

## 論文の内容の要旨

論文題目           Studies on fabrication of functional protein layers and  
                          investigation of their performance  
                          < 機能性蛋白質膜の創製とその機能性評価に関する研究 >

氏 名    李  範 煥

生体分子(酵素、抗体、受容体、DNA 等々)を基板に固定する技術は様々な分野で用いられ、有用物質の分離、検出において幅広く応用されている。これらの応用分野の中で特に生体分子の特異的結合能力を活用したバイオセンサー、DNAチップ、プロテインチップの作製においてはそれぞれの生体分子(酵素、DNA、蛋白質)を活性を保持したまま基板に乗せ、固定化する必要がある。固定化の方法としては物理的吸着、共有結合が様々な運搬方法と組み合わせられ、広く用いられている。本研究では electro spray deposition (ESD) と自己組織化膜 (self-assembled monolayer (SAM)) を用いて機能性蛋白質の膜を作製し、機能性を評価した。

生体分子、特に蛋白質の膜を作製するにあたって注意すべきことは如何に活性を維持できるかである。様々な蛋白質膜の作製方法が開発されているが、中でも ESD 法は均一な膜が作製できること、自由に形を決められることから注目を集めている。

ESD 法では、キャピラリーの中の蛋白質溶液がキャピラリーと基板の間に発生した電圧の差により粒子化して下部の基板の上に集積する。粒子化する際、その粒子の大きさが小さいので乾燥が速く蛋白質の失活を最小限に抑えることができる。またマスクを使い、蛋白質膜の形を自由に決められる利点がある。一方、作製された蛋白質膜を活性だけで評価しがちだが、ここでは ESD 法で作製された膜中の蛋白質の構造変化を PHB 法を用いて評価した。PHB とは低温で不均一に広がった吸収帯にレーザーを照射することにより、その波長の光を吸収する分子のみが光反応し、吸収スペクトルにホールが形成される現象である。このホールは temperature cycling によって変化するが、そのホールの深さ、幅の変化によって色素分子の周りの環境変化の情報がわかる。cytochrome *c* をフッ酸で処理して作られた porphyrin cytochrome *c* を ESD した後に glutaraldehyde で架橋し、透明性を確保するため glycerol 溶液を膜の上に滴下して乾燥後 ESD を再び行い、PHB に必要な膜厚が得られるまでこの操作を繰り返した。この蛋白質膜を 20K に冷却後、膜にレーザーをあててホールを形成した。その後、temperature cycling を行いホール幅の広がり、深さの減少を測定した。まず、高分子のマトリックスと比べると porphyrin cytochrome *c* の方が幅の広がりが抑えられ、深さもより高温まで維持できた。これは蛋白質のマトリックスの方がランダムコイルの高分子 (Poly(propyl methacrylate) (PnPMA)) より蜜に色素分子 (proto-porphyrin X (PPIX)) を包んでいることを反映した結果である。ESD で作製された蛋白質の膜は溶液の状態とほとんど同じ幅の広がりを見せたが、深さの方は約 30% 減少した。これは膜を作製する際の glutaraldehyde による架橋で、蛋白質のマトリックス構造が変化し、温度緩和を受け易くなったことが原因と考えられる。

最近、タンパク質の発現、相互作用、翻訳後修飾などの機能解析や、目的タンパク質の同定などを

効率的に行うことを目的として開発が進んでいるプロテインチップ技術は、プロテオミクス、医薬品開発分野に欠かせない存在になってきた。プロテインチップ技術で最も重要な部分は、蛋白質を基板上にマルチで且つマイクロにアレイするところである。ESD 法は他の方法に比べ、cross-contamination なく均一なドットを同時に効率よく作製できることから非常に注目を浴びている。本研究では ESD 法を用いて免疫測定用抗体アレイを作製し、その特性について検討した。まず、abrasive jet 手法を用いて石英マスクを作製した。この abrasive jet 手法は微粒子を高圧に噴射することによって削る手法で、短時間で数十  $\mu\text{m}$  直径の穴を開けることができる。このマスクを使って ESD した IgG のスポットとその表面を実体顕微鏡と原子間力顕微鏡で観察した。既存の方法に比べ表面が非常に均一であることが認められた。次にこの ESD 法で作製した抗体アレイの性能を評価するため、6 種類の動物由来(mouse, human, bovine, chicken, rabbit, guinea pig)の IgG を検出する実験を行った。まずそれぞれに対する抗 IgG 抗体を ESD した後に glutaraldehyde で固定してスキムミルクでブロッキングした。次に horseradish peroxidase (HRP) で標識された各々の IgG を加えて免疫反応を行い、洗浄後 ECL 試薬のルミノール酸化反応により生じた発光を、感光フィルムで測定した。この結果により ESD で作製された抗体アレイでは非特異的結合及び cross-activity は生じないことが確認できた。

次に ESD 法で作製した抗体アレイの検出感度を確認するため、抗 mouse IgG を ESD してからブロッキング後、AP で標識した mouse IgG と免疫反応させ、その後洗浄して蛍光沈殿物を発生させる AP 基質である ELF97 と反応させ、CCD カメラで蛍光強度を測定した結果、mouse IgG 1 ng/ml 付近の濃度まで検出できた。しかし、この方法では膜厚が厚いため、ラマン散乱光によるバックグラウンドの上昇が見られた。したがって低い濃度を測定する必要がある場合には、膜厚を減らす必要がある。そこで、表面を CHO 基で修飾した ITO ガラス基板を用いて抗体アレイを作製した。その結果、膜厚を単分子膜レベルまで減少させ、バックグラウンドを下げることができた。応用例として 8 種類のサイトカイン検出用抗体アレイを作製し、検出を試みた。サイトカインは分子量がおおむね 1 万から数万程度の蛋白質であり、細胞間の情報伝達を担い、細胞の増殖、分化、運動性、細胞死などを調整することで神経、内分泌系など生体機能の形成、維持に必須の蛋白質である。人体の 8 種類のサイトカイン(IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, TNF , IFN )に対する抗サイトカイン抗体アレイを作製してブロッキングした後、各々のサイトカインと免疫反応させ、洗浄後ビオチン標識した検出用抗体と反応させ、HRP 標識あるいは AP 標識した streptavidin で発光および蛍光によるサイトカインの検出を行った。発光による検出の結果、IgG の場合と同じように、8 種類のサイトカインに対して非特異的結合や cross-activity なく検出することができた。蛍光による検量では 100 pg/ml 付近まで検出することができた。これらの結果から ESD 法で作製した抗体アレイは抗原結合能を保持しており、様々な生体物質の検出への応用が期待できることが明らかとなった。

光合成はクリーンなエネルギー変換システムとして代表的なものである。最近光合成系の分子レベルでの構造と機能が解明され、その機能を模倣する人工光合成系の構築が試みられている。将来の応用を考慮するとできるだけ単純な系でこの機能を実現できたほうが都合がよい。そこで、本研究ではシンプルな蛋白質系人工光捕取アンテナシステムとして開発された enhanced green fluorescence protein (EGFP) と cytochrome  $b_{562}$  のキメラ蛋白質の自己組織化膜(SAM)を作製し、その光電変換性能を確認した。まずサイトミュレーション手法を用いて cytochrome  $b_{562}$  の 22 番と 82 番のアミノ酸を

それぞれシステインに変異させ EGFP と Gly-Ser リンカーでつないだ遺伝子を構築し、pET32 プラスミドに組み込んで発現させ、キメラ蛋白質を精製した。この蛋白質溶液に雲母に蒸着した金基板を浸漬してキメラ蛋白質の SAM を作製した。洗浄後 AFM で表面を観察した。またキメラ蛋白質の SAM の高さを測るためこの基板を AFM の探針で削り、その段差を測った結果、約 2.5~3.0 nm ほどの高さが認められた。Cytochrome  $b_{562}$  と EGFP それぞれの X 線解析データとこの結果とを比べてみるとキメラ蛋白質は SAM 形成の際、斜めまたは水平に横たわっている形になっていると考えられる。次にキメラ蛋白質の光電氣的性質を測定するため LI-STM 実験とハイブリッド SNOM/STM 実験を行った。まず GFP を励起するレーザー光(488 nm)による熱膨張を防ぐためチョッパーの周波数とレーザーのパワーをそれぞれ 200 Hz と 0.1 mW に設定し、キメラ蛋白質の SAM に対してレーザーのスイッチング実験を行った。その結果、キメラ蛋白質は光のスイッチングに連動して電流を発生させる、つまり、光電流を発生させることが認められた。GFP を励起できない別の波長のレーザー(532 nm)を使った同じトネルリング条件ではこの光電流は見られなかった。また、cytochrome  $b_{562}$  と EGFP だけの SAM をもって同じように実験した際にも光電流は認められなかった。つまり光電流には cytochrome  $b_{562}$  と EGFP 両方必要であることがわかった。光電流はその波長特性からでもわかるように EGFP と cytochrome  $b_{562}$  の間のなんらかの相互作用に発生の一因があると考えられる。キメラ蛋白質の蛍光寿命測定実験の結果から、その相互作用は励起した EGFP から cytochrome  $b_{562}$  へのエネルギー移動であることがわかった。しかし、既往の研究から porphyrin、色素などは金によって quenching されることがわかっており、エネルギー移動によって励起された cytochrome  $b_{562}$  は金によって quenching される可能性が高い。一方、既往の研究に励起した GFP は電子供与体になりやすく、光によって励起した viologen などに電子が移動する例が報告されている。したがってキメラ蛋白質から発生する光電流は光によって励起した EGFP から cytochrome  $b_{562}$ 、つぎは cytochrome  $b_{562}$  から金への電子移動のプロセスをたどると考えられる。これら実験結果から作製されたキメラタンパク質 SAM は分子素子への応用が期待される。

以上の実験結果から ESD または SAM をもちいて様々な活性を持つ(光活性、免疫活性、光電氣的活性)蛋白質の膜を作製し、その活性を評価した。これらの蛋白質膜は将来高密度メモリ、ハイスループット免疫測定システム、また光分子素子などへの応用が期待され、これからナノテクノロジーなどとの融合によってますますその重要性が増えていくと考えられる。