

3P059 分子シャペロンによる金属コロイドのサイズ選択的凝集抑制

(JST さきがけ¹, 理研², 東農工大³) ○迫野昌文^{1,2}, 座古保², 養王田正文³, 前田瑞夫²

【緒言】金コロイドなどに代表される金属コロイドは、水溶液中における分散状態の変化により局在プラズモンを変化する性質を有することがこれまでに知られている。この性質を利用することで、医療における診断マーカーやバイオセンサーなどへの応用がなされている。金コロイドは、水溶液中の塩濃度の上昇に応じて不可逆的に凝集することから、それを防ぐために様々な凝集保護剤がこれまでに検討されている。

分子シャペロンは、細胞内においてタンパク質間の凝集抑制やフォールディング補助などを行うタンパク質群の総称である。その高いタンパク質凝集抑制活性から、タンパク質発現等に多く利用されている。そこで、本研究では、タンパク質の凝集抑制を行う分子シャペロンを用いて、無機物である金コロイドの凝集を抑制することを検討した。

【実験】純水に分散した直径 10nm のクエン酸還元金コロイドを、15000rpm で 1 時間遠心分離を行い、金コロイドを沈殿させた。純水を除去した後、金コロイドが 0.5 μ M となるように各種濃度で調製したタンパク質溶液 (PBS 緩衝液) を添加し、vortex を用いて金コロイドを再分散させ、室温で 10 分間放置した。タンパク質として Lysozyme (LYS), bovine serum albumin (BSA) 及び分子シャペロンである prefoldin (PFD)(Fig.1)を用いた。分散後の金コロイド溶液を紫外可視分光光度計及び TEM を用いて観測した。

【結果及び考察】PBS 緩衝液を用いて金コロイドの再分散を行った。金コロイドは純水中において 520nm に吸収ピークを有する赤色の分散溶液となるのに対し、PBS 緩衝液中では 620nm に吸収ピークを示す青紫色の溶液となった。PBS 緩衝液中には高濃度にカリウム及びナトリウム等の塩が含まれていることから、色調の変化はこれらの塩により金コロイドが凝集したことによるものであると考えられる。

次に、PBS 緩衝液中に、0.5 μ M となるように各種タンパク質(LYS, BSA, PFD)を溶解し、このタンパク質溶液を用いて再分散実験を行った。LYS, BSA において、Fig.2 に示すように、520nm から高波長側へ吸収ピークがシフトした。一方、PFD を溶解した溶液においては、吸収ピークの著しいピークシフトは観測されなかった。そこで、それぞれの溶液に含まれる金コロイドを、TEM を用いて観察したところ、LYS, BSA においては金コロイドの凝集が見られた。しかし、PFD においては、純水に分散させた際と同様に、金コロイドが均一に分散しており、凝集が認められなかった。

次に、タンパク質の濃度を変化させて、上記と同様の実験を行った。金コロイドの分散ピークである 520nm と凝集ピークである 620nm の Absorbance の比からコロイ

ドの凝集割合を評価した。LYS, BSA では、タンパク質濃度が 1 μ M 以上に高くなるにつれて凝集抑制を示すが、それ以下の濃度では金コロイドの凝集の抑制はできなかった。一方、PFD は 0.5 μ M の濃度まで金コロイドの凝集が観測されず、0.1 μ M の低濃度においても高い凝集抑制効果を示すことが明らかとなった(Fig.3)。

また、クエン酸還元金コロイドの大きさが 20nm, 40nm のものを用いて PFD による再分散実験を行ったところ、10nm の金コロイドと対照的に凝集抑制活性が極めて低い結果となった。PFD は Fig.1 に示す構造を取ることがこれまでに明らかになっており、PFD を構成する各サブユニットが約 10nm の疎水空孔を形成する。この疎水空孔に変性したタンパク質などが補足されることによりタンパク質間の凝集が抑えられていることが明らかになっている。よって、疎水空孔よりも大きなサイズのコロイドでは空孔との相互作用が弱くなったものと考えられる。Fig.3 の結果からも、PFD 濃度が 0.5 μ M 以下になると凝集抑制活性が減少していくことが示されていることから、10nm の金コロイドは PFD と 1:1 で相互作用していることが示唆される。よって、PFD は、金コロイドの PBS による凝集を、疎水空孔に金コロイドを補足することにより抑制しているものと考えられる。

【結言】分子シャペロン PFD は、変性タンパク質同様に無機金属コロイドの凝集も抑制することを明らかにした。

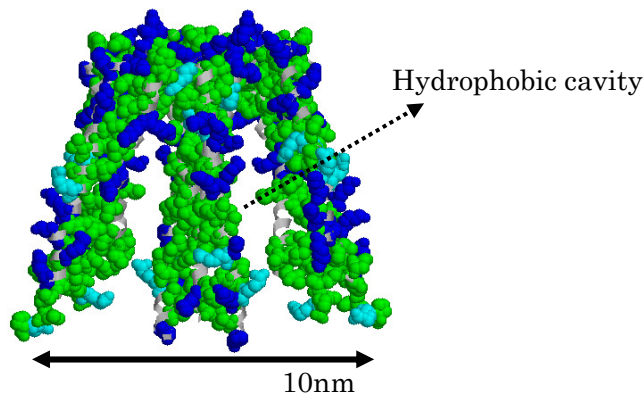


Figure 1 *Pyrococcus horikoshii* PFD

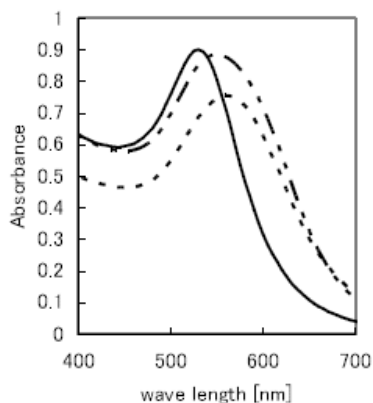


Figure 2 Absorbance of Au colloid

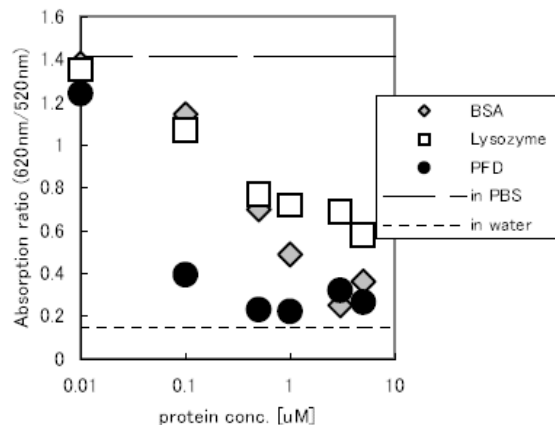


Figure 3 Turbidity measurement