

研究報告書

「ナノ界面特異的バイオ接合分子を用いた多元ナノ結晶集合」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 20 年 10 月～平成 24 年 9 月

研究者: 梅津 光央

1. 研究のねらい

本研究は、研究者が独自に生み出した無機材料結晶面を自発的に識別し結合できるペプチド・抗体分子断片を構成要素として、積み木細工様式で自在なバイオナノ接合分子をペプチド・蛋白質工学的に設計する。そして、単純な混合操作のみで、ナノレベルで無機ナノ粒子間を自在に接合できる技術を開発する。

2. 研究成果

(1) 概要

様々な無機・有機材料でナノ化が進んでいる材料工学分野では、ただ単にサイズ微細化だけでなく界面設計されたナノ結晶の合成が可能になりつつあり、その形状に基づいてナノ結晶粒子を自己組織化させることによって機能創発させる提案がある。研究者は、10 残基程度のアミノ酸からなるペプチド分子が、特定の無機材料表面に選択的に結合できる報告に着目し、ペプチド分子よりも分子認識機能と結合力に優れている抗体蛋白質を用いて無機材料表面に親和性を示す分子を創出できれば、ナノ領域でナノ結晶粒子間を自発的に接合させる接合分子を設計できると考えた。そこで、本研究では、特定無機材料表面へ結合する抗体の作製に対する CAnIGET 法の汎用性を検討すると共に、ドメイン組換え蛋白質工学を用いて二重特異性分子を設計することによって、目的の無機材料表面同士を自発的に接合させるバイオ接合分子としての抗体分子の新規な機能創発を目指した。

そのために、まず、金表面結合性ペプチドおよび酸化亜鉛表面結合性ペプチドを各々ラクダ抗体 cAbBCII-10 の重鎖可変領域断片(VHH)の CDR の 1 箇所に移植し、その後、両ペプチド移植 VHH 中の移植に用いなかった他の CDR をファージ提示法により最適化することによって、酸化亜鉛および金に高親和に結合する VHH 断片の取得に成功した。これらの抗体断片は金、酸化亜鉛ナノ粒子の表面に強く結合し、それらナノ粒子を水溶液中で安定的に分散させた。そして、両 VHH 断片をペプチドリinkerで架橋した二重特異性抗体を金と酸化亜鉛ナノ粒子の分散液に加えることによって両粒子間を自発的に架橋できることを証明し、材料表面に高親和な抗体を用いて接合分子を設計すれば、異種なナノ材料間も容易に架橋できることを示した。

(2) 詳細

研究テーマ A「ペプチド移植と進化工学操作を組み合わせた無機ナノ結晶結合性抗体断片取得法の確立」

研究者は、多機能セラミックスである酸化亜鉛を対象に、材料結合性ペプチドをラクダ抗体 cAbBCII-10 の抗原結合部位(CDR)の一部に移植し、その後、進化工学を用いることによって、ペプチドの数十倍の強さで酸化亜鉛に結合する抗体の作製に成功している(CAnIGET法)。そこで、この手法の汎用性を示すために、酸化亜鉛と金に結合性を示す抗体の作製を行った。

酸化亜鉛については、研究者がすでに取得している酸化亜鉛結合性ペプチドをラクダ抗体 cAbBCII-10 の重鎖可変領域断片(VHH)のCDRの 1 箇所に移植し、金については、すでに報告のある金表面結合性ペプチドを移植した。その後、両ペプチド移植VHHは、移植に用いなかった他のCDRをファージ提示法により最適化した。その結果、両VHH共に材質特異性を示し(図 1,2)、平衡解離定数 K_d 値が 9nM (酸化亜鉛), 150 nM(金)を示す抗体断片ZnO 4F2 VHH 及びAu E32 VHHを取得することに成功した。

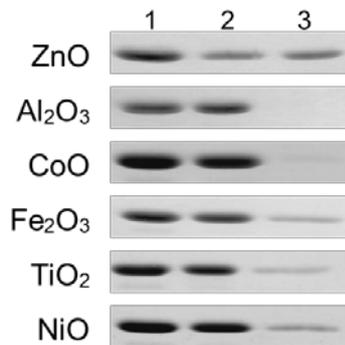


図 1. SDS-PAGE を用いた ZnO 4F2 VHH の材質特異性試験. 4F2 VHH を含む溶液(1)を各無機粒子と混合後遠心分離を行い(2:上清画分)、沈殿画分の粒子に結合している VHH を変性剤溶液にて溶出(3).

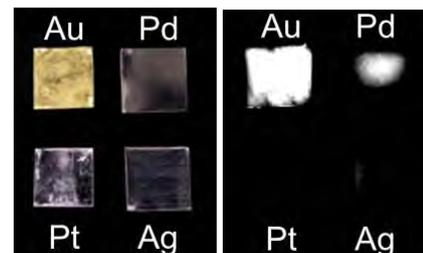


図 2. Au E32 VHH の材質特異性試験. E32 VHH を含む溶液へ各金属基板を浸した後洗浄し、基板に残存した VHH をペルオキシダーゼを用いた酵素抗体法により検出.

研究テーマ B「無機材料結合性抗体断片による無機ナノ粒子の凝集抑制効果」

無機ナノ粒子は、単位重量当たりの表面積が非常に大きいため、粒子間の相互作用が大きく、溶液中での凝集性が問題になることが多い。そこで本研究では、無機材料に高親和な抗体断片を利用して、ナノ粒子の凝集抑制効果を検討した。

金ナノ粒子は低塩濃度水溶液環境下では凝集せずに分散し 520~550 nm 付近にプラズモン吸収を持つ。その水溶液は赤色透明であるが、金ナノ粒子はわずかなイオン強度の増加で凝集し、その凝集はプラズモン吸収帯を長波長シフトさせ、水溶液が紫色へ変化していく。そこで、この金ナノ粒子水溶液に金表面に高親和な抗体断片 E32 VHH を添加することによって、高塩濃度での金ナノ粒子の分散安定化を評価した(図 3)。その結果、10 mM リン酸緩衝水溶液(pH7.5) 中の 0.1 nM 金ナノ粒子(粒径 20 nm)に NaCl を加えたところ、

40 nM E32 VHH が存在している場合、1 M の NaCl 濃度存在下でも、金ナノ粒子はある程度高い分散性を示した。これは、金表面に高い親和性を示す AuE32 VHH が金ナノ粒子表面をコーティングしたため高いイオン強度環境下でも蛋白質層が解離せず金ナノ粒子表面の

電気二重層が維持されたことを示す。

次に、抗体が無機ナノ粒子を粉末から高分散させ得るかを評価するため、すでに取得済みの酸化亜鉛結合性抗体(4F2 VHH)を含む水溶液中に酸化亜鉛ナノ粒子粉末を添加し、動的光散乱を用いて水溶液中で分散した酸化亜鉛ナノ粒子の粒子径を評価した。その結果、水溶液中の粒子径は、ナノ粒子単体の粒子径とほぼ同じであり、無機材料表面に高親和な抗体断片は、粒子凝集体から粒子を分散させ得ることも分かった。

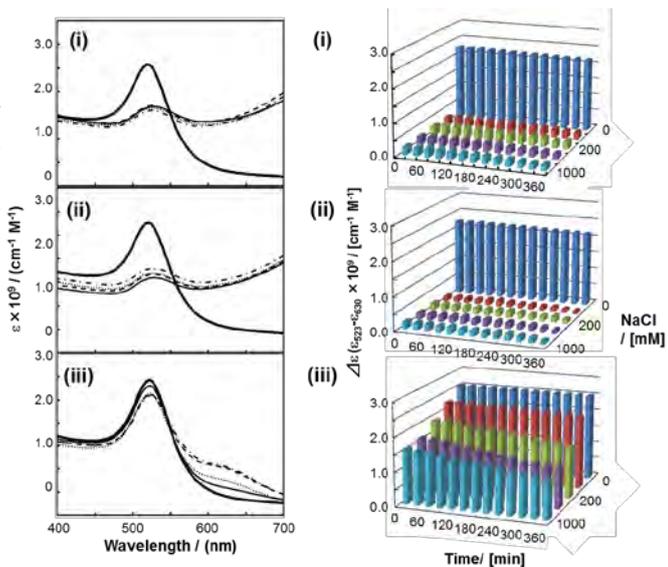


図 3. 様々な塩濃度下での金ナノ粒子のプラズモン吸収スペクトル(a)と経時変化(b)
(i) 蛋白質無, (ii) 40 nM BSA, (iii) 40 nM E32 VHH

研究テーマ C「二重特異性抗体を利用した異種ナノ材料間接合」

無機材料結合性抗体を用いて異種材料間を架橋する接合分子として応用するため、まず初めに、金結合性抗体 E32 VHH の C 末端のみにビオチン分子を結合させた後にストレプトアビジンと混合することにより、ストレプトアビジンを核とした VHH の 4 量体を形成させた。そして、その VHH 4 量体を用いて金ナノ粒子間の架橋を試みるため、金ナノ粒子分散水溶液に滴下していったところ、VHH 4 量体濃度が 40 nM 以上の濃度で金ナノ粒子が凝集し、金表面に高親和な抗体分子を用いて接合分子を設計することによって、混合操作のみでナノ粒子間を架橋できることが分かった(図 4)。

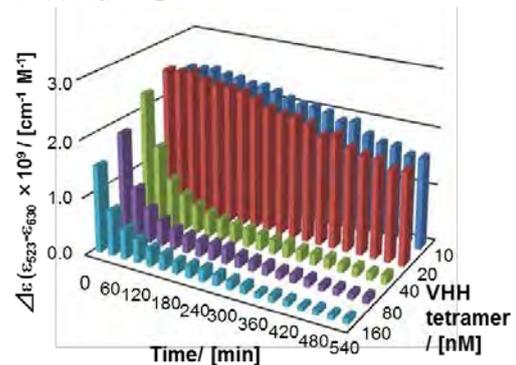


図 4. 様々な E32 VHH 4 量体濃度での金ナノ粒子のプラズモン吸収の経時変化

次に、異種ナノ材料間での架橋を試みるために、酸化亜鉛結合性抗体 4F2 VHH と金結合性抗体 E32 VHH をリンカーで繋いだ二重特異性抗体 4F2-E32 VHH dimer について粒子間架橋を評価した。超音波処理した粒子径 100 nm の球状酸化亜鉛粒子に金ナノ粒子を添加したところ、金ナノ粒子は凝集せずに溶液中を分散していたが、二重特異性抗体 4F2-E32 VHH dimer を同時に添

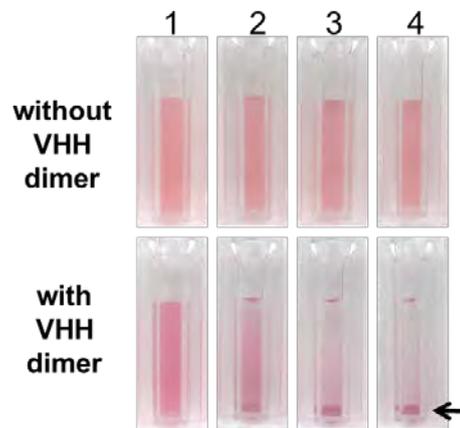


図 5. 酸化亜鉛と金ナノ粒子混合液に 4F2-E32 VHH dimer を添加した時の経時変化
1. 0 min, 2. 60 min, 3. 120 min, 4. 180 min

加した時は、金ナノ粒子は、添加直後から凝集し始め沈殿し、材料表面に高親和な抗体を用いて接合分子を設計すれば、異種なナノ材料間も容易に架橋できることが示された(図 5)。

3. 今後の展開

2000 年に無機材料表面に結合性を示すペプチドが発見されて以来、この分子は異種材料間を接合させる架橋ツールとして注目されてきた。しかし、ナノ領域での接合ツールとしては材料表面への結合力が不十分なことが多く、かつ、分子構造として剛直性に欠けるため、結合方向性を持たせる点にも課題があった。本研究では、ペプチドよりも分子認識機能が優れており、かつ、結合方向性に剛直性がある抗体分子に着目し、ラクダ抗体 cAbBCII-10 の重鎖可変領域断片へ無機材料結合性ペプチドを移植し、その後、進化工学操作を適応することによって、無機材料表面へ高親和な抗体を迅速に作製する手法(CAnIGET 法)を確立した。その結果、無機材料表面へ高親和な分子を用いることで、異種材料間の接合分子としての操作性を格段と向上させることができ、ナノ領域での接合分子を設計することが可能であることが分かった。この成功により、抗体分子は分子標的薬としてだけでなく、材料工学において、ナノ世界での接合ツールとなる機能分子であることを実証できた。本研究で開発したナノ粒子間接合プロセスは、材質に依存しないため、様々なナノ粒子に適応でき、今後、ナノ粒子配列体と機能発現との相関を明らかにするアセンブリ技術ツールとして期待できる。

4. 自己評価

当初の目的通りに、単純な混合操作のみで、自在に無機ナノ粒子間を自在に接合できるプロセス技術を開発することに成功した。本達成は、世界的に報告例がほとんどない無機材料表面に選択的結合できる抗体を迅速に作製できる手法を確立できたことが大きい。反省点として、本さきがけ領域が掲げる「ナノシステムと機能創発」の「機能創発」について曖昧な成果になってしまったことがある。今後の課題として、本プロセスを利用して作製したナノ粒子アセンブリ体の機能発現に取り組んでいきたい。

5. 研究総括の見解

研究者が独自に生み出した無機材料結晶面を自発的に識別し結合できるペプチド・抗体分子断片を構成要素として、自在なバイオ-無機ナノ接合分子をペプチド・蛋白質工学的に設計し、接合できる技術を開発することを目指した。

まず、多機能セラミックスである酸化亜鉛を対象に、結合性ペプチドをラクダ抗体 cAbBCII-10 の抗原結合部位(CDR)の一部に移植し、その後、進化工学を用いることによって酸化亜鉛に結合する抗体の作製に成功した。また、金結合性抗体 E32 VHH の C 末端のみにビオチン分子を結合させた後にストレプトアビジンと混合することにより、自在に金ナノ粒子間を接合できるプロセス技術を開発することにも成功した。

以上の研究は、世界的に報告例がほとんどない独創的な構想と成果であり、無機材料表面に選択的結合できる抗体を迅速に作製する手法を確立したことは、「さきがけ」研究らしい先導的創造的研究であると高く評価できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文) 発表

1. T. Hattori, M. Umetsu, T. Nakanishi, S. Sawai, S. Kikuchi, R. Asano, and I. Kumagai, A High-Affinity Gold-Binding Camel Antibody: Antibody Engineering for One-Pot Functionalization of Gold Nanoparticles as Biointerface Molecules, *Bioconjugate Chemistry*, 2012, 23, 1934-1944.
2. T. Togashi, N. Yokoo, M. Umetsu, S. Ohara, T. Naka, S. Takami, H. Abe, I. Kumagai, and T. Adschiri, Material-binding peptide application -ZnO crystal structure control by means of a ZnO-binding peptide-, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111, 140-145.
3. T. Hattori, M. Umetsu, T. Nakanishi, T. Togashi, N. Yokoo, H. Abe, S. Ohara, T. Adschiri, and I. Kumagai, High Affinity Anti-inorganic Material Antibody Generation by Integrating Graft and Evolution Technologies. POTENTIAL OF ANTIBODIES AS BIOINTERFACE MOLECULES, *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285, 7784-7793.
4. N. Yokoo, T. Togashi, M. Umetsu, K. Tsumoto, T. Hattori, T. Nakanishi, S. Ohara, S. Takami, T. Naka, H. Abe, I. Kumagai, and T. Adschiri, Direct and Selective Immobilization of Proteins by Means of an Inorganic Material-Binding Peptide: Discussion on Functionalization in the Elongation to Material-Binding Peptide, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114, 480-486.
5. M. Umetsu, T. Nakanishi, R. Asano, T. Hattori, and I. Kumagai, Protein-protein interactions and selection: generation of molecule-binding proteins on the basis of tertiary structural information, *FEBS Journal*, 2010, 277, 2006-2014.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 梅津 光央, 熊谷 泉, ボトムアップな粒子アセンブリツールとしてのバイオ分子, *セラミックス* 47, 616-619, (2012)
2. 梅津 光央, 渡邊 秀樹, 熊谷 泉, 材料ナノ表面を抗原とする抗体-ナノ世界の糊として-, *バイオサイエンスとインダストリー*, 68, 39-43 (2010)
3. 熊谷 泉, 梅津 光央, ナノ材料も抗原? ポリマー・金属表面構造を識別できる抗体分子, *月刊「化学」*, 65, 66-67 (2010)