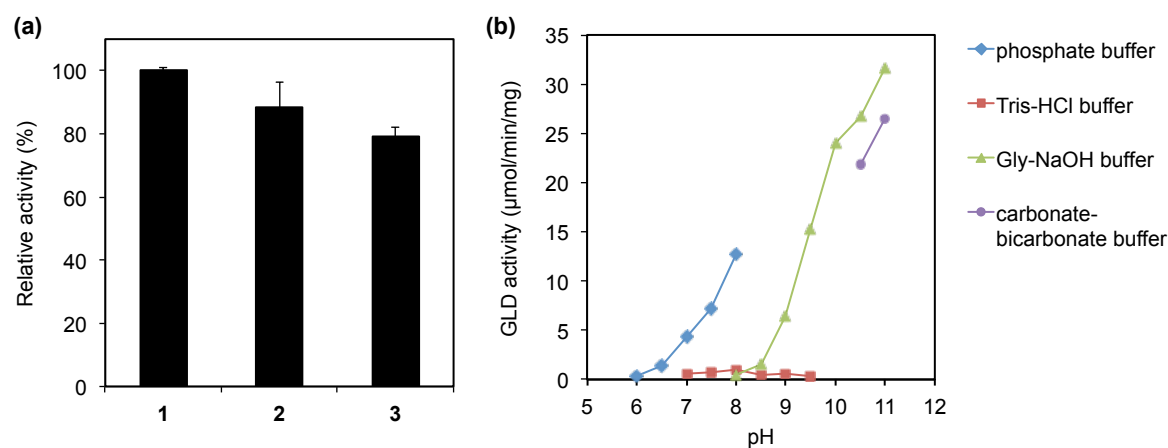


Figure 4-8. (a) 各 BsGLD の比活性 (b) BsGLD1 の酵素活性における緩衝種および pH の影響  
 [Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

#### 4-2-3. 金ナノ粒子の調製および評価

各 BsGLD による金ナノ粒子合成において、緩衝種と pH の影響について検討した。BsGLD (1  $\mu$ M)、NAD<sup>+</sup> (400  $\mu$ M)、グリセロール (100 mM) が溶解した 50 mM の様々な緩衝液 (pH 7.0–11.0) に H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> (0.25 mM) を加え十分に攪拌した後、37°C で 48 時間静置し、金ナノ粒子の合成を行った (Table 4-2)。溶液の様子の確認および UV/Vis 吸光光度計により金ナノ粒子の形成を評価した。

その結果、金ナノ粒子の形成は BsGLD の酵素活性に依存することが示された (Figure 4-9)。全ての BsGLD において、Gly-NaOH 緩衝液 (pH 10.0) で調製した金ナノ粒子は、強い赤色に呈色し、523 nm 付近に吸収極大波長を持つ金ナノ粒子の SPR 帯に由来するスペクトルを示した。これらの結果は、調製した全ての BsGLD (1–3) がグリセロールを犠牲試薬として NADH の再生が起こっていることを示す結果がであり、本条件では His-tag、H<sub>6</sub>C、プロテイン G は金ナノ粒子形成における負の効果を与えないことを示唆する結果である。反対に、酵素活性の低かった Tris-HCl (pH 8.0–9.0) および Glycine-NaOH (pH 8.0) では金ナノ粒子の形成は確認できなかった。これは、BsGLD の活性がほとんどない緩衝液および pH なので、NADH の再生が進行せず、金イオンを還元できなかったためであると考えられる。この結果に基づいて、以降の実験では反応溶液として Gly-NaOH 緩衝液 (pH 9.5) を選択した。

Table 4-2. 金ナノ粒子の合成に用いた緩衝種の種類と pH

Buffer solution	Entry	pH
Sodium phosphate buffer	a, b, c	7.0, 7.5, 8.0
Tris-HCl buffer	d, e	8.0, 9.0
Glycine-NaOH buffer	f, g, h	8.0, 9.0, 10.0
Carbonate-bicarbonate buffer	i, j	10.0, 11.0

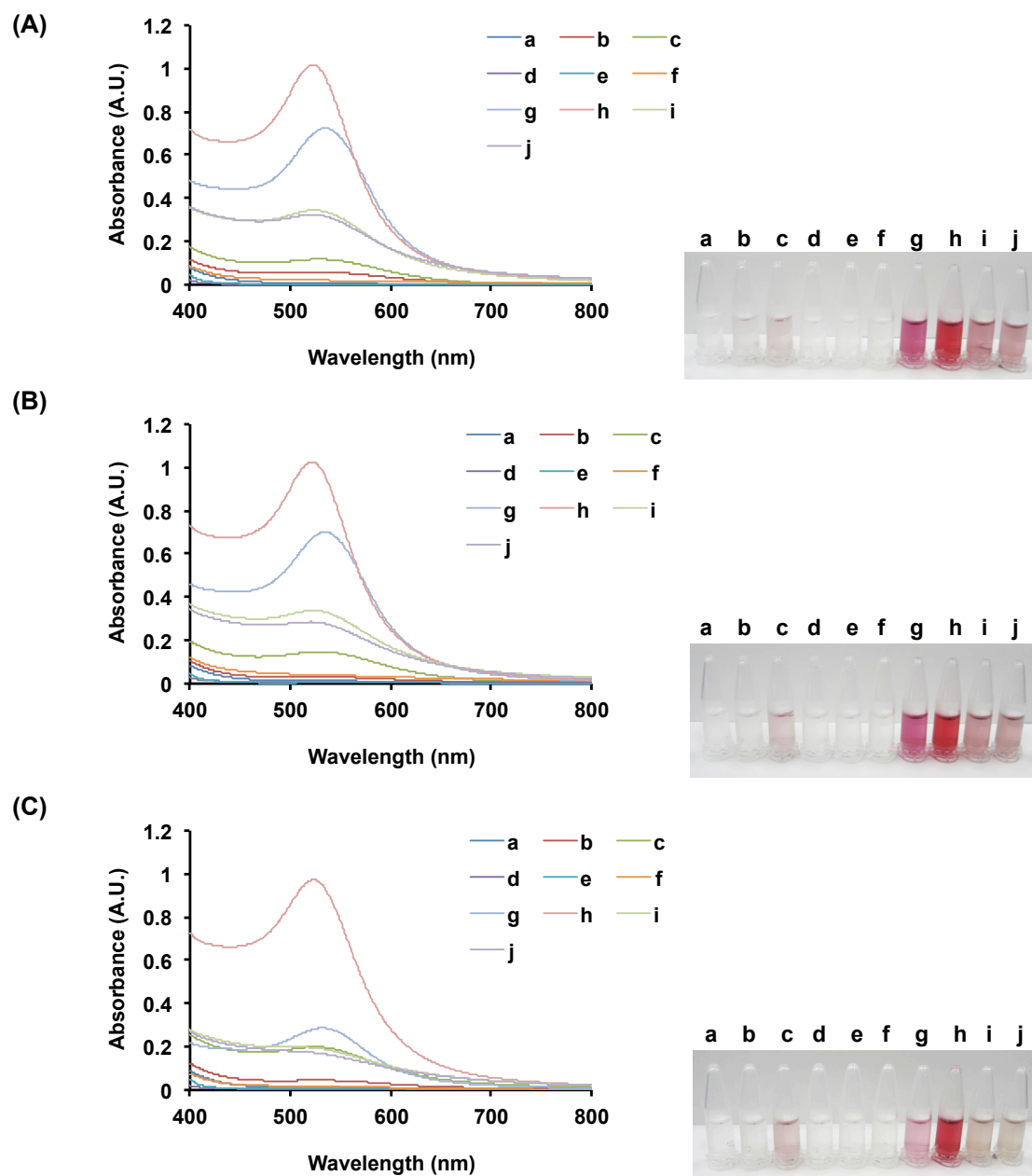


Figure 4-9. 金ナノ粒子形成に及ぼす緩衝液の影響

[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

次に、Gly-NaOH 緩衝液 (pH 9.5) を用いて金ナノ粒子の合成を行った。各 BsGLD (1  $\mu$ M)、 $\text{NAD}^+$  (400  $\mu$ M)、グリセロール (100 mM) が溶解した 50 mM Gly-NaOH (pH 9.5) に  $\text{HAuCl}_4^-$  (0.5 mM) を加え十分に攪拌した後、37°C で 48 時間静置した。得られた金ナノ粒子溶液について、それぞれ UV/Vis 吸光度計および TEM 観察により評価した。結果を Figure 4-10 に示す。pH 9.5 において、pH 10.0 の Gly-NaOH 緩衝液と同様に分散した金ナノ粒子の合成が可能であることが示された。タンパク質 **1**、**2**、**3** の SPR 帯の  $\lambda_{\text{max}}$  値はそれぞれ 530、525、527 nm であった (Figure 4-10A)。

TEM による金ナノ粒子の観察を行った。Figure 3-10B より、各 BsGLD (**1-3**) を用いて調製したサンプルは、平均粒径が  $12.1 \pm 10.8$  nm ( $n = 205$ )、 $12.2 \pm 9.1$  nm ( $n = 169$ )、 $11.6 \pm 9.5$  nm ( $n = 193$ ) の金ナノ粒子であることが示された。

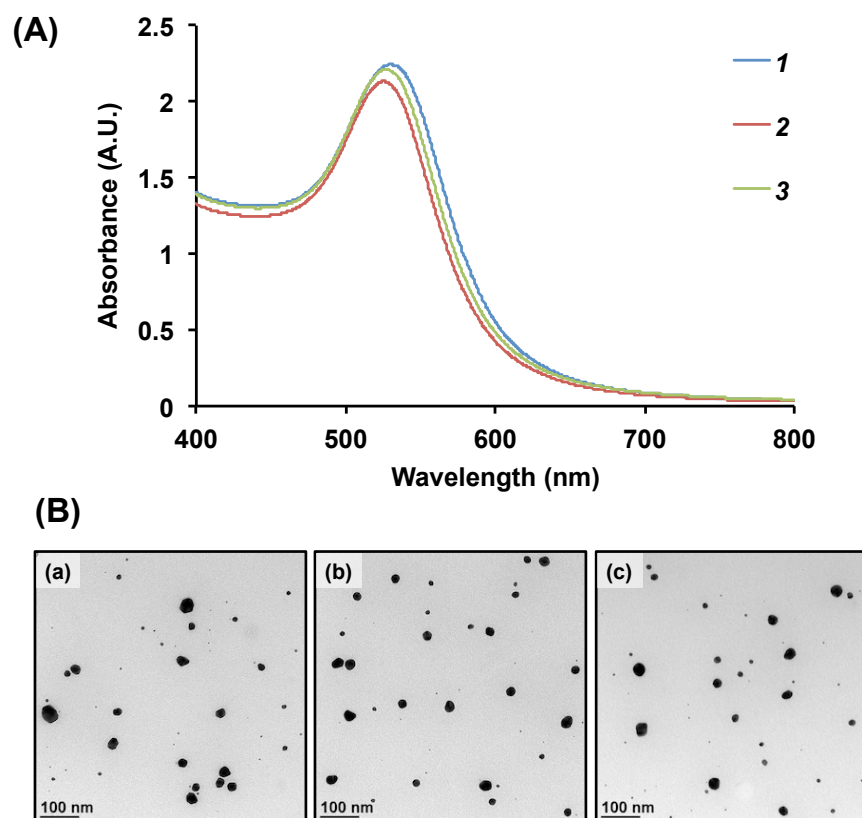


Figure 4-10. BsGLD を介した NADH 補酵素再生系による金ナノ粒子の合成、  
(A) UV/Vis 吸収スペクトル、(B) TEM 像

[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995–5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]



金ナノ粒子の溶液分散性におけるシステイン導入効果を評価した。これまで、システイン残基の導入により、タンパク質の金ナノ粒子への固定化が促進されることが報告されている [R18]。この報告より、本研究において His-tag の隣に導入したシステイン残基が金ナノ粒子の溶液分散性を向上させると考えた。本研究では、塩化ナトリウムにより溶液のイオン強度を上昇させることで、金ナノ粒子の溶液分散性を評価した。その結果、システイン残基を有するタンパク質 **2** および **3** は、システインを有さないタンパク質 **1** と比べ、わずかに高イオン強度溶液における安定性が高いことが示された (Figure 4-11)。しかしながら、システイン導入による十分な効果を示すことはできなかったが、タンパク質 **3** が最も安定に金ナノ粒子表面に固定されていることが明らかとなった。

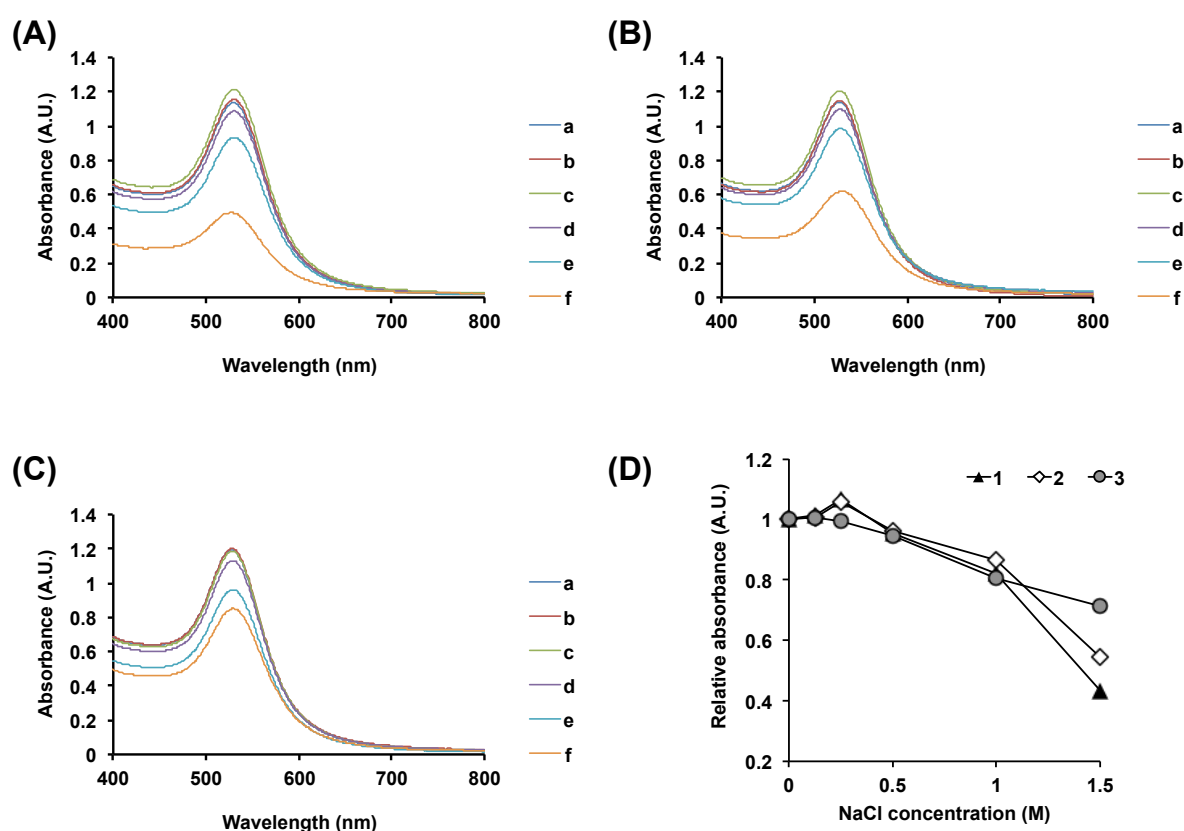


Figure 4-11. 得られた金ナノ粒子のイオン強度に対する安定性評価、(A) タンパク質 **1**、(B) タンパク質 **2**、(C) タンパク質 **3**、(D) 塩化ナトリウム濃度に対する SPR 帯由来の消失スペクトルの関係 (NaCl 濃度: 0 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM, 1 M)

[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995–5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

## 4-2-4. 金ナノ粒上のタンパク質の評価

DLS 測定により調製した金ナノ粒子上のタンパク質の評価を行った。タンパク質 **1-3** により調製した金ナノ粒子の流体力学的な平均粒子径は、それぞれ 40.9、40.8、44.7 nm であった (Table 4-3)。DLS 測定により導出された粒子径が、TEM 像から求めた粒子径よりも、大きな値となったことから、金ナノ粒子表面にタンパク質が吸着していることが示唆された。

次に、表面に結合していると考えられるタンパク質 **3** のプロテイン G の機能を評価するために、ウサギ由来 Anti-OVA 抗体の添加に伴う粒径の変化を DLS 測定により評価した。その結果、タンパク質 **3** において、粒子径が 44.7 nm から 57.1 nm に増大した (Table 4-3, **3-Au NP**)。一方で、プロテイン G を有さないタンパク質 **1** および **2** では、抗体の添加に伴う粒子径の増大は見られなかった (Figure 4-3, **1-Au NP** and **2-Au NP**)。これらの結果より、抗体はタンパク質 **3** の pG 特異的に結合していることが示された。従って、タンパク質 **1-3** は金ナノ粒子上に固定されており、タンパク質 **3** は抗体結合能を保持していることが証明された。

Table 4-3. DLS による金ナノ粒子の粒径変化測定

[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

Entry	1-Au NP	2-Au NP	3-Au NP
Particle size (nm)	40.9 ± 14.6	40.8 ± 13.6	44.7 ± 16.2
PDI	0.155	0.132	0.142
Particle size with IgG (nm)	41.0 ± 16.0	41.4 ± 14.4	57.1 ± 22.2
PDI	0.151	0.132	0.158

Mean ± distribution width,  $n = 3$

加えて、それぞれのタンパク質が金ナノ粒子上に固定化されていることを示すために、100 kDa cutoff の限外濾過膜により精製したタンパク質-金ナノ粒子複合体について、SDS-PAGE を用いた分析を行った。それぞれのタンパク質は、メルカプトエタノールおよび SDS 存在下での熱変性することにより、金ナノ粒子からのタンパク質の脱離を行った。その結果、それぞれのタンパク質の存在が確認されたことから、確かに金ナノ粒子上にタンパク質が固定化されていることが証明された (Figure 4-12)。

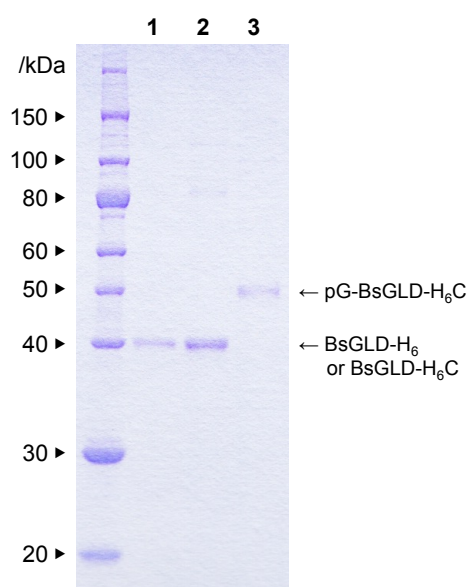


Figure 4-12. SDS-PAGE による金ナノ粒子上のタンパク質の同定

[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

#### 4-2-5. タンパク質被覆金ナノ粒子の機能評価

Table 4-3 の DLS 測定結果により、金ナノ粒子上の pG は抗体結合能を保持していることを示した。そこで、IgG 抗体が固定化後の金ナノ粒子の機能を評価するために、ELISA を行った。モデル抗原として OVA を用い、各タンパク質-金ナノ粒子 (1-3) について評価した。今回構築した ELISA の概要を Figure 4-13 に示す。まず、プレートに抗原タンパク質である OVA を敷き、1% カゼイン Na によりブロッキングし、anti-OVA 抗体 (ウサギ由来) を添加した。次いで、1%カゼイン Na 水溶液で、 $\lambda_{\max, \text{SPR band}}$  の吸光度が 0.05 (a.u.) まで希釈した各タンパク質-金ナノ粒子溶液をプレートにそれぞれ添加した。最後に、HRP 標識 anti-mouse IgG 抗体 (ウサギ由来) を添加し、HRP の反応により生じた生成物を追跡することで各タンパク質-金ナノ粒子の評価を行った。

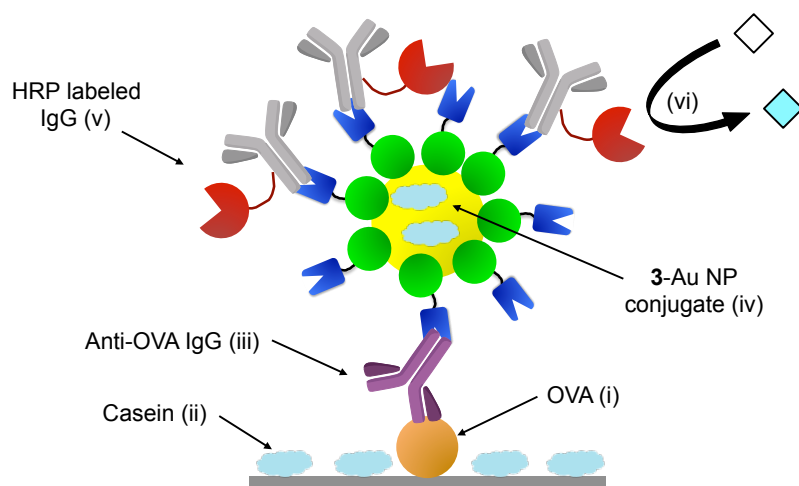


Figure 4-13. 本研究で構築した ELISA の概念図

[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

ELISA による OVA 検出の結果を Figure 4-14 に示す。タンパク質 3-金ナノ粒子複合体において、OVA、抗 OVA 抗体、タンパク質 3-金ナノ粒子がすべて存在する系でのみ、強いシグナルが観測された。一方で、1-、2-金ナノ粒子を用いた系では、シグナルは観測されなかった。これらの結果より、IgG 抗体は 3-金ナノ粒子表面上に特異的に固定化されていることが示された。

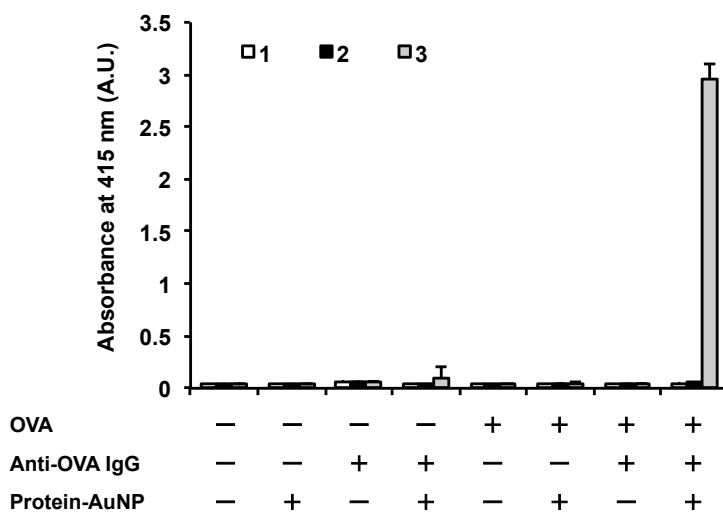


Figure 4-14. 各タンパク質修飾金ナノ粒子を用いた ELISA による OVA の検出

[Reproduced from RSC Advances, 2014, 4, 5995– 5998 with permission of the Royal Society of Chemistry.]

### 4-3. 結語

本章では、酵素反応を利用して、タンパク質修飾金ナノ粒子の1ポット合成を行った。

まず、タンパク質修飾金ナノ粒子合成における、1ポット・1タンパク質成分系を実現するために、異なる三つの機能を有したBsGLDを設計した。それぞれの機能は、(1) プロテインGのB1ドメインによる抗体結合機能、(2) BsGLDによるNADH再生機能、(3) His<sub>6</sub>Cysによる金結合機能である。抗体結合能および金結合能をそれぞれ機能させるために、プロテインGをBsGLDのN末端に、His<sub>6</sub>CysをC末端に導入したキメラタンパク質(pG-BsGLD-H<sub>6</sub>C)を調製した。

次に、調製したキメラタンパク質を用いて、金ナノ粒子の合成を行った。その結果、金ナノ粒子のSPR帯に由来するスペクトルが得られた。また、TEM像からも約12 nmの分散した金ナノ粒子が観察された。この結果より、新たにデザインしたキメラタンパク質を利用することで、水溶液中に高分散した金ナノ粒子の合成が可能であることが示された。

最後に、金ナノ粒子上のpGは抗体結合能を保持していることを確認するために、ELISAによるOVAの検出を行った。その結果、OVA、抗OVA抗体、キメラタンパク質-金ナノ粒子複合体がすべて存在する系でのみ、強いシグナルが観測された。一方で、陰性対照として用いたプロテインGを含まないBsGLDで調製した金ナノ粒子では、OVAの検出によるシグナルは観測されなかった。これらの結果より、IgG抗体はキメラタンパク質を介して金ナノ粒子表面上に固定化されていることが示され、1ポット・1タンパク質成分系の概念実証に成功した。

#### 4-4. 実験操作

##### 4-4-1. 試薬

- The plasmid (pUC18) coding in N-His BsGLD: Integrated DNA technologies, Inc. (Coralville, IA, USA)
- DNA fragment coding B1 domain of protein G: Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
- Ni-NTA column (HisTrap HP column 5 mL): GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
- PD-10 column: GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
- Bicinchoninic acid (BCA) assay kit: Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
- Centrifugal filter unit for ultrafiltration (Amicon<sup>®</sup> Ultra): Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
- $\beta$ -nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized form (NAD<sup>+</sup>): Oriental Yeast Co., ltd. (Tokyo, Japan)
- Hydrogen tetrachloroaurate (III) tetrahydrate: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan)
- Cu TEM grid covered by elastic carbon film (20–25 nm): Oken Shoji (Tokyo, Japan)
- 96-well Nunc Maxisorp flat-bottom plate: Nunc (Rochester, NY, USA)
- Bovine casein (sodium salt): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Casein Na: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Ovalbumin (OVA): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Rabbit anti-OVA IgG: Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA)
- Horseradish peroxidase (HRP)-labeled rabbit anti-mouse IgG antibody: Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA)
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

All other reagents were commercially available, and were of analytical grade.

##### 4-4-2. 測定機器

- BioLogic DuoFlow Chromatography System: Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
- UV/Vis spectroscopy: Ubest V-570, JASCO (Tokyo, Japan)
- Transmission electron microscopy (TEM): JEM-2010 instrument, JEOL (Tokyo, Japan)
- Hydrophilization treatment instrument for TEM grid: HDT-400, JEOL (Tokyo, Japan)
- Dynamic light scattering (DLS) instrument: Zetasizer Nano-ZS, Malvern (Worcestershire, UK)
- Atomic absorption spectroscopy (AAS): AA-7000, Shimadzu (Kyoto, Japan)
- Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES): Optima 5300 DV, Perkin Elmer, Inc. (Waltham, MA, USA)
- Microplate washer: ImmunoWash 1575, Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
- Microplate reader: PowerWave X, BioTek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA)

## 4-4-3. 発現用プラスミドの構築

pUC BsGLD は、Integrated DNA technologies 社に委託合成した。pET22b+ H<sub>6</sub>-BsGLD の調製スキームを Figure 4-15 に示す。pUC entry 1 および pET22b+ を制限酵素 *Nde* I、*Hind* III により切断した。pET22b+ に関しては、制限酵素処理後、仔ウシ腸由来アルカリフォスファターゼによる脱リン酸化反応を行った。その後、H<sub>6</sub>-BsGLD および pET22b+ の制限酵素処理断片 DNA を混合し、DNA リガーゼによるライゲーション反応を行うことで、pET22b+ H<sub>6</sub>-BsGLD を得た。調製した pET22b+ entry 1 は大腸菌 (JM109 株) へ形質転換し、-80°C で保存した。

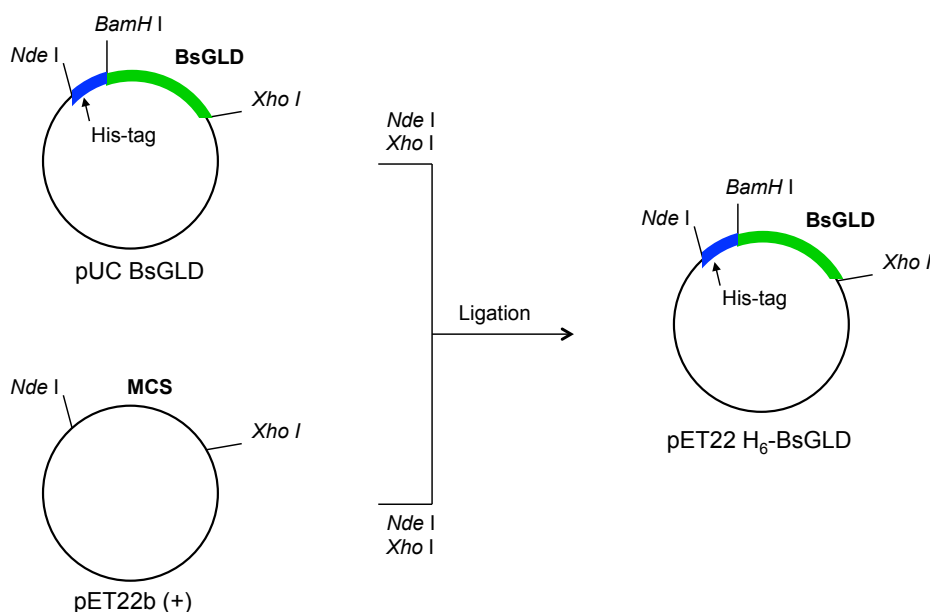
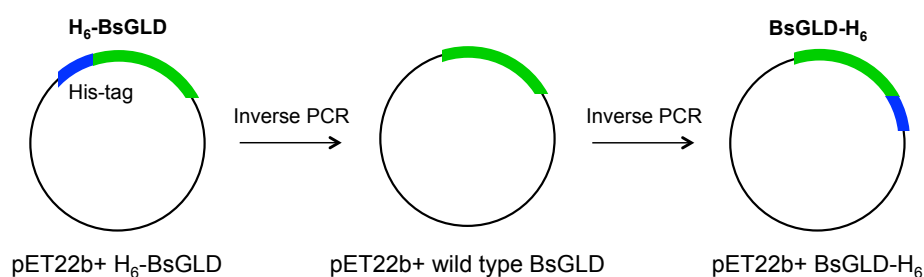


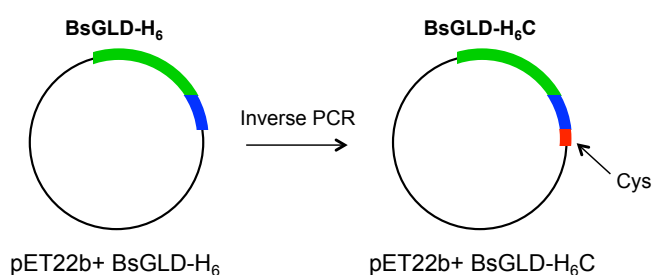
Figure 4-15. pET22b+ N-His BsGLD の構築

本研究では、His タグおよびシステインが金ナノ粒子の形成と表面への結合に及ぼす影響を評価するために、様々な BsGLD を調製したが、本論文では BsGLD-H<sub>6</sub> (entry 1)、BsGLD-H<sub>6</sub>C (entry 2)、pG-BsGLD-H<sub>6</sub>C (entry 3) について行った実験について纏めている。

pET22b+ H<sub>6</sub>-BsGLD から pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>C を調製した。その調製スキームを Figure 4-16 に示す。本実験の遺伝子組換え操作に使用したプライマーのリストは Table 4-4 に示す通りである。まず、pET22b+ H<sub>6</sub>-BsGLD を鋳型として、Primer 1 および Primer 2 を用いたインバース PCR 法により、pET22b+ wild type BsGLD を得た。次いで、Primer 3 および Primer 4 を用いたインバース PCR 法により、pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub> を得た。調製した pET22b+ wild type BsGLD および pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub> は大腸菌 (JM109 株) へ形質転換し、-80°C で保存した。

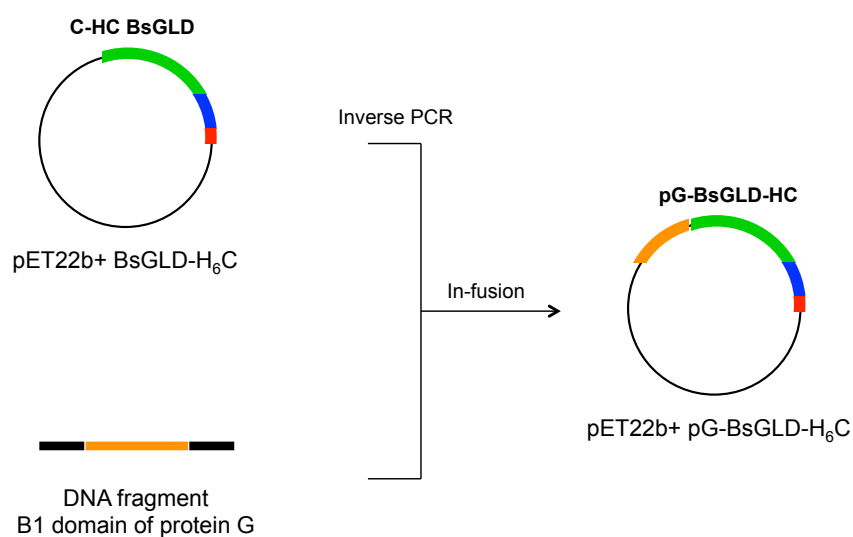
Figure 4-16. pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>の構築

pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>Cは、pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>を鋳型DNAとして、Primer 5およびPrimer 6を用いたインバースPCR法により調製した (Figure 4-17)。調製した pET22b+ wild type BsGLD および pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>は大腸菌 (JM109 株) へ形質転換し、-80°Cで保存した。

Figure 4-17. pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>Cの構築

pET22b+ pG-BsGLD-H<sub>6</sub>Cは、pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>Cに対してプロテインG (B1 ドメイン) をコードしたDNA断片をin-fusionクローニングにより導入することで調製した (Figure 4-18)。プロテインGのDNA断片は、Life technologies社に委託合成することで得た。次に、pET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>Cを鋳型DNAとしてPrimer 7およびPrimer 8を用いてインバースPCR法にて線状化した。プロテインGのDNA断片と線状化したpET22b+ BsGLD-H<sub>6</sub>Cをin-fusionクローニングにより連結させることでpET22b+ pG-BsGLD-H<sub>6</sub>Cを得た。調製したpET22b+ pG-BsGLD-H<sub>6</sub>Cは、大腸菌 (JM109 株) へ形質転換し、-80°Cで保存した。



Figure 4-18. pET22b+ pG-BsGLD-H<sub>6</sub>C の構築

調製した各 BsGLD の全アミノ酸配列を以下に示す。また、各 BsGLD 調製に用いたプライマー配列を Table 4-4 に示す。

Table 4-4. 組換えタンパク質調製に用いたプライマーリスト

Entry	DNA sequence
1 (for <b>WT</b> )	5'-GGA TCC GAA AAC CTG TAT TTC CAA GG-3' (26 mer)
2 (for <b>WT</b> )	5'-CAT ATG TAT ATC TCC TTC TTA AAG TTA AAC AAA ATT-3' (36 mer)
3 (for entry 1)	5'- <u>CAC CAT CAT</u> TAA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA-3' (the His-tag is underlined, 39 mer)
4 (for entry 1)	5'- <u>GTG ATG GTG</u> CTT GCG ATG TTT TTC TTT ATA CGC-3' (the His-tag is underlined, 33 mer)
5 (for entry 2)	5'-TAA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CC-3' (35 mer)
6 (for entry 2)	5'- <u>GCA</u> ATG ATG GTG GTG ATG GTG CTT GCG ATG TTT TTC-3' (the cysteine is underlined, 36 mer)

調製した各 BsGLD (Entry 1-3) の全アミノ酸配列を以下に示す。

Entry 1: BsGLD-His<sub>6</sub>

MGSENYLFQGGGGSGGGSMAAERVFISPAKYVQGKNVITKIANYLEGIGNKTVVIADEIVWKIAGHTIVN  
ELKKGNIAAEEVFSGEASRNEVERIANIARKAEAAIVIGVGGGKTLDTAKAVADELDAYIVIVPTAASTD  
APTSALSVIYSDDGVFESYRFYKKNPDLVLVDTKIIANAPRLLASGIADALATWVEARSVIKSGGKT  
MAGGIPTIAAEAIAEKCEQTLFKYGKLAYESVKAKVVTPALEAVVEANTLLSGLGFESGGLAAAHAIHNGFTA  
LEGEIHHLTHGEKVAFGTLVQLALEEHSQQEIERYIELYLSLDLPVTLEDIKLKDASREDILKVAKAATAE  
GETIHNAFNVTADDVADAIFAADQYAKAYKEKHKRHHHHHHH

Entry 2: BsGLD-His<sub>6</sub>Cys

MGSENYLFQGGGGSGGGSMAAERVFISPAKYVQGKNVITKIANYLEGIGNKTVVIADEIVWKIAGHTIVN  
ELKKGNIAAEEVFSGEASRNEVERIANIARKAEAAIVIGVGGGKTLDTAKAVADELDAYIVIVPTAASTD  
APTSALSVIYSDDGVFESYRFYKKNPDLVLVDTKIIANAPRLLASGIADALATWVEARSVIKSGGKT  
MAGGIPTIAAEAIAEKCEQTLFKYGKLAYESVKAKVVTPALEAVVEANTLLSGLGFESGGLAAAHAIHNGFTA  
LEGEIHHLTHGEKVAFGTLVQLALEEHSQQEIERYIELYLSLDLPVTLEDIKLKDASREDILKVAKAATAE  
GETIHNAFNVTADDVADAIFAADQYAKAYKEKHKRHHHHHHHC

Entry 3: pG-BsGLD-His<sub>6</sub>Cys

MWSHPQFEKGYSTYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEG  
SENYLFQGGGGSGGGSMAAERVFISPAKYVQGKNVITKIANYLEGIGNKTVVIADEIVWKIAGHTIVNEL  
KKGNIAAEEVFSGEASRNEVERIANIARKAEAAIVIGVGGGKTLDTAKAVADELDAYIVIVPTAASTDAP  
TSALSVIYSDDGVFESYRFYKKNPDLVLVDTKIIANAPRLLASGIADALATWVEARSVIKSGGKT  
MAGGIPTIAAEAIAEKCEQTLFKYGKLAYESVKAKVVTPALEAVVEANTLLSGLGFESGGLAAAHAIHNGFTA  
LEGEIHHLTHGEKVAFGTLVQLALEEHSQQEIERYIELYLSLDLPVTLEDIKLKDASREDILKVAKAATAE  
GETIHNAFNVTADDVADAIFAADQYAKAYKEKHKRHHHHHHHC

#### 4-4-4. プロテイン G 融合タンパク質の調製

各 BsGLD (1-3) をコードしたプラスミド DNA は *Escheria coli* BL21 (DE3) 株に形質転換し、100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む寒天培地でシングルコロニーを単離した。その後、100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む LB 培地 10 mL に植菌し、37°C で一晩震盪培養を行った。次いで、培地溶液を 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む LB 培地 1 L に全て添加し、OD<sub>600</sub> 値が 0.5-0.6 まで 37°C で震盪培養した。次いで、isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度で 0.5 mM となるように培養液へと添加した。IPTG 添加後、25°C、200 rpm、16 時間でタンパク質の発現を行った。その後、菌体を遠心分離 (6,000g、10 min) で集菌し、洗浄バッファー(10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、EDTA 1 mM、pH 8.0) に再分散、遠心分離による回収の操作を 3 回繰り返して、洗浄を行った。洗浄後、再び洗浄バッファー 25 mL に再分散させ、液体窒素で凍結ならびに -80°C で保存した。凍結させた菌懸濁液を溶解させ、氷浴上でソニケーションすることで大腸菌を破碎した。その後、20,400g、15 min で遠心分離を行い、無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を、0.45 および 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過した。各 BsGLD (1-3) は Ni-NTA カラムにて精製を行った。カラム精製は、BioLogic DuoFlow Chromatography System にて行った。精製後のタンパク質は、PD10 カラムにて 20 mM Tris-HCl へとバッファー交換をした。タンパク質の濃度は BCA 法により算出した。また、タンパク質の精製度は、SDS-PAGE にて確認した。

#### 4-4-5. 様々な溶液条件における各 BsGLD の活性評価

##### 活性測定

酵素反応は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中に、終濃度が 400  $\mu\text{M}$ 、100 mM となるように NAD<sup>+</sup>、glycerol を加え、それらをよく攪拌し、25°C で 5 分間静置後、1  $\mu\text{M}$  となるように BsGLD を加え、活性測定を行った。各 BsGLD の触媒活性は、反応によって生成する NADH の 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) の吸収を測定することにより評価した。

##### pH 依存性

BsGLD 反応における pH の影響は、各 50 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0-7.5)、Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0-9.5)、Glycine-NaOH 緩衝液 (pH 8.0-11.0)、炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 10.5-11.0) を用いて評価した。各 50 mM 緩衝液中に、終濃度が 400  $\mu\text{M}$ 、100 mM となるように NAD<sup>+</sup>、glycerol を加え、それらをよく攪拌し、25°C で 5 分間静置後、1  $\mu\text{M}$  となるように BsGLD を加え、活性測定を行った。GLD の触媒活性は、反応によって生成する NADH の 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) の吸収を測定することにより評価した。

#### 4-4-6. タンパク質修飾金ナノ粒子の調製

##### 調製手順

NAD<sup>+</sup> (400 μM)、グリセロール (100 mM) が溶解した 50 mM のグリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.5) に対して、BsGLD (1-3) を終濃度でそれぞれ 1 μM となるように添加した。次いで、HAuCl<sub>4</sub> 水溶液を 0.5 mM となるように添加し、37°C で 24-48 時間静置することでタンパク質修飾金ナノ粒子を得た。得られた金ナノ粒子溶液は、UV/Vis 吸収スペクトル測定により評価した。

##### タンパク質金ナノ粒子の精製

得られた金ナノ粒子は、遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) を用いて 4°C 下で 4000g、3 分間遠心した。残渣に対して、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を添加し、再分散後に遠心分離する操作を 3 回行うことでタンパク質修飾金ナノ粒子と、未吸着のタンパク質および過剰の金イオンの分離を行った。

##### 金ナノ粒子形成に及ぼす緩衝種および pH の影響

BsGLD 反応による金ナノ粒子合成における緩衝液の影響は、各 50 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0-7.5)、Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0-9.5)、Glycine-NaOH 緩衝液 (pH 8.0-11.0)、炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 10.5-11.0) を用いることにより評価した。NAD<sup>+</sup> (400 μM)、グリセロール (100 mM) が溶解した 50 mM の各種緩衝液 (pH 9.5) に対して、BsGLD (1-3) を終濃度でそれぞれ 1 μM となるように添加した。次いで、HAuCl<sub>4</sub> 水溶液を 0.25 mM となるように添加し、37°C で 48 時間静置することでタンパク質修飾金ナノ粒子を得た。得られた金ナノ粒子溶液は、UV/Vis 吸収スペクトル測定により評価した。

#### 4-4-7. タンパク質修飾金ナノ粒子の評価

##### TEM 観察

TEM 観察には炭素が被服された銅製のグリッドを親水化処理したものをを用いた。サンプルをキャスト後、陰圧下で乾燥を行った後、加速電圧 120 kV で TEM 観察を行った。金ナノ粒子の平均粒径は *ImageJ* にて見積もった。

##### DLS 測定

Zetasizer Nano-ZS (Malvern 社) を用い、25°C の条件下で動的光散乱測定を行った。測定結果から、平均粒子径 (mean particle size)、多分散度 (poly dispersion index, PDI)、粒子径の分布幅 (distribution width) を得た。

##### SDS-PAGE による金ナノ粒子上のタンパク質の同定

金ナノ粒子に結合したタンパク質は SDS-PAGE にて評価した。BsGLD-金ナノ粒子複合体の溶液は、遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) を用いて、4,000g、3 分間遠心操作を行った。残渣のタンパク

質-金ナノ粒子複合体の溶液を SDS 2×サンプルバッファー (0.25 Tris-HCl (pH 6.8)、4 wt% SDS、20 wt%グリセロール、0.01 wt%プロモチモールブルー、12 wt% 2-メルカプトエタノール) に加え、94°C で 30 分間熱処理することで、金ナノ粒子からのタンパク質の脱離および変性を行った。熱変性させた溶液を 12.5%SDS ポリアクリルアミドゲルに添加した。

#### 4-4-8. ELISA 法による金ナノ粒子上のプロテイン G の機能評価

BsGLD 酵素反応によりタンパク質修飾金ナノ粒子はを調製した。詳細は 3-4-5 に記載した通りである。酵素反応開始から 48 時間後のサンプルを遠心式フィルターユニット (100 kDa MWCO) にて精製した。洗浄に用いた緩衝液は 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) である。金ナノ粒子の濃度は、原子吸光光度計、誘導結合プラズマ発光分光分析装置、UV/Vis 吸収スペクトル測定にて算出した。タンパク質-金ナノ粒子複合体は、1%カゼイン Na が溶解した PBS 緩衝液 (pH 7.4) を用いて、 $\lambda_{\max, \text{SPR band}}$  の吸光度が 0.05 (a.u.) となるように希釈した。

- (1) 96 穴イムノプレート (Nunc Inc., Denmark) に 5.0 mg/mL の OVA を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、4°C で一晩静置し、その後 0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (2) 1% Casein Na (in PBS) を 200  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し、37°C で 2 時間静置後、0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (3) Anti-OVA (Rabbit) IgG 抗体を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、37°C で 2 時間静置後、0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (4) GLD 酵素法によって調製した金ナノ粒子溶液サンプルを 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、37°C で 2 時間静置後、0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (5) HRP 標識 Anti-guinea pig IgG 抗体を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、37°C で 2 時間静置後、0.1% PBST で洗浄した (5 times/well)。
- (6) HRP 反応溶液を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、37°C で 370 nm における吸光度 (O.D.) の時間変化を測定した。
- (7) 30 min 後、1 M HCl を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、HRP 酵素反応を停止させた後、37°C で 450 nm における吸光度 (O.D.) を測定した。

## 4-5. 参考文献

- [1] Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* **2006**, 311, 622–627
- [2] Lynch, I.; Dawson, K. A. Protein-Nanoparticle Interactions. *Nano Today* **2008**, 3, 40–47
- [3] Norde, W. Protein Adsorption at Solid-Surfaces: A Thermodynamic Approach. *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 491–496
- [4] Norde, W. Driving Forces for Protein Adsorption at Solid Surfaces. *Macromol. Symp.* **1996**, 103, 5–18
- [5] Lindman, S.; Lynch, I.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. Systematic Investigation of the Thermodynamics of HSA Adsorption to N-iso-propylacrylamide/N-tert-butylacrylamide Copolymer Nanoparticles. Effects of Particle Size and Hydrophobicity. *Nano Lett.* **2007**, 7, 914–920
- [6] De, M.; You, C. C.; Srivastava, S.; Rotello, V. M. Biomimetic Interactions of Proteins with Functionalized Nanoparticles: A Thermodynamic Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10747–10753
- [7] Simberg, D.; Park, J. H.; Karmali, P. P.; Zhang, W. M.; Merkulov, S.; McCrae, K.; Bhatia, S. N.; Sailor, M.; Ruoslahti, E. Differential Proteomics Analysis of the Surface Heterogeneity of Dextran Iron Oxide Nanoparticles and the Implications for Their In Vivo Clearance. *Biomaterials* **2009**, 30, 3926–3933
- [8] Chakraborty, S.; Joshi, P.; Shanker, V.; Ansari, Z. A.; Singh, S. P.; Chakrabarti, P. Contrasting Effect of Gold Nanoparticles and Nanorods with Different Surface Modifications on the Structure and Activity of Bovine Serum Albumin. *Langmuir* **2011**, 27, 7722–7731
- [9] Lacerda, S. H. D. P.; Park, J. J.; Meuse, C.; Pristiniski, D.; Becker, M. L.; Karim, A.; Douglas, J. F. Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACS Nano* **2010**, 4, 365–379
- [10] Vroman, L.; Adams, A. L.; Fischer, G. C.; Munoz, P. C. Interaction of high molecular-weight kininogen, factor-Xii, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood* **1980**, 55, 156–159
- [11] Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McLeland, C. B.; Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. Nanoparticle Interaction with Plasma Proteins As It Relates to Particle Biodistribution, Biocompatibility and Therapeutic Efficacy. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, 61, 428–437
- [12] Nakanishi, K.; Sakiyama, T.; Imamura, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, 91, 233–244
- [13] Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, 8, 543–557
- [14] Ruzheinikov, S. N.; Burke, J.; Sedelnikova, S.; Baker, P. J.; Taylor, R.; Bullough, P. A.; Muir, N. M.; Gore, M. G.; Rice, D. W. Glycerol Dehydrogenase: Structure, Specificity, and Mechanism of a Family III Polyol Dehydrogenase. *Structure* **2001**, 9, 789–802
- [15] Mallinder, P. R.; Pritchard, A.; Moir, A. Cloning and Characterization of a Gene from *Bacillus Stearothermophilus* var. *Non-Diastaticus* Encoding a Glycerol Dehydrogenase. *Gene*, **1992**, 110, 9–16

- [16] Burke, J.; Ruzheinikov, S. N.; Sedelnikova, S.; Baker, P. J.; Holmes, D.; Muir, N. M.; Gore, M. G.; Rice, D. W. Purification, Crystallization and Quaternary Structure Analysis of a Glycerol Dehydrogenase S305C Mutant from *Bacillus Stearothermophilus*. *Acta Crystallogr. D.*, **2001**, 57, 165–167
- [17] Spencer, P.; Bown, K. J.; Scawen, M. D.; Atkinson, T.; Gore, M. G. Isolation and Characterization of the Glycerol Dehydrogenase from *Bacillus Stearothermophilus*. *Biochim Biophys Acta.* **1989**, 994, 270–279
- [18] Reddy, M. V.; Pyle, J. E.; Howe, H. B. Purification and Properties of NAD<sup>+</sup>-Linked Glycerol Dehydrogenase from *Neurospora Crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **1978**, 107, 289–296

## 第5章 結論

以下に各章において得られた知見と、各章の概略、今後の展望についてそれぞれ述べる。

第2章では、グリセロールデヒドロゲナーゼ (GLD) による補酵素再生系により産出された nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) を還元剤として利用することで、金ナノ粒子の調製を試みた。さらに、GLD を過剰発現させた大腸菌を用いて菌体内において金ナノ粒子の合成を試みた。

まず、大腸菌由来 Glycerol dehydrogenase (GLD) を用いて NADH 補酵素再生系を構築した。GLD 遺伝子をコードする発現用プラスミドベクターは、九州大学農学研究院一瀬博文博士により構築されたものを用いた。大腸菌で GLD を発現した後、アフィニティーカラムにより精製し、続く金ナノ粒子の調製で用いた。その結果、グリセロールおよび  $\text{NAD}^+$  の共存下、GLD 酵素が NADH の再生を触媒する条件でのみ、金イオンからの金ナノ粒子合成が進行することが明らかとなった。このことから、NADH が金イオンの還元に関与していることが強く示唆され、酵素反応をトリガーとした金ナノ粒子の調製に成功した。

次に、GLD 遺伝子をコードしたプラスミドを大腸菌へ形質転換し、IPTG により GLD を誘導発現させた大腸菌を調製した。陰性対照として、IPTG 誘導を行わずに調製した大腸菌も準備した。これら2種類の大腸菌を用いて、金ナノ粒子の調製を行った。その結果、IPTG 誘導およびグリセロール、 $\text{NAD}^+$  を添加したサンプルで金ナノ粒子に由来する消失スペクトルが確認された。さらに、IPTG 誘導およびグリセロールのみを添加したサンプルにおいても同様に金ナノ粒子の形成が確認された。一方で、IPTG 誘導を行っていないサンプルや、グリセロールを添加していないサンプルにおいては金ナノ粒子の形成は見られなかった。このことから、GLD 酵素反応によって生じる NADH により金ナノ粒子の形成が起こったと考えられる。さらに、IPTG 誘導およびグリセロールを添加し、 $\text{NAD}^+$  を添加していないサンプルにおいても金ナノ粒子の形成が見られたことから、大腸菌に内在する  $\text{NAD}^+$  が利用されることで金ナノ粒子の形成が起こったことが示唆された。すなわち、大腸菌細胞質においても GLD 酵素反応を利用した金ナノ粒子の合成を実現可能であることが示された。

最後に、金ナノ粒子合成後の大腸菌の TEM 観察からも、金ナノ粒子は大腸菌内部でできていることが示唆された。これにより大腸菌内で酵素反応に連動した金ナノ粒子の調製が可能であることを明らかにし、大腸菌へのバイオミネラリゼーション機能の付与に成功した。

以上より、本章では酸化還元酵素である GLD を利用し、生体内電子伝達物質である NADH 再生系により、酵素反応を利用した金ナノ粒子の調製に成功した。また、大腸菌に GLD を発現させることで、大腸菌に金ナノ粒子合成機能を付与することに成功した。大腸菌内部空間を利用した金ナノ粒子の合成は、目的のタンパク質を細胞内で金ナノ粒子に固定化できる可能性があり、タンパク質修飾金ナノ粒子の新たな合成経路となり得ると期待される。



第3章では、第2章で示した GLD 酵素反応による金ナノ粒子合成を発展させることを目的とし、金結合ペプチドを融合した機能性タンパク質を補酵素再生系に組み込むことで、タンパク質修飾金ナノ粒子のワンポット合成を試みた。

まず、3つの異なる機能（精製用タグとしてヘキサヒスチジンタグ (His-tag) およびグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、抗体結合ドメインとしてプロテイン G およびプロテイン A、金結合ペプチドとして A3 ペプチド) を有する機能性タンパク質をデザインした。また、各ドメインが金ナノ粒子の形成や結合に与える影響を評価するために、A3 ペプチドを欠損させたタンパク質および精製用タグを欠損させたタンパク質も調製し、評価に用いた。

次に、各 pG<sub>2</sub>pA タンパク質を用いて金ナノ粒子の合成を試みた。その結果、3つの異なる全ての機能を有する pG<sub>2</sub>pA タンパク質を加えたサンプルにおいて、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴 (SPR) 帯に由来する吸収が確認された。一方で、A3 ペプチドのみを欠損させた pG<sub>2</sub>pA タンパク質を添加したサンプルでは金ナノ粒子の凝集に由来する SPR 帯が確認された。また、異なる構造を有する pG<sub>2</sub>pA タンパク質を用いて、pG<sub>2</sub>pA タンパク質の各部位が金ナノ粒子の形成に及ぼす影響を評価した。その結果、全てのサンプルにおいて、溶液は赤く呈色し、分散した金ナノ粒子に特徴的な SPR 帯が確認された。A3 ペプチドのみを欠損させた pG<sub>2</sub>pA タンパク質が存在する溶液において、金ナノ粒子の形成が阻害された原因は不明であるが、全ての機能を有するタンパク質の存在下では金ナノ粒子の形成が見られたことから、A3 ペプチドは金ナノ粒子の形成を促進していることが示唆された。また、A3 ペプチドは得られる金ナノ粒子の溶液分散性を高めることが明らかとなった。

次に、金ナノ粒子に結合したタンパク質と、未結合のタンパク質を限外濾過により分離し、得られた金ナノ粒子上にどの程度 pG<sub>2</sub>pA タンパク質が結合しているかを SDS-PAGE によって見積もった。その結果、金ナノ粒子上には His-tag を有する pG<sub>2</sub>pA タンパク質と GLD (His-tag を含有) が主に結合していることが明らかとなった。この結果から、His-tag が金ナノ粒子へのタンパク質の固定化に強く影響していることが示唆された。一方で、His タグと GST を欠損させた pG<sub>2</sub>pA タンパク質の共存下で調製した金ナノ粒子については、pG<sub>2</sub>pA タンパク質由来の明瞭なバンドは見られず、GLD 由来のバンドのみが確認された。また、GST のみを欠損させたタンパク質の共存下で調製した金ナノ粒子については、pG<sub>2</sub>pA と GLD に対応する二つのバンドが確認された。従って、A3 ペプチドは金ナノ粒子表面と相互作用するが、His-tag の方がその相互作用は強く、最終的には His-tag が金ナノ粒子表面に特異的に結合することが明らかとなった。以上の結果から、本章で調製した pG<sub>2</sub>pA タンパク質は、A3 ペプチドよりも寧ろ His-tag により金ナノ粒子へ固定化されていることが示唆された。これにより、A3 ペプチドだけでは、金ナノ粒子上への安定な固定化は困難なことが明らかとなった。

最後に、金ナノ粒子への pG<sub>2</sub>pA ドメインの安定かつ配向性を持った固定化を達成するために、pG<sub>2</sub>pA タンパク質への Cys 残基の導入を行った。Cys 残基中のチオールは金と強固な Au-S 結合を形成する。その結果、pG<sub>2</sub>pA タンパク質の C 末端にシステイン残基を導入することにより、金ナノ粒子へのタンパク質の固定化が改善されるということが明らかとなった。

以上より、本章では GLD 酵素反応と機能性タンパク質の二成分系により、タンパク質修飾金ナノ粒子

の一段階合成に成功した。さらに、タンパク質へ付与したペプチドタグが金ナノ粒子の形成とタンパク質の固定化に関する影響を評価したところ、A3 ペプチドは金ナノ粒子との相互作用を示し、その溶液分散性を向上させるが、His-tag と比べ金表面との相互作用は弱いことを明らかとした。今後、タンパク質の特定の部位やペプチドタグと無機表面との相互作用を明らかにすることで、バイオミネラリゼーションの更なる発展と、より高度なナノ構造体のボトムアップ合成に寄与できると考えられる。

第4章では、新たに *Bacillus stearothermophilus* 由来 GLD (BsGLD) を選択し、プロテイン G (pG) との融合タンパク質 (pG-BsGLD) とすることで、タンパク質修飾金ナノ粒子合成における、1 ポット・1 タンパク質成分系を試みた。BsGLD は結晶構造が明らかとなっている点で、大腸菌由来 GLD と比べてより合理的な融合タンパク質の設計が可能である。加えて、*B. stearothermophilus* は好熱菌であるので、大腸菌由来 GLD と比べて高い安定性が期待できる。また、第3章で得られた知見をもとに、新たに His と Cys から成る金結合ペプチドタグ (His<sub>6</sub>Cys) を設計し、pG-BsGLD へ導入することで、一種類の組換えタンパク質による金ナノ粒子の合成とその表面修飾を同時に実現する系の構築を目指した。

まず、タンパク質修飾金ナノ粒子合成における、1 ポット・1 タンパク質成分系を実現するために、異なる三つの機能を有した BsGLD を設計した。それぞれの機能は、(1) プロテイン G の B1 ドメインによる抗体結合機能、(2) BsGLD による NADH 再生機能、(3) His<sub>6</sub>Cys による金結合機能である。抗体結合能および金結合能をそれぞれ機能させるために、プロテイン G を BsGLD の N 末端に、His<sub>6</sub>Cys を C 末端に導入したキメラタンパク質 (pG-BsGLD-H<sub>6</sub>C) を調製した。

次に、調製したキメラタンパク質を用いて、金ナノ粒子の合成を行った。その結果、金ナノ粒子の SPR 帯に由来するスペクトルが得られた。また、TEM 像からも約 12 nm の分散した金ナノ粒子が観察された。この結果より、新たにデザインしたキメラタンパク質を用いて、水中に高分散した金ナノ粒子の合成が可能であることが示された。

最後に、金ナノ粒子上の pG が抗体結合能を保持していることを確認するために、ELISA による抗原 (OVA) の検出を行った。その結果、OVA、抗 OVA IgG 抗体、キメラタンパク質-金ナノ粒子複合体がすべて存在する系でのみ、強いシグナルが観測された。一方で、陰性対照として用いたプロテイン G を含まない BsGLD で調製した金ナノ粒子では、OVA の検出によるシグナルは観測されなかった。これらの結果より、IgG 抗体はキメラタンパク質を介して金ナノ粒子表面上に固定化されていることが示された。

以上の結果より、BsGLD の高次構造情報を基に、機能性タンパク質と金結合ペプチドの双方を遺伝子工学的手法により融合させた新規キメラタンパク質を調製することで、単一タンパク質成分によるタンパク質修飾金ナノ粒子の一段階合成に成功した。

以上、本論文では生物のバイオミネラリゼーション機能に着目し、酵素反応より産出される NADH を電子供与源とした金ナノ粒子の合成と、機能性タンパク質修飾による高機能化に関する研究を行った。

以下に今後の展望について述べる。

自然界に見られるバイオミネラリゼーションは、温和な条件で反応が進行することや、ナノレベルで制御された材料が調製可能であるため、ナノバイオテクノロジー分野において注目される技術である。酵素触媒を利用した金属イオン還元概念は、I. Willner らにより提唱され、これまでバイオセンサーのデザインに対して新しい示唆を与えてきた。本論文の第2章で述べた、酸化還元酵素反応による金ナノ粒子の合成と、酵素発現による大腸菌への鉱物化機能の付与は、酸化還元酵素がナノ材料の新たな合成経路を提供し得ることを示し、ナノバイオテクノロジー分野の発展に寄与できるものと考えられる。しかし、本手法で調製された金ナノ粒子は、化学還元により合成されたものと比べ、粒径分布が広く、反応時間が長いなど欠点が見られる。酵素触媒によるナノ材料の合成は、新たな合成手法としては注目に値するが、実用性を考えた場合、化学的手法が第一選択肢であることに変わりはない。そこで、今後の展開として、自然界のバイオミネラリゼーションに見られるように、有機-無機複合材料の調製へと移行することが必要であると考えられる。例えば、タンパク質や DNA の自己組織化による鋳型を利用することで、一次元から三次元のナノ構造体を調製するなど、より積極的に生体分子の特性を利用した方向へと展開することが必要であろう。大腸菌内でナノ粒子を調製できたことから、金ナノ粒子を内包した大腸菌そのものを電極などへ利用することが考えられる。また、本研究においては、酸化還元酵素のみを扱ったが、その他にも加水分解酵素や翻訳後修飾酵素など様々な酵素により産出される生成物を利用としたナノ材料の合成法の開発や、様々な分子に対する検出系への応用が期待できる。すなわち、ナノ粒子の合成に限らず、ナノ構造体やナノデバイスの構築など多岐に渡る応用が可能であると考えられる。

また、第3章と第4章では、酵素触媒的なタンパク質修飾金ナノ粒子の合成法を紹介した。タンパク質修飾金ナノ粒子は、診断技術をはじめ多くの応用がなされているが、その調製は多段階の操作を必要とし、タンパク質の機能損失の抑制が課題となっている。本研究においては、金結合性のペプチドに着目し、酵素反応で得られる金ナノ粒子への直接的な固定化を試みた。一般に、アフィニティーを有するペプチドの吸着挙動は、タンパク質の場合と同様に、分子のサイズや吸着後の折り畳み構造の安定性、アミノ酸組成、化学構造などにより決定される。ペプチドは溶液中において基本的には特定の構造をとっていないために、独立して粒子表面へコンタクトすることができると考えられ、配向性を持った固定化が達成できると予想される。加えて、ペプチドに含まれる個々のアミノ酸の化学的な多様性から、目的に合わせて配列を変えることで粒子表面への吸着の制御が可能であることが予想される。しかし、ナノ粒子とペプチド間には、アミノ酸配列、ペプチド鎖の長さ、ペプチドの二次構造、ナノ粒子サイズ、表面化学、ナノ粒子の格子構造といった、多様な相互作用が寄与している。そこで現在では、コンビナトリアルな手法によるペプチドの探索と、シミュレーションによる解析が主に研究されている。このように、特定の金属表面を指向したアフィニティーペプチドは、今後もナノバイオテクノロジー分野において重要な素材となる可能性があり、有機-無機ハイブリッド材料の一端を担うものになることが期待される。

近年、ナノバイオテクノロジーの発展は目覚ましく、金ナノ粒子や量子ドット、カーボンナノチューブなどの様々なナノ材料がバイオテクノロジー分野で利用されている。これは「ナノからバイオへ」と言い換えることができ、ナノ材料を生物学分野へ利用しているのが現在のナノバイオテクノロジーの主流である。しかし、これまで述べたように、バイオミネラリゼーションを司るタンパク質は、無機材料を特異的に認識して、ナノレベルで制御された構造体を作ることができる。従って、このような生体分子をナノテクノロジーへ利用することは可能であり、「バイオからナノへ」の応用展開が期待できる。しかしながら、生体分子とナノ材料との界面領域は未だ不明な点も多く、本領域の発展には更なる基礎研究が必要である。生体分子が有する多様な機能をナノテクノロジーへ利用することができれば、これまでに無い材料や技術の創製が期待できるため、非常に興味深い分野であると考えられる。本論文の酵素反応を利用したナノ材料の調製法や無機材料認識ペプチドの知見が、ナノバイオ界面の理解や応用に向けた足掛りとなることを願い、本論文の結びとする。

## 謝辞

本論文は、筆者が九州大学大学院工学府化学システム工学専攻において、修士及び博士課程在学中（平成21年4月～平成26年1月）に行った研究の成果を纏めたものです。

研究を行うにあたり、終始懇切丁寧に御指導、御鞭撻を賜りました九州大学大学院工学研究院 神谷典穂教授ならびに後藤雅宏 教授に謹んで感謝の意を表します。先生方には、研究の立案から論文化までのプロセスのなかで、夜遅くまで議論してくださり、実験計画の立て方、結果の捉え方、論文の作り方に至るまで、いつも変わらぬ温情を持って御指導頂きました。心より感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり、多くの有益な御教示と御助言を賜りました九州大学大学院工学研究院 片山佳樹教授に謹んで感謝申し上げます。

日々の研究室生活に関する御支援をはじめ、実験に関する御指導や研究に関する議論等の様々な御力添えを賜りました九州大学大学院工学研究院 久保田富生子 助教ならびに若林里衣 助教に心より感謝申し上げます。

本研究に関する有益な御教示ならびに御助言を賜りました日本原子力研究開発機構 下条晃司郎 博士に感謝の意を表します。また、本論文以外の研究ではありますが、沢山の御助言と御教示を賜りました九州大学大学院工学研究院 松浦和則 准教授（現 鳥取大学工学研究科 教授）、宮崎大学工学部 大島達也 准教授にここに深く感謝の意を表します。

透過型電子顕微鏡の使用を御配慮頂きました九州大学大学院工学研究院 君塚信夫 教授に感謝の意を表します。その使用方法と試料の染色法を直接御指導頂きました九州大学大学院工学研究院 井手奈都子 技官ならびに森川全章 助教に深謝致します。ウルトラミクロトーム使用の配慮と、当該実験についての御助言を賜りました九州大学大学院工学研究院 中嶋直敏 教授ならびに藤ヶ谷剛彦 准教授に厚く御礼申し上げます。切片試料の作成から透過型電子顕微鏡観察までの一連の指導を賜りました九州大学超高压電子顕微鏡室 福永裕美 研究員に感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、多くの事務的な御協力と御支援を賜りました後藤・神谷研究室のスタッフの皆様心より感謝申し上げます。若手研究者海外武者修行プログラム、院生プロジェクト等の様々な教育活動において、多くの御支援を賜りました九州大学グローバル COE プログラム未来分子システム科学の職員の皆様に厚く感謝致します。九州大学工学部等事務室、九州大学工学部物質科学工学科応用化学部門（分子）事務室の皆様には格別な御協力を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、毛利剛 博士 (現 中国化薬株式会社)、嶋田如水 博士 (現 JSR 株式会社)、田原義朗 博士 (現 京都大学)、安倍弘喜 博士 (現 JSR 株式会社)、南畑孝介 博士 (現 東京大学) をはじめとする後藤・神谷研究室の先輩諸氏には、ときに厳しくも丁寧に実験手法を御指導頂き、数々の御協力と的確な御助言を賜りました。心より感謝申し上げます。また、福岡市産学連携交流センターにおける実験活動に関して、社会人の立場からたくさんのアドバイスを賜りました、日立アロカメディカル株式会社 林浩之輔 氏、後藤・神谷研究室 北岡桃子 博士、株式会社ココカラファインネクスト 山中桜子 女史に感謝致します。

公私共々、切磋琢磨しながら苦楽を共に過ごした、井野圭志郎 氏 (現 三菱化学株式会社)、金子丈志 氏 (現 佐賀県庁)、木原大輔 氏 (現 中国電力)、樋口由香 女史 (現 YKK 株式会社)、武藤早紀 女史 (現 佐賀県庁) の後藤・神谷研究室同輩諸氏に心より感謝申し上げます。また、沢山のかげがえのない楽しい時間を共有することができました馬場雄三 氏、森裕太郎 氏、森山幸祐 氏をはじめとした後藤・神谷研究室の後輩の皆様に深く感謝致します。

最後に、これまでの長い学生生活をいつも変わらず温かく見守り、支援して頂いた両親・家族に心より感謝致します。

本論文はこのように多くの皆様の御支援を賜り完成しました。ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞と致します。

平成 26 年 1 月  
著者 二井手哲平