

ナノバイオマシンの創製に向けて

酵素とビオチンを担持した微粒子の調製

表面に単一の官能基を持つ高分子ラテックス微粒子は、アフィニティー分離材料、診断キット、薬物伝達システム(DDS)、酵素担体などとしてライフサイエンス分野で幅広く使われている。表面に固定する機能分子としては、例えばタンパク質、医薬分子、DNAなどがある。従来用いられてきたラテックス微粒子は主に均一組成、多孔質またはコア-シェルタイプ構造であり、表面には殆ど一種類の官能基しか存在しなかった。一方、微粒子の両側にそれぞれ異なる官能基を与えることができれば、微粒子に方向性を持たせながら段階的に修飾することができ、更なる応用が期待される。しかしながら、このような二官能性高分子微粒子は、まだ開発されていなかった。

本研究では、ソープフリー(界面活性剤なし)シード(種)乳化重合という方法を用いることにより、2つの異なる領域にエポキシ環と水酸基を持たせた異方性ラテックス微粒子を調製することに成功した(図1)。これは、第1段階としてジビニルベンゼン(DVB)で架橋したポリグリシジルメタクリレート(PGMA)のシード微粒子をソープフリー乳化重合により合成し、次にそのシード微粒子の存在下でスチレンモノマー(St)を更に重合させ相分離させるという方法である。この時、鎖転移剤2-

メルカプトエタノールの存在下でスチレンを重合させるとポリスチレン側に水酸基を導入することができる。さらに、この水酸基を活性エステル型ビオチン誘導体と反応させることにより、微粒子の片側のみをビオチン化することに成功した。一方、酵素(ピルビン酸キナーゼ)のアミノ基とエポキシ環を反応させることにより、酵素をポリグリシジルメタクリレート側に固定化することができた。微粒子上のビオチン化部位及び酵素固定化部位は、それぞれ金コロイド微粒子でラベルしたストレプトアビジン及び抗ピルビン酸キナーゼ抗体を結合させ、電子顕微鏡観察により確認した。例えば基質濃度が100マイクロモル(μM)の場合には、固定化酵素の活性はフリー(固定化していない)酵素の約50%であったが(図2)、その活性は4℃で48日間保存後もほぼ維持されることが明らかとなった。この微粒子は、エポキシ環の求核試薬に対する反応及びビオチン-アビジン結合を利用して、それぞれ異なる生体分子を固定することが可能である。例えば、この微粒子をキネシン・微小管系分子モーターの微小管に結合させることにより、分子モーターの運動に必要な高エネルギー化合物ATPを自己生産するナノバイオマシンの構築が期待される。

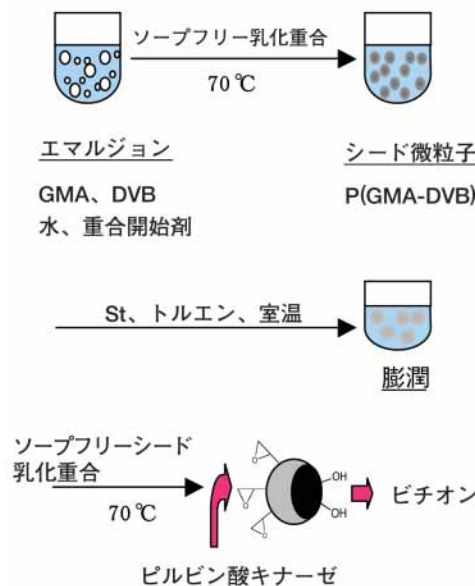


図1 酵素とビオチンを担持した微粒子の調製手順

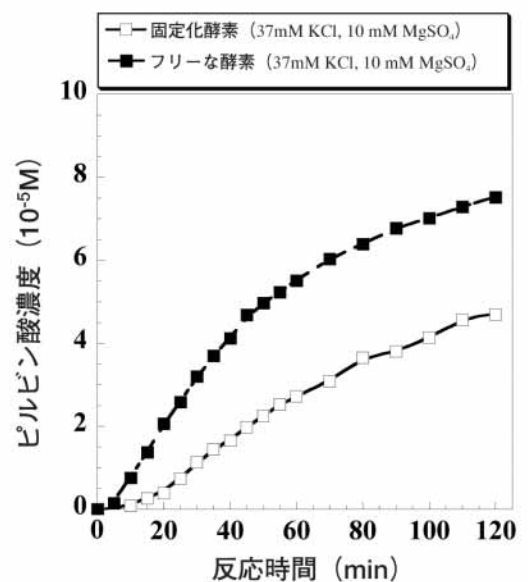


図2 ピルビン酸の生成曲線
(基質濃度100 μM 、pH7.4、25℃)



と えいちろう
杜 永忠
yz-to@aist.go.jp
生物機能工学研究部門

関連情報

- Y.-Z. Du, T. Tomohiro, M. Kodaka: Macromolecules, Vol. 37, No. 3, 803-812 (2004).
- Y.-Z. Du, T. Tomohiro, G. Zhang, K. Nakamura, M. Kodaka: Chem. Commun. No. 5, 616-617 (2004).
- 特願 2003-135519 (小高正人, 友廣岳則, 杜 永忠), 特願 2003-292888, 2003-350034 (小高正人, 友廣岳則, 中村和彦, 杜 永忠) .