

ファージディスプレイを用いた金属ナノ粒子の作成

Construction of metal nanoparticles using phage display system

○清宮健太¹, 伊藤功貴¹, 小田真弓², 谷川実², 須川晃資², 梅垣哲士², 西村克史^{2,3}* Kenta Seimiya¹, Koki Ito¹, Mayumi Oda², Minoru Tanigawa², Kosuke Sugawa², Tetsuo Umegaki², Katsushi Nishimura^{2,3}

Abstract: The T7 phage display system uses the T7 capsid protein to display peptide on the surface of the phage. This system is easy to use and has the capacity to display peptide up to about 50 amino acid in size in size high copy number (415 per phage). The present study is aimed at construction of metal nanoparticles using phage display in which metals are chelated by side chains of amino acids displayed. A recombinant phage displaying deca-peptide (GGGGEEEEEE) was engineered and genetically made. UV-visible spectroscopic measurements revealed that the recombinant phage bound Co^{2+} ion.

1. 目的

T7 ファージディスプレイ法はファージの頭部 (正 20 面体構造) の表面に 1~415 個のペプチドを提示する技術である。触媒化学・光化学の分野で金属ナノ粒子は注目されているが、構造と性質が均一なナノ粒子を作製することは難しい。本研究では金属ナノ粒子の作製を目的として、金属をキレートするモデルペプチドを化学合成し、また、同ペプチドを提示するファージを作成し、これらのペプチドと金属との結合を調べた。

2. 方法及び結果

2-1. ペプチドの設計

アミノ酸配列を Gly-Gly-Gly-Gly-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu (ペプチド Gly4Glu6) とし、合成 (依頼) した。

2-2. オリゴ DNA の設計

ペプチド Gly4Glu6 をコードし、5'側に *EcoR* I サイトを持つ Forward オリゴ DNA と、5'側に *Hind*III サイトを持つ Reverse オリゴ DNA を DNA 解析ソフト (DNAMAN) を用いて設計し、合成 (依頼) した (Table1)。

Table 1. 設計したオリゴ DNA の塩基配列

Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Stop
5'- AAT	TCA	GGC	GGT	GGC	GGT	GAA	GAG	GAA	GAG	GAA	GAG	TAA
3'-	GT	CCG	CCA	CCG	CCA	CTT	CTC	CTT	CTC	CTT	CTC	ATC

2-3. 組換えファージの作成と力価の測定

ファージベクターに導入するため、2-2 で設計した 2 種のオリゴ DNA をアニーリングして 2 本鎖 DNA とし、T4

Polynucleotide Kinase を用いて 5' 末端をリン酸化した。リン酸化されたオリゴ 2 本鎖 DNA を DNA Ligation Kit ver.2 を使用し、ファージベクターに挿入した。T7 Select Packaging Extract とライゲーション反応液を混合 (ファージ粒子を形成) した。大腸菌 BL21 と 10^2 - 10^6 倍希釈したファージ溶液を混合し、LB 寒天プレートに撒いた。LB 寒天プレート上のプラークの数を計測し、力価を算出した。その結果、すべてのプレートにプラークが確認された。 10^3 倍、 10^4 倍希釈の力価はそれぞれ 2.51×10^6 pfu/ml、 2.20×10^6 pfu/ml であった。

2-4. 組換えファージと金属との結合

得られたファージ溶液を濃縮器 (vivaspin) に入れ遠心 (4500 g , 85 min , 4°C) した後、純水 300 ml に対して透析 (1 h , 2 times , 4°C) した。ファージの力価は計算上 2.20×10^7 pfu/ml であった。透析後のファージを 30 mM 塩化コバルト (II) と混合し、UV-VIS 吸収スペクトルを測定した。

塩化コバルト $8 \mu\text{l}$ とファージ $16 \mu\text{l}$ を混合し、0 分と 60 分後の UV-VIS 吸収スペクトルを測定した結果、塩化コバルトのスペクトルの極大波長が 511 nm から 488 nm にシフトした (Fig. 1)。この結果より、ファージが提示したペプチドとコバルトが結合したことが示唆された。

現在、合成ペプチドと金属との結合について調べている。

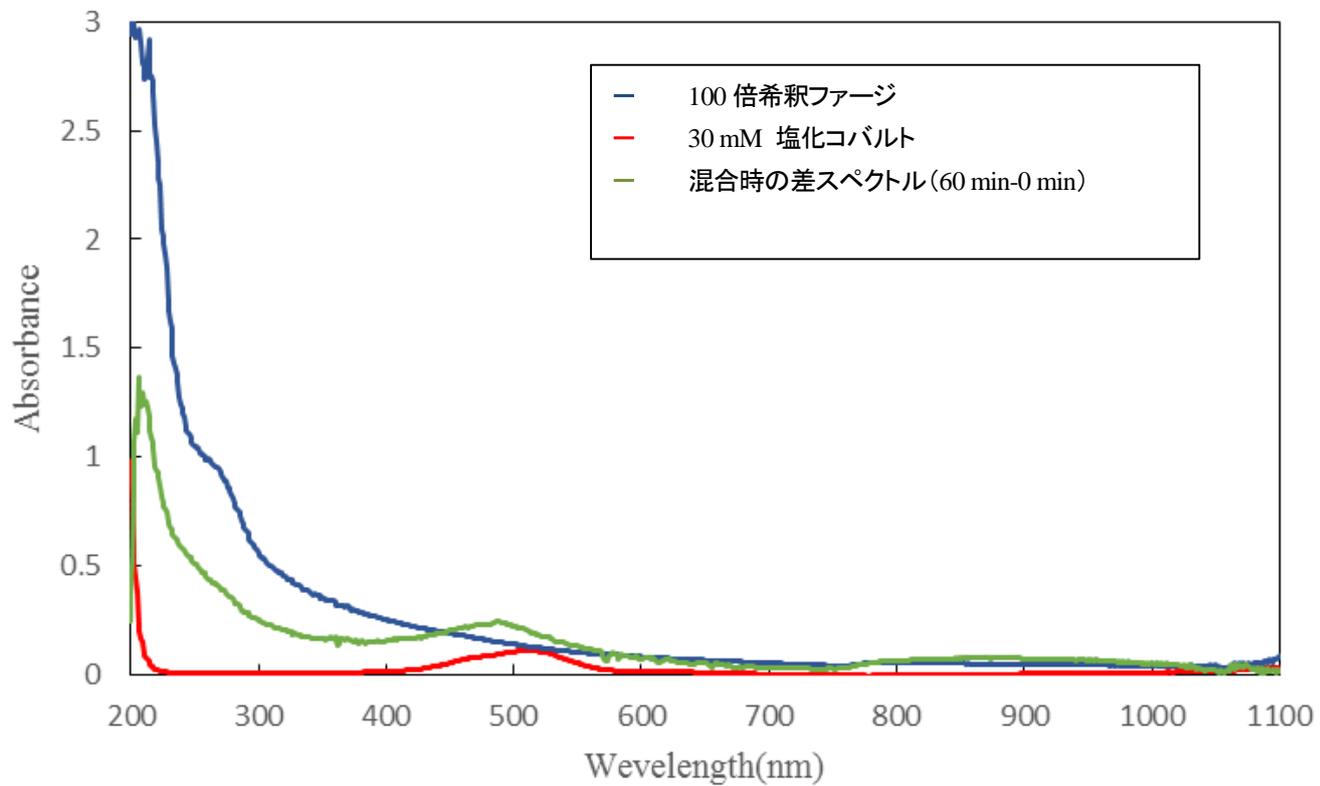


Fig. 1. UV-VIS 吸収スペクトル