

N-21

ファージディスプレイ法を用いた光機能素子及び触媒としての金属ナノ粒子の精密設計

Precision engineering of metal nanoparticles as optical devises and catalysts using phage display

○鈴木佳大¹, 高村友梨¹, 平戸祐喜², 小田真弓³, 谷川実³, 須川晃資³, 梅垣哲士³, 西村克史^{3,4}* Yoshihiro Suzumura¹, Yuri Takamura¹, Yuki Hirato², Mayumi Oda³, Minoru Tanigawa³, Kosuke Sugawa³, Tetsuo Umegaki³, Katsushi Nishimura^{3,4}

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 high copy number (415 per phage). The present study is aimed at construction of metal nanoparticles using phage display system in which metals are chelated by side chains of amino acids displayed.

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 415 個のペプチドを提示する技術である。触媒化学や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。

本研究は、ファージ粒子を骨格にした金属ナノ粒子の構築手法を確立し、精密設計によって構造と性質の相関を解析することにより、新奇で高機能な光機能性材料と集積型金属触媒を調製することを目的とする。ここでは、ニッケル・コバルト・鉄 (触媒活性)、あるいは、金クラスター (表面プラズモン共鳴) を結合するファージ粒子の作製を試みた。

2. 方法

2-1. ファージの増幅

液体培養した大腸菌にファージ溶液 25 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C, 2 時間振盪培養し、遠心分離 (8000 g \times 5 min, 4 $^{\circ}$ C) 後、その上清をファージ溶液とした。

2-2. プラーク分析

本培養した大腸菌 BL21 250 μ l と 10⁶-10⁹ 倍に希釈したファージパッケージング溶液 100 μ l を混合した。混合液をトップアガロース溶液 5 ml に加え、LB 寒天プレートに注ぎ、T7 ファージに大腸菌 BL21 を溶菌させた。T7 ファージの感染によって生じたプラークの数から力価を算出した。

2-3. 超遠心分離を用いたファージと金属との反応

T7 ファージサンプルに 15 μ M の金属化合物を加えて、一時間室温で攪拌しながらインキュベートした。その後

30 μ M の NaBH₄ を 100 μ l 加え遠心分離 (153,000 g \times 30 min, 4 $^{\circ}$ C) した。純水を 1 ml 加え、沈殿を溶解させた後 UV-VIS スペクトル測定した。

2-4. PEG 沈殿法を用いたファージと金属との反応

ファージ溶液 5 ml に 60 mM の金属サンプルを 5 ml 加え、1 時間室温で攪拌した。20% (w/v) PEG6000 を 10 ml 加え、一晩 4 $^{\circ}$ C で静置した。遠心分離 (10,000 g \times 10 min, 4 $^{\circ}$ C) 後、沈殿物を 5 ml の純水に溶解させ UV-VIS スペクトル測定を行った。

3. 結果と考察

3-1. プラーク分析による力価の算出

力価 (pfu/ml) を Table 1 にまとめた。ファージを大腸菌に感染させる増幅を行うと、ファージの感染力は増加することがわかった。

Table 1. Plaque assay.

	1st (pfu/ml)	2nd (pfu/ml)	3rd (pfu/ml)
Gly4Glu6	4.88 \times 10 ⁹	1.65 \times 10 ¹⁰	
Gly4His6	1.73 \times 10 ¹⁰	2.2 \times 10 ¹⁰	
GA3KA3K	8.2 \times 10 ¹⁰	2.1 \times 10 ¹⁰	4.2 \times 10 ¹⁰
Wild	2.7 \times 10 ¹⁰		

Gly4Glu6: Gly Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 Gly4His6: Gly Gly Gly Gly His His His His His His
 GA3KA3K: Gly Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・院 (後)・応化 3: 日大理工・教員・応化 4: 日大短大・教員・化学

3-2. 超遠心分離によるファージ粒子の濃縮と金属との結合 (Fig. 1)

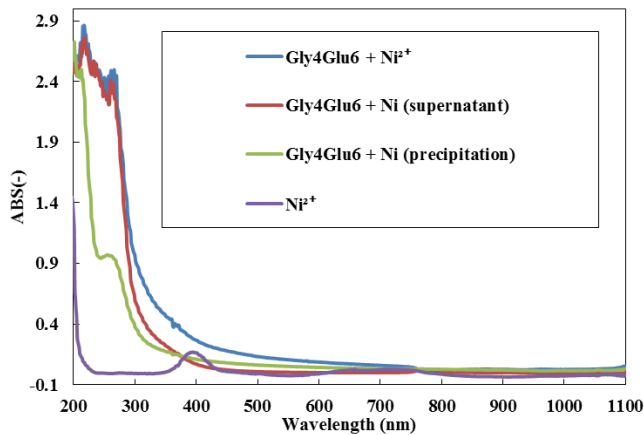


Fig. 1. UV-VIS spectra of Gly4Glu6 upon addition Ni^{2+} after ultracentrifugation.

UV-VIS スペクトル測定によって、ファージ粒子及び金属イオンの定性・定量ができることがわかった。超遠心分離後の上清と沈殿のスペクトルより、超遠心分離によってはファージ粒子の濃縮が困難であることが分かった。ニッケルと Gly4Glu6 ファージの結合状態は、UV-VIS スペクトルのみでは解析が難しいことが分かったため、他の分析方法の検討が必要である。

3-3. PEG 沈殿法によるファージ粒子の濃縮と金属との結合 (Fig. 2)

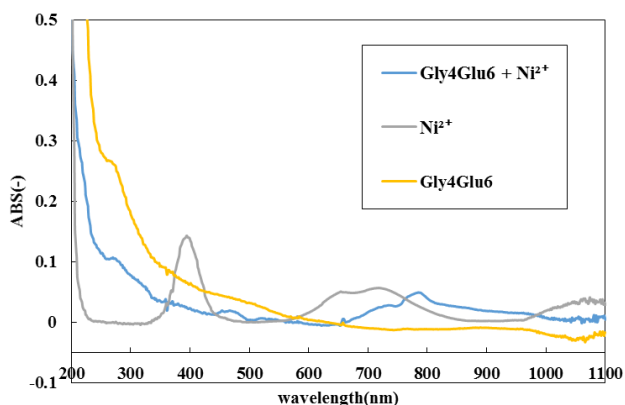


Fig. 2. UV-VIS spectra of Gly4Glu6 upon addition Ni^{2+} after PEG precipitation.

PEG 沈殿後のスペクトルより、PEG 沈殿法によってファージ粒子を沈殿させ濃縮することが可能であることが分かった。また、3-2 で示したようにニッケルと Gly4Glu6 ファージの結合状態を確認することは困難であった。

4. 謝辞

本研究は、平成 26 年度理工学部応用科学研究助成の助成を受けて行った。

5. 参考文献

- [1] Siva Sai Krishna Dasa, Qiaoling Jin, Chin-Tu Chen, Liaohai Chen, "Target-specific copper hybrid T7 phage particles." *Langmuir*, Vol.28, Issue.50, pp17372–17380, 2012.