

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

氏 名 : 二井手 哲平

論文題名 : 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

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

金ナノ粒子は化学的安定性、生体適合性、特異な分光特性など、優れた特性を有することから、様々な分野において広く用いられている材料の一つである。なかでも金ナノ粒子表面へ抗体などの機能性タンパク質が固定化された金ナノ粒子-タンパク質複合体は、バイオセンサーや薬物キャリアーなどバイオテクノロジー分野において多方面への応用が期待されている。

一般的に金ナノ粒子-タンパク質複合体の作製では、金ナノ粒子とタンパク質を別個に調製後、静電的相互作用や疎水性相互作用などによりタンパク質を粒子表面に物理吸着させる方法、あるいはそれぞれを共有結的に連結させる化学結合法が用いられる。物理吸着法による表面修飾は比較的容易なため一般的に用いられる手法であるが、タンパク質の配向制御が困難であり、タンパク質の機能損失が生じる。また、共有結合による表面修飾では二機能性架橋試薬などが用いられるが、タンパク質の特定部位の修飾が困難であり、操作が複雑化するという問題が存在する。以上のことから、金ナノ粒子-タンパク質複合体の効率的な新規調製法の開発が望まれている。

そこで本研究では、酸化還元酵素が触媒する補酵素再生系から供給される電子を用いた金イオンの還元による金ナノ粒子の合成と、金表面を認識するアフィニティペプチドを介した機能性タンパク質の配向固定化という二つの戦略を融合した金ナノ粒子-生体分子複合体の新規調製技術を開発した。

第 1 章は序論であり、金ナノ粒子の諸特性、表面修飾による機能化の戦略、生体分子修飾金ナノ粒子の応用例を紹介した。

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調製法の開発、さらに GLD を大腸菌内に発現させることで大腸菌へのバイオミネラルゼーション機能付与を試みた。まず、GLD 触媒による補酵素 (NADH) 再生系から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、金ナノ粒子の合成を試みた。精製した大腸菌由来 GLD 酵素を用いた *in vitro* での評価の結果、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を明らかとした。次に、GLD 酵素が細胞質に発現した組換え大腸菌を用い、GLD 非発現大腸菌との比較検討から、GLD 発現大腸菌を細胞触媒として用いた金ナノ粒子の合成に成功した。

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金ナノ粒子-タンパク質複合体の調製を試みた。その結果、抗体結合ドメイン融合タンパク質存在下においても GLD 酵素反応による金ナノ粒子合成反応は進行し、生成した金ナノ粒子表面に当該融合タンパク質が結合していることを確認した。さらに、得られた抗体結合ドメイン修飾金ナノ粒子を用い

た Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) の結果から、金ナノ粒子上に固定化された融合タンパク質は、金結合性ペプチドを介してその機能を保持した状態で金ナノ粒子上に固定化されていることが明らかとなった。

第 4 章では、大腸菌由来 GLD に代え、より安定で結晶構造が入手可能な *Bacillus stearothermophilus* 由来 GLD (BsGLD) を用いた。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を試みた。その結果、金ナノ粒子合成と粒子表面への提示を一種類の融合タンパク質が担う金ナノ粒子-タンパク質複合体の調製に成功した。また、本手法により調製された金ナノ粒子上に固定されたタンパク質の機能が十分に保持されていることを ELISA により確認した。

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。