

## 固体材料表面と生体分子の相互作用の解析とバイオ融合マテリアル開発への応用



広島大学大学院統合生命科学研究科 池田 丈

## はじめに

触媒作用を有する酵素や、高い結合特異性を有する抗体などに代表されるように、タンパク質は優れた機能を有する天然の分子デバイスと言える。タンパク質の優れた機能を人工材料やデバイスとうまく組み合わせることができれば、互いの特性を活かしたバイオ融合マテリアルの開発が可能となるが、そのためには失活しやすい生体高分子であるタンパク質と、基材となる固体材料という異種材料間の相互作用を適切に制御する必要がある。ケイ素材料ならびにプラスチックを対象とした筆者らのこれまでの研究成果の概要を以下に記す。

## 1. シリカと相互作用するタンパク質を利用した半導体バイオ融合デバイス開発

ケイ素（シリコン，Si）は酸素に次いで地殻上に二番目に多く存在する元素であり、産業的にも広く利用されている。特に、単体のケイ素は主要な半導体材料であり、現在の情報化社会を支える基盤となっている。また、その酸化物であるシリカ（SiO<sub>2</sub>）はガラスや吸湿剤としての利用に加え、クロマトグラフィーにおける担体や、医薬品・食品への添加物など多様な用途に利用されている。筆者らは、ケイ素材料とタンパク質の特性を組み合わせた融合マテリアルの構築を可能にする基盤技術の開発に取り組み、細菌由来のシリカ結合タンパク質を異種材料間の接着分子として利用する手法を以下のように開発した。

## 1-1. 細胞内にシリカを蓄積する細菌の発見

珪藻・海綿・イネなどの一部の真核生物は可溶性のケイ酸（H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>）の形でケイ素を取り込み、その重合体である固体のシリカを殻や骨格などとして利用することが古くから知られている。一方、原核生物とケイ素の関わりについてはこれまでほとんど報告がなかった。筆者らは、多様な代謝系を有する原核生物の中にもケイ素を積極的に利用するものがあると予想し、ケイ酸の取り込みを指標として、ケイ素を利用する細菌の探索を行った。その結果、予想よりも遥かに多くの株でケイ酸の取り込みが認められた（土壌より単離した240株中の約1割）。ケイ酸の取り込みを示した株の全てが、土壌に普遍的に存在する*Bacillus*属細菌であることが判明した<sup>1)</sup>。つまり、自然界には普遍的にケイ素利用細菌が存在するが、これまで見過ごされていたと考えられた。ケイ酸の取り込みは*B. cereus*の近縁種において特に多く見られたため、*B. cereus*をモデルとして解析を行った結果、本菌が栄養飢餓において孢子（芽胞）を形成する時期にケイ酸が細胞内に取り込まれることが判明した。ケイ酸は細胞内でシリカへと重合されて、孢子表面に蓄積されていた<sup>1)</sup>。形成されたシリカ層は、孢子をカプセル状に覆う形で存在しており（図1）、孢子の酸耐性を向上させることも明らかとなった。孢子をシリカで覆うことで自身のストレス耐性を高めるという独自の生存戦略だと考えられた。

## 1-2. シリカ結合タンパク質の取得とタンパク質固定化への応用

本菌のシリカ層は、多数のタンパク質で構成される孢子殻（spore coat）の表面に形成されることから、シリカの形成には孢子殻中のタンパク質が関与していることが示唆された。解析の結果、孢子殻タンパク質のひとつであるCotB1がシリカ形成に必須であることを明らかにした<sup>2)</sup>。また、大腸菌にて発現した組換えCotB1がシリカに対して高い親和性を発揮することを見出した<sup>3)</sup>。CotB1のアミノ酸配列を詳しく解析したところ、C末端側に塩基性アミノ酸が豊富な領域が存在し、この領域がシリカへの親和性において重要な役割を果たすとともに、生体内におけるシリカ形成にも必須であることを明らかにした<sup>2,3)</sup>。

CotB1の全長アミノ酸配列もしくはC末端の塩基性領域に相当するペプチドをタグ配列として遺伝子工学的に融合すれば、シリカに対する結合能を任意のタンパク質に付与することができる<sup>3)</sup>。融合タンパク質を含む溶液をシリカ基材に接触させるだけで、融合したタグ配列部分がシリカ表面に接着するため、基材表面の修飾を行うことなくタンパク質を配向的に固定化できる。半導体である単体のケイ素も表面は自然酸化もしくは熱酸化されることでシリカ被膜が形成されることから、本手法によって半導体の表面にタンパク質を固定化することもできる。

## 1-3. 半導体バイオ融合デバイスの開発

上記技術を利用して、実際に半導体とタンパク質を組み合わせたバイオセンサーの開発を行った。ベースとなる半導体デバイスとしてリング光共振器を採用した。紙面の都合でリング光共振器の動作原理については割愛するが、デバイス表面にタンパク質が吸着した場合、デバイス内部および近傍に導波された近赤外光の共振波長が、タンパク質分子の屈折率によって変化する（詳細は文献4参照）。これにより、認識素子として働くタンパク質（例：抗体）をデバイス表面に固定化しておけば、標的分子（例：抗原）をラベルフリーで検出することができる。

前項にて述べたタンパク質固定化法を用いて、抗体結合タンパク質Protein Gをリング光共振器に固定化し、これを介してさらに抗体を固定化した。表面に抗体が固定化されたリング光共振器は実際に抗原を検出するバイオセンサーとして機能し、癌マーカータンパク質などを10 ng/mlレベルの感度で検出することに成功した<sup>5)</sup>。リング光共振器は半導体微細加工技術によって構築された微細デバイス（<100 μm）であり、シリコン基板上に多数集積化できることから、本融合デバイスはバイオマーカーの網羅的検出法として有望であり、実用化に向けた研究を進めている。

## 1-4. シリカを担体としたタンパク質のアフィニティー精製法への応用

上記の研究は異種材料間の接着を利用した例であるが、相互

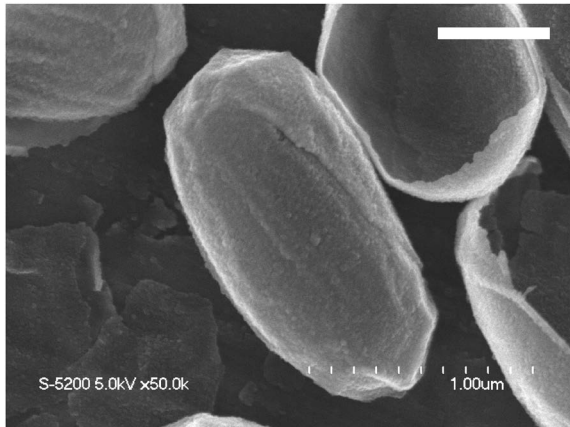


図1. *B. cereus* の孢子より単離したシリカ層の電子顕微鏡写真。スケールバー：500 nm。

作用を制御することで可逆的に脱着させた例を紹介する。

CotB1 の塩基性領域の配列を基に、7残基のみからなる新規シリカ結合ペプチドSB7を開発した<sup>6)</sup>。本ペプチドの接着メカニズムの解析の結果、ペプチド中に複数存在するアルギニン残基が接着に主要な役割を果たしていることを明らかにした。この知見を基に解離条件の探索を行ったところ、L-アルギニンを含む溶液を添加することで、シリカに結合したSB7融合タンパク質を競合的に解離できることを見出した。これらの知見を基に、シリカを精製用担体として、また、L-アルギニンを溶出剤として用いたSB7融合タンパク質のアフィニティー精製法を開発した<sup>6)</sup>。安価な合成シリカ粒子だけでなく天然のシリカ鉱物もそのまま精製用担体として利用できるため、従来のアフィニティー精製法に比べ大幅な低コスト化を実現できる。

## 2. プラスチック表面に対する細胞接着の制御と培養細胞解離法への応用

プラスチックは日々の生活に欠かせないほど多様な用途に使用されており、研究においてもチップやチューブ、ディッシュなどとして利用されている。接着性の細胞を培養する際には、透明性が高く、表面改質が容易なポリスチレン製の培養基材が広く利用されている。ポリスチレンそのものは疎水性が強く、細胞が接着しにくいいため、プラズマ処理などによって表面が親水化されている。細胞は自身が分泌する細胞外マトリックスを介してポリスチレン表面に接着する。培養細胞を継代・回収する場合には細胞をポリスチレンから解離させる必要があり、そのための手段としてトリプシン処理が広く用いられている。タンパク質分解酵素であるトリプシンによって細胞外マトリックスタンパク質を分解することで細胞を解離させるが、細胞表面に存在するタンパク質も同時に分解されてしまうという問題がある。筆者らは、細胞（および細胞外マトリックス）とポリスチレン間の接着を制御することで細胞を解離できないかと考え、ポリスチレン上で培養した細胞に対して、細胞接着を阻害するペプチドや、その構成アミノ酸などを添加し、それらの細胞解離効果について検証した。その結果、L-アルギニンを含むリン酸緩衝液を添加するという単純な手法で、試験に用いた3種の接着細胞をポリスチレンから解離できることを発見した<sup>7)</sup>。L-アルギニンとリン酸という元々生体に存在する物質のみを用いるため、解離後の細胞には余計な酵素や化学物質が含まれな

いという利点がある。また、培養条件にもよるが一部の細胞種は、細胞間の接着を維持したままポリスチレンから解離し、細胞シートとして回収することができた<sup>7)</sup>。安価な細胞シート作製法としての利用を目指し、さらなる検討を進めている。

おわりに

タンパク質の有する優れた機能を、人工材料で再現することは現在の技術では未だ困難であり、タンパク質の機能を利用するためにはタンパク質分子そのものを用いることが実際的である。多様なタンパク質の機能を、様々な人工材料と組み合わせることで、さらなる革新的なバイオ融合マテリアルの開発が今後も進むと期待される。基礎と応用の両面においてさらなる研究を進めることで、農芸化学分野の発展に貢献したい。

(引用文献)

- 1) Hirota R, Hata Y, Ikeda T, Ishida T, Kuroda A The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores. J. Bacteriol., Vol. 192, p 111–116, (2010)
- 2) Motomura K, Ikeda T, Matsuyama S, Abdelhamid MAA, Tanaka T, Ishida T, Hirota R, Kuroda A The C-terminal zwitterionic sequence of CotB1 is essential for biosilicification of the *Bacillus cereus* spore coat. J. Bacteriol., Vol. 198, p 276–282, (2016)
- 3) Abdelhamid MAA, Motomura K, Ikeda T, Ishida T, Hirota R, Kuroda A Affinity purification of recombinant proteins using a novel silica-binding peptide as a fusion tag. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 98, p 5677–5684, (2014)
- 4) 池田文, 横山新, 黒田章夫 半導体とバイオの融合によるバイオセンサーの開発. 日本微生物生態学会誌, Vol. 26, p 64–74, (2011)
- 5) Taniguchi T, Hirowatari A, Ikeda T, Fukuyama M, Amemiya Y, Kuroda A, Yokoyama S Detection of antibody-antigen reaction by silicon nitride slot-ring biosensors using protein G. Opt. Commun., Vol. 365, p 16–23, (2016)
- 6) Abdelhamid MAA, Ikeda T, Motomura K, Tanaka T, Ishida T, Hirota R, Kuroda A Application of volcanic ash particles for protein affinity purification with a minimized silica-binding tag. J. Biosci. Bioeng., Vol. 122, p 633–638, (2016)
- 7) Ikeda T, Ichikawa K, Shigeto H, Ishida T, Hirota R, Funabashi H, Kuroda A Arginine-mediated dissociation of single cells and cell sheets from a polystyrene culture dish. Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 83, p 2272–2275, (2019)

謝辞 本研究は、広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻（現統合生命科学研究所生物工学プログラム）において行われたものです。本研究に携わる機会を賜るとともに終始ご指導ご鞭撻を賜りました黒田章夫先生ならびに本研究の遂行に多大なるご支援を賜りました廣田隆一先生に心より感謝申し上げます。また、半導体バイオ融合デバイスの開発については、広島大学ナノデバイス・バイオ融合科学研究所の横山新先生、雨宮嘉照先生との共同研究の成果です。両先生に深く感謝申し上げます。東京大学農学生命科学研究科の五十嵐泰夫先生（現西南大学資源環境学院生物エネルギー修復研究センター・センター長）、石井正治先生、新井博之先生には学生時代から現在に至るまで温かいご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。なお、本研究は他にも多くの方々のご協力の下で行われました。本研究に携わった全ての方々に感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中四国支部長の櫻谷英治先生ならびにご支援を賜りました中四国支部の先生方に厚く御礼申し上げます。