

# 蛍光タンパク質を用いた非特異的吸着の評価方法

楊 振\* 佐々木 智憲\*\*

## Evaluation of the Nonspecific Adsorption Effects of Using Fluorescent Proteins

Zhen Yang\*, Tomonori Sasaki\*\*

キーワード: 蛍光タンパク質, 非特異的な吸着

Keywords: Fluorescent protein, Nonspecific adsorption effect

### 1. はじめに

都内にある企業が新たに吸着抑制用の表面処理剤を開発した。これは細胞の表面構造を参考にして合成されたポリマーで、タンパク質の非特異的吸着に対して非常に高い抑制効果を有すると予想される。ターゲットは従来の試験容器の他に、近年研究が盛んになっているマイクロ流路である。マイクロ流路の場合、体積に対して表面積が非常に大きいため、流路の壁面におけるタンパク質の非特異吸着を抑制するニーズが高まっている。しかし、吸着抑制効果の評価に課題があった。例えば、原子力顕微鏡(AFM)では、処理表面の凹凸状況を直接観察できるが、測定時間がかかり、測定範囲も非常に狭いという弱点があり、処理面内において全体の均一性評価は困難である。特にマイクロ流路は密閉構造のため AFM の触針が入り難い。また、蛍光標識タンパク質を用いて処理面を評価する方法もあるが、評価用の試薬は高価な上、蛍光分子の数にバラツキがあるため、高濃度の評価試料が出来ないことがネックとなっている。この結果、低濃度のタンパク質試料を流してその吸着量を評価すると、基板材料の自発蛍光ノイズの影響で、シグナルが検出できないこともある。タンパク質の標識法は蛍光以外に酵素の POD, ALP 或いは放射性同位元素 (RI) を用いた方法がある。しかし、これらの標識法では、購入試薬の純度と標識率にバラツキがあり、実験の再現性を取りにくいという欠点がある。感度的には RI 標識はもっとも優れ、低濃度のタンパク質試料でも評価可能である。しかし、RI の実験場所が制限される上、使用手続きは非常に煩雑である。そこで、本研究では伝統的なタンパク質の RI 標識ではなく、蛍光タンパク質を直接利用し、固体表面への非特異的吸着の評価指標となりうるかどうかの検討を行った。

### 2. 実験方法

蛍光タンパク質 GFP および DsRED の遺伝子が組み込まれ

た大腸菌をそれぞれ培養し、超音波破碎法で菌体内の蛍光タンパクを取り出す。手順を以下に示す。①50ug/ml (最終濃度) アンピシリンを添加した液体 LB 培地 5ml の中懸濁した大腸菌を 50ml スクリューキャップ遠心管に入れて 37°C で振とう培養する。培養時間は GFP 株が 15 時間、DsRED 株が 17 時間である。②Tris-HCl (pH 7.4) バッファで培養した菌体を 2 回洗い、氷の上で、超音波で菌体を破碎する。③壊した細胞膜や他の沈殿物質を遠心分離 (3,000 x g / 30 分, 4°C) で取り除き、蛍光タンパクを含む上清液が試料とする。

タンパク質の吸着量評価では、まず対象の基板や流路を水で湿らせ、次に蛍光タンパク試料を流して、最後はバッファでリンスする。対象部分の蛍光強度を蛍光顕微鏡或いは可動共焦点レーザー走査イメージアナライザー (Typhoon9400) で評価した。

### 3. 結果

2 種類の蛍光タンパク質を用いて実験し、共に良い感度で検出することができた。蛍光タンパク GFP より、DsRED の方が特に蛍光安定性がよいので、実験には DsRED を用いて評価した。マイクロ流路の表面処理方法を変化させて、タンパク質の流路への吸着量の評価を実施した結果を図 1 に示す。図の左は、撥水処理した流路。図の右は、表面処理剤メーカーが開発した処理剤をコーティングした流路である。撥水処理は液切れを良くするので、タンパク質にも低吸着と誤解されやすいが、全面が明るい蛍光で、タンパク質が大量吸着していると判断できる。開発した処理剤の方は蛍光量が低く、吸着抑制性能が高いことがわかる。表面

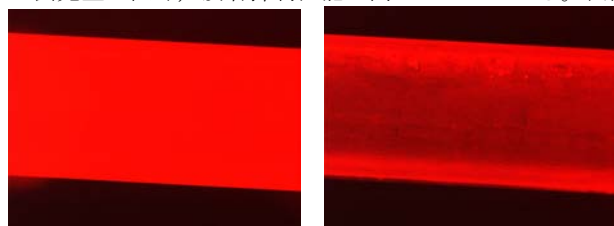


図1. 幅 300um の Glass/Si マイクロ流路内部における表面処理剤の効果を示す蛍光顕微鏡写真(白いほど蛍光が強い, カラー写真を参照<sup>(1)</sup>). 左は撥水処理した流路。右は開発品で処理した流路。

\* エレクトロニクスグループ

\*\* 都市開発プロジェクト

処理剤のメーカーでもこの方法で評価したところ、良い結果が得られている(図2参照)。開発品で処理した面は、基材である Slide glass のバックグラウンド程度であり、未処理部分と比べると高い吸着抑制を確認した。

#### 4. 考察

蛍光タンパク質を吸着量評価に利用するのは非常に効率的な評価法である。大面積の表面処理の場合、イメージアナライザーで高速に蛍光観測できるし、密閉のマイクロ流路には AFM 評価のように触針を入れる必要がないので、蛍光顕微鏡で迅速に吸着性を評価できるメリットがある。

##### 4.1 評価方法として経済的なメリット

一般的には、IgG やアルブミンを用いて表面の吸着量を評価する。実際、これらのタンパク質を定量評価に利用する場合は標識が必要なので、手間がかかる上、コストも高くなる。それに対して、本評価実験に利用したのは 2 種類の蛍光タンパク質 GFP と DsRED である。これらの蛍光タンパク質は自家製なので、コスト的にも大腸菌の液体培養で精製した標識タンパク質よりはるかに優れている。

##### 4.2 品質保証

生物実験では再現性が問題になることは非常に多いが、本評価方法では、品質保証の観点から蛍光タンパク質は使用の直前に調製できるので、貯蔵や運送などの不確実な環境による変化はなく、品質のコントロールが容易である。蛍光タンパク質の試料は大腸菌の培養により作られ、品質の制御が可能である。-70℃のフリーズ・ストックからプレート上の寒天培地に線画培養を経由して、その後液体培地で培養する。この技術を使えば、液体培養する時点で、大腸菌の初期状態にばらつきが少なく、タンパク質の発現量や成熟度などに関して再現性の高い試料を調製できる。

一方で、購入タンパク質の濃度が低いのは問題だったが、本評価法では、大腸菌を破砕する時バッファの量で自由に濃度の調整が可能である。ただし、タンパク質は凝集問題がある。本評価法では試料の中に凝集防止の界面活性剤を添加できず、凝集したタンパク質はそのままロスとなる。

##### 4.3 豊富な選択肢

蛍光タンパク質のアミノ酸の一次配列のほかに、3 次元構造など詳細な物性も解明された。GFP は緑の蛍光を呈する分子量 27kDa の単量体であり、DsRED は赤い蛍光を呈する分子量約 90kDa の 4 量体である。また、GFP と DsRED のほかに 7 種類の蛍光タンパク質が市販されているので、基板や標的タンパク質の特性に合わせて選択できる。

##### 4.4 問題点

本評価法はタンパク質の非特異的な吸着に対し、すべてカバーできる訳ではなく、欠点もある。第一に、この評価法に使用した蛍光タンパク質は精製したものではない。試料は大腸菌の細胞膜を機械的に壊し、簡単な遠心分離で調製したものである。蛍光タンパク質以外に多数の大腸菌のタンパク質を含んでいる。評価に測定する蛍光強度は吸着タンパク質の絶対量ではなく、吸着量の指標であるので注

意が必要である。

また、従来の評価方法と同じ問題もある。各種の表面処理法に対する本評価法の結果は DsRED 或いは GFP に対するもので、全てのタンパク種に必ずしも当てはまるものではない。非特異的な吸着の主な原因は疎水性アミノ酸(8 種類)による疎水性相互作用である<sup>(2)</sup>。各種タンパク質の疎水性アミノ酸の量並びに立体構造が異なるため、非特異的な吸着の挙動は推測しにくい。もう一つ静電相互作用も無視できない。タンパク質がそれぞれの等電点を境に正負電荷が逆転する両性分子である事から、溶媒の pH、バッファのイオン強度によってタンパク質-固体表面間並びにタンパク質-タンパク質間の引力-斥力が変化し吸着性は大きく変化してしまう<sup>(2)</sup>。本評価法で得た各表面処理法の優劣の結果は pH やイオン強度などの環境変化によって、変わる可能性も考えられる。蛍光の安定性にも課題を残している。蛍光タンパク質は生体分子なので、励起光に照射されると単単位で蛍光強度は弱くなり、最後には完全に退色してしまう。このため、一般的には観察と撮影は小まめに励起光のシャッターを切り、ダメージを最小限にする。

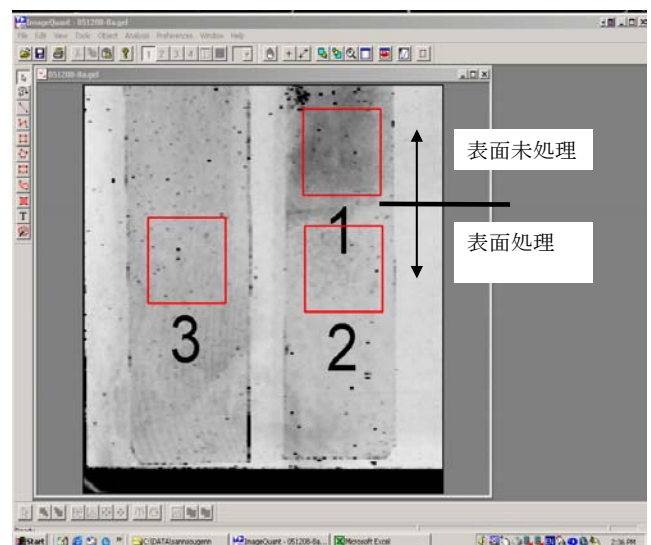


図2. イメージアナライザーで撮った非特異的吸着の抑制実験の解析図(黒ほど蛍光が強い、メーカーの提供)。2 枚の Slide glass は下の 2/3 部分を合成ポリマーで処理した。左の Slide glass は Background である。右は DsRED 蛍光タンパク質をたらした後、水でリンスした。

#### 5. まとめ

蛍光タンパク質を用いて、固体表面への非特異的吸着の評価方法を確立し、大面積のサンプル及びマイクロ流路に応用し、実証した。

(平成 18 年 10 月 25 日受付, 平成 18 年 12 月 22 日再受付)

#### 文 献

- (1) <http://www.iri-tokyo.jp/publish/tirinews/TN20061006.pdf>
- (2) <http://www.sumibe.co.jp/sumilon/technical26.htm>