

GFP ナノチューブの調製の最適化とシリカとのハイブリッド化の検討

(名工大院工) ○ 沖山直矢・水野稔久*・野地智康・出羽毅久・奥淳一・田中俊樹

< 諸言 >

タンパク質を変性させることなく集合組織化できる手法の開発は、タンパク質ベースのナノ材料創製につながることを期待され興味深い。これに対し、タンパク質を集合化させる手法の一つとして、疎水性の合成高分子を付加する方法が提案されている。当研究室ではこれまでに、ポリ 2-ビニルピリジン

(p2VP) と緑色蛍光蛋白質 (GFP) の複合体 (GFP-p2VP) を調製し、マイクロ流体合成法を用いた pH 変化により、直径 200 nm、長さ 1μm 以上の GFP ナノチューブ (チューブ状二分子膜) の作製に成功している。しかし、現在用いているマイクロ流体合成法では GFP ナノチューブの作製効率が低く、DLS 測定からナノチューブの形成は 1% 未満であることが分かっている。そこで本研究では、マイクロ流体合成法を最適化することで、GFP ナノチューブの作製効率が向上する条件を探しだし、また、マイクロシリンジの直径を変えることで作製されるナノチューブの直径が変化するか検討した。また、作製されるタンパク質ナノチューブ表面でのタンパク質機能の発現に向けた検討を行った。

< 実験 >

ナノチューブの作製効率を向上させるため、マイクロ流体合成の際、インジェクション速度と溶液量の条件を振り GFP ナノチューブを作製した。また、シリンジの先に 0.13、0.25、0.45mm のキャピラリーを取り付けてインジェクションし GFP ナノチューブを作製した。それらを、DLS 測定および TEM 測定することによりナノチューブの作成効率および直径を比較した。

シリカミネラル化活性を持つペプチド配列 R5 (SGSKGSKRRIL) を GFP の N-末端側に融合した変異体 (SiGFP) を発現精製し、これに p2VP を共有結合により導入した SiGFP-p2VP の合成を行った。SiGFP-p2VP ナノチューブは、複合体が単分子分散する pH4.5 の酢酸緩衝溶液を、pH9 のリン酸緩衝液に注入することにより行った。ゲル濾過クロマトグラフィーにより単離精製を行った後に、TEM 測定により形態観察を行ったところ、GFP-p2VP と同様に、ナノチューブが形成されていることが確認された。SiGFP-p2VP ナノチューブとケイ酸イオン溶液との反応は、N. Kröger らの方法に従って行い、TEM 測定によりその形態観察を行った。

< 結果・考察 >

TEM 測定により SiGFP-p2VP はナノチューブの形態を保持したまま、ナノチューブ表面がシリカの被覆を受けていることが確認された。また一方で、形成されるシリカ表面の構造にねじれた構造が見られたことから、SiGFP-p2VP ナノチューブ表面での、SiGFP の分子配向にねじれが形成されていたことも示唆されている。

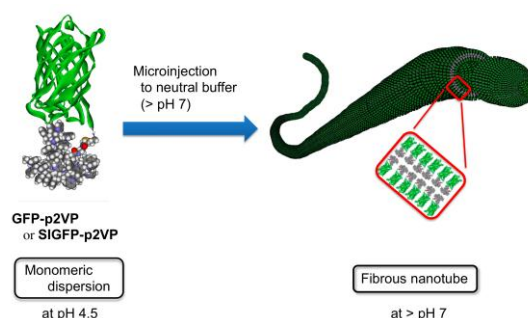


Fig1 Preparation of GFP nanotube

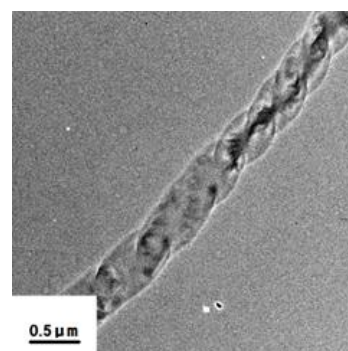


Fig2 TEM image of silica covered SiGFP-p2VP nanotube

Optimization to prepare GFP nanotube and attempt to hybrid with silica materials.

N. OKIYAMA; T. MIZUNO*; T. NOJI, J. OKU; T. DEWA; T. TANAKA

(Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, cjk15025@stn.nitech.ac.jp)

To date, we reported the successful preparation of GFP nanotube with applying the micro-fluidic synthesis. Here, we examined further optimization to prepare GFP nanotube and attempted to hybrid it with silica materials.