

金表面への生体分子・膜システムの低損傷固定化法に関する研究

(環境材料設計学研究室) 山根 亨介

1. 緒言

近年、バイオセンサーやバイオリアクターといった生体分子を利用した研究が行われている。菌体や酵素、タンパクなどの生体分子をナノテクノロジーと組み合わせデバイス化し、医療やエネルギー、環境といった様々な分野への応用がなされている。このような系において重要となるのが、生体分子の固定化と活性維持である。分子センシングや有用物質の生産などを目的とした溶液中の分子拡散に基づく流体デバイスであるから、高い流速に耐えるよう強固に固定化しなければならない一方で、生体分子の特性をそのまま活かしてデバイスとして用いる為、生体分子の活性がデバイスの処理能力を大きく左右することになる。活性を維持するには、生体分子を可能な限り穏やかな条件で固定することが望ましい。生体分子の固定化方法として、共有結合法や物理的吸着法、静電吸着法が挙げられる。共有結合法は、固定化の強度は優れているが、有機化学反応であるため他の方法に比べ条件が厳しいことが多く、生体分子の活性を損なう可能性がある。物理的吸着法は生体分子のダメージは少ないが、吸着力が比較的弱い。これらに対して、静電吸着法は温和な条件で吸着が進行し、pHの条件が安定している場合は物理吸着法よりも固定化強度が優れている。また、疎水性や親水性も影響するので、固定層に用いる分子の選択法によっては更に安定した固定化が可能となる。

そこで、本研究では、静電吸着を利用した生体分子の固定及びデバイス化を検討した。生体分子を静電吸着により固定化する固定層として自己組織化単分子膜とポリアミンを利用した。自己組織化単分子膜 (SAM) は、基板表面上に結合する性質がある分子が分子間相互作用により自己集合して規則正しく並ぶことにより形成される。その分子の末端に、アミノ基やカルボキシル基、メチル基などの官能基を導入することにより、静電的な特性や親水性、疎水性等の機能性を持った表面を得ることが可能である。本研究では、SAMを形成する分子としてメルカプトウンデカン酸 (MUA) を利用した。MUAは、官能基としてカルボキシル基を持ち、イオン化することによりマイナスに帯電する。その上にプラスに帯電したポリアミンなどを静電的相互作用により吸着させ、更にそのポリアミン上に、マイナスに帯電している目的の生体分子を静電的に吸着させることが可能となる。本研究で検証したポリアミンは、Poly-L-Lysine (PLL) 、PolyEthyleneImine (PEI) 、Poly-L-Proline (PLPr) の三種である。

これまで、本研究室では、表面プラズモン (SP) を利用した研究を行ってきた。SPとは、金属表面における電子の集団的な振動である。真空蒸着法により作製した50 nm程度の膜厚の金薄膜をガラスプリズムに貼り付け、プリズムを通してレーザーを金薄膜に照射することにより、SPを誘起させることができる。SPの電場は入射光の電場と比較して数十～数百倍に増強され、しかも金薄膜表面に局在する為、通常の光照射では透過・反射損失してしまうような金表面上に薄膜状に固定化した分子に対しても効率的にエネルギーを与えることが可能である。

そこで、本研究では、この SP と極めて優れた光電荷分離機能をもつ生体分子システムである葉緑体チラコイドを組み合わせてマイクロ流路に組み込み、デバイスとして利用することを試みた。概念は次の通りである。葉緑体チラコイドを植物体より抽出し、植物体外で光照射することにより電子発生を行わせる。発生させた電子を利用するデバイスであるため、溶液中にある電子捕捉性分子との接触面積を稼ぐことが重要であり、薄膜状に固定化することで反応効率の良いデバイスを作製することができる。一方、葉緑体チラコイドのような薄膜では上述のように直接光照射では光の透過損失が大きくなる。この問題を解決し、葉緑体チラコイドに効率よくエネルギーを与える方法として、SP による励起は非常に適している。

2. 実験法、結果、及び考察

本研究では、
 金薄膜上への MUA SAM 形成
 MUA 表面へのポリアミン静電吸着
 葉緑体チラコイドの固定化と機能評価
 を行った。以下、順に実験法と結果を示し、考察する。

2-1 MUA SAM の調製と評価

MUA は、末端にカルボキシル基とメルカプト基(-SH)を持つ分子である。メルカプト基は金膜と反応し、酸化されて金表面と共有結合を形成する。MUA の 5 mM MUA - ethanol 溶液を調製した。室温で MUA 溶液中に金薄膜を 30 分浸漬させ、MUA SAM を形成した。

MUA SAM の形成を CV によって評価した。まず、MUA SAM 形成前のベア金膜を作用極として、フェリシアン化カリウムの酸化還元反応を観測した。次に、その金膜表面に MUA SAM を形成し、同様に CV 測定を行った。ベア金膜では Fe^{3+}/Fe^{2+} の酸化還元ピークが明瞭に観測されたが、MUA SAM 形成後はピークが完全に消失していた。これは金膜の表面が MUA SAM によって被覆され、溶質との間で電子の授受が行われなくなったことによると考えられる。この結果から、極めて緻密な MUA SAM が金膜上に形成されたことが確認された。

2-2 ポリアミンの吸着とその評価方法

2-2-1 SPR を利用した MUA SAM 上へのポリアミンの吸着の評価

MUA SAM 上へのポリアミン吸着過程を、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサである Biacore を用いて観測した。Biacore は、金表面に修飾された分子と相互作用する分子の溶液を送液して、分子吸着にともなう SPR 角の変化を観測する。その経時変化を表す「センサーグラム」を解析することで、吸着・脱離のダイナミクスを観測できるだけでなく、単位面積当たりの質量として吸着量を算出する定量分析ができる。ここでは、MUA SAM と各ポリアミンとの相互作用を観測した。Figure 2 に Biacore から得られた各ポリアミンの吸着センサーグラムを示す。

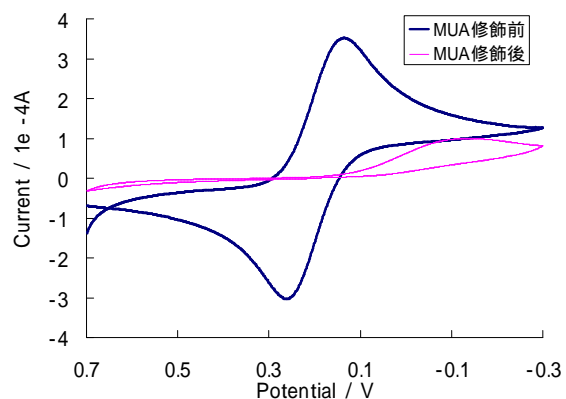


Fig.1 金膜上の MUA 形成前後のサイクリックボルタモグラム

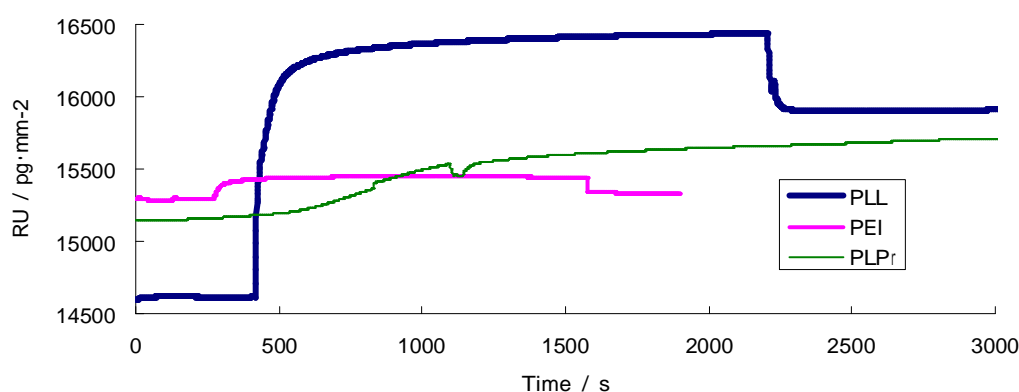


Fig.2 Biacore を用いた各ポリアミンの吸着ダイナミクス

PLL 溶液添加後、急激な RU 値の増加が見られ、やがて飽和した。添加終了後、物理的に堆積していた PLL が溶出し、RU 値は急激に低下し、その後一定となった。この時点の RU が PLL の静電吸着量に対応する。PEI についてもほぼ同様の挙動が観測された。これらに対して、PLPr では挙動が大きく異なった。PLL や PEI と同様の時間領域では RU 値の増加は見られず、さらに長時間観測すると、ごくゆっくりと RU 値が上昇してやがて一定となった。これらの結果から、PLL と PEI についてはその表面のアミノ基の正電荷と基板表面の MUA の負電荷の静電的な相互作用によって強い吸着が起こるのに対し、ポリイミン構造であるためにアミノ基を持たない PLPr の場合には静電的な相互作用が起きないため早い吸着は起こらず、剛直な棒状構造であることによる自己集合化と、MUA SAM 表面への物理的な吸着のみが起きると推定される。PLL と PEI について吸着量を Table 1 に示す。

2-2-2 ポリアミンへの TPPS の吸着

MUA SAM 上に固定した各ポリアミンの吸着力の評価方法として、ポルフィリンスルホン酸 (TPPS) のポリアミンへの静電吸着を利用した。TPPS はスルホン酸基を四つ有しており、ポリアミンに静電的に吸着する。TPPS は波長 420 nm 付近に大きな吸収ピークを持ち、ポリアミンへの TPPS 吸着前後における吸収スペクトルの差より、相対的な吸着量を算出することができ、ポリアミンの吸着力の評価が可能となる。Figure 3 に TPPS 吸着前後の吸収スペクトルの差スペクトルを示す。PLPr では、他のポリアミンに比べて TPPS の吸収スペクトルが確認できなかった。Biacore の結果と合わせて考えると、PLPr の静電的な吸着力は、PLL や PEI に比べてかなり弱いと考えられる。Table 1 に Biacore より得られた PLL と PEI の吸着量と、TPPS 吸収スペクトルから得られた TPPS 吸着量から評価した TPPS 1 分子に対する吸着ポリアミン残基数を示した。PLL と PEI について、吸着量を Table 1 に示す。

Table 1. Biacore による PLL と PEI の吸着量の結果及び TPPS の相対吸着量の結果

	ポリアミン吸着量 / 残基・cm ⁻²	TPPS 吸着密度 / 分子数・cm ⁻²	TPPS 相対吸着量	TPPS1 分子に対する ポリアミン残基数
PLL	6.0 × 10 ¹⁴	2.80 × 10 ¹³	2.37 × 10 ⁻²	21.4
PEI	9.1 × 10 ¹⁴	2.57 × 10 ¹³	2.18 × 10 ⁻²	28.2

この二種類のポリアミンの吸着量、TPPS 吸着密度を比較すると、同じオーダーであった。PLL と PEI の静電特性とサイズに差があり、それがポリアミン吸着量に影響与えていると考えられる。TPPS の相対吸着量は、PLL 基板が PEI 基板の約 1.1 倍であった。

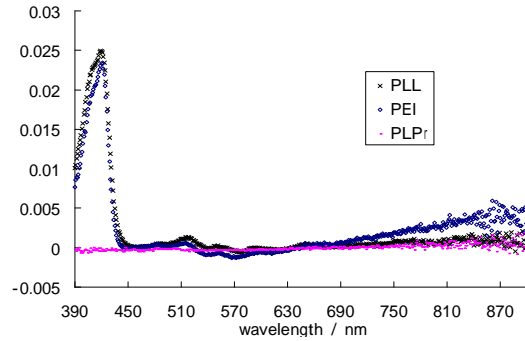


Fig.3 各ポリアミンへの TPPS 吸着前後の差スペクトル

2-3 葉緑体チラコイドの固定化と機能評価

2-3-1 葉緑体チラコイドの抽出と固定化

本研究室ではこれまで葉緑体チラコイドをホウレン草から抽出し、植物体外において電子を発生させる実験を行ってきた。本研究者は卒業研究において PLL を固定層としてチラコイドの SP 励起を試み、デバイス内での電子発生を確認できたことを報告した。しかし、寿命や再現性、すなわち葉緑体活性の維持に課題があり、固定化法をさらに洗練させるべく、本研究で固定化層の最適化を行った。チラコイドの固定化は、TPPS の吸着と同様の操作方法で行うが、チラコイドの活性維持の為、緩衝液中にて実験を行わなければならない。ここで、用いる緩衝溶液の電解質が静電的な影響を及ぼす恐れがある。さらに、チラコイド吸着量を評価の際、吸収スペクトルを用いて定量を行うが、吸光度の大きな金膜を通して透過吸収を測定しなければならず、活性を維持したまま測定することは技術的に大きな困難を伴っている。そこで、光ファイバ分光器と LED 光源を用いてその場測定が可能な分光システムを作製した。現在、それを用いた精密測定を試みている。

2-3-2 葉緑体チラコイド固定化マイクロ流路

葉緑体チラコイドを固定化した基板をシリコンゴム性のマイクロ流路にとりつけ、電子捕捉性分子である 2,6-DichloroIndoPhenol (DCIP) を使用して SP 励起を行い、電子発生を検証した。DCIP は波長 600 nm に吸収ピークを持つ分子で、溶液中で青色を示すが、二電子還元されることにより無色透明となる。リサイクルフローシステムを利用して DCIP 溶液をデバイス内に循環させ、DCIP の 600 nm 吸光度変化をリアルタイムで測定した。Figure 4 に DCIP 吸光度変化を示す。表面プラズモン共鳴発生直後から DCIP の吸光度が減少し始めた。これはデバイス内において表面プラズモンによって励起された葉緑体チラコイドにより、電子が発生していることに対応すると考えられた。以上のように、一連のポリアミンを用いて生体分子のプラズモン増強励起用基板を作製した。今後、各ポリアミンについて葉緑体チラコイドの吸着量を比較し、再現性や活性維持の向上を図っていく。また、その結果を用いて、葉緑体チラコイドからの電子発生量を定量化していく予定である。

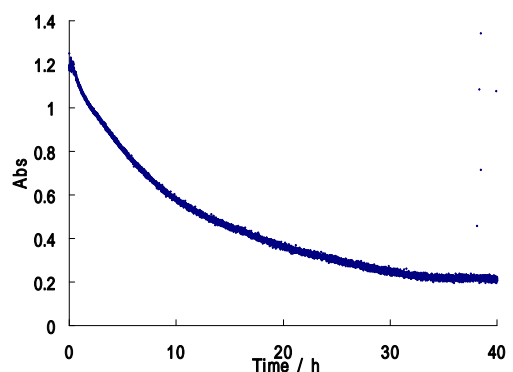


Fig.4 リサイクルフローシステムを用いて測定した DCIP 吸光度変化