

タンパク質選択的吸着特性を示すペプチド含有リン酸カルシウムナノ粒子の合成

(¹ 愛工大, ² 産総研) ○小島鈴果^{1,2}, 永田夫久江², 釘宮慎一¹, 加藤且也^{2,*}

■緒言■ ハイドロキシアパタイト (HAp) は、タンパク質と強い親和性を持ち、選択的吸着材や分離用クロマト担体として利用されている。HAp には *a* 面と *c* 面の二つの結晶面が存在し、それぞれの結晶面で吸着するタンパク質が異なることが報告されている。そのため、HAp を選択的吸着材や分離用クロマト担体として用いる際に、高いタンパク質選択的吸着性が極めて重要である。本研究では、HAp 合成時にペプチドを混合することでペプチド含有リン酸カルシウムを合成し、それらのタンパク質吸着性を評価した。

■実験方法■ リン酸水素二アンモニウム水溶液 (9 mM, 200 mL) と酢酸カルシウム水溶液 (15 mM, 200 mL) を混合し、得られた懸濁液を 60 °C で 3 時間攪拌した。徐冷後に遠心分離し、洗浄、乾燥して、粉体生成物を得た。合成時におけるペプチドの存在がタンパク質選択的吸着性に及ぼす影響を調べるために、酢酸カルシウム水溶液中にそれぞれ 5, 10, 20 mg のポリグルタミン酸 (p-Glu) またはポリリジン (p-Lys) を混合し、同様の手順で合成した。合成した試料は、BET、FE-SEM、XRD、IR、TG-DTA、ゼータ電位により評価した。タンパク質吸着には、Bovine Serum Albumin (BSA)、Cytochrome c (Cyt c)、Myoglobin (MGB) を用いた。試料 5 mg と 0.5 mg/mL タンパク質溶液 1 mL を混合し 4 °C で一晩攪拌した。その後、遠心分離し、上澄み 10 μL とタンパク質定量試薬 (Bio-Rad) 200 μL を混合し、分光光度計 (λ=595 nm) で測定し、タンパク質の吸着量を算出した。

■結果と考察■ TEM画像より長さが 60 nm × 30 nm 程度のナノ粒子が観察された (Fig.1)。また、HAp の表面電位は、-24.05 mV であったが、酸性ペプチドである p-Glu を 20 mg 混合した場合は -46.78 mV へ電位は減少した。塩基性ペプチドである p-Lys を 20 mg 混合した場合は +19.85 mV へ増加した。これはペプチドを混合したことで、HAp がペプチドの電位の影響を受けたためであると考えられる。次に、ペプチドを混合して合成した HAp に対してタンパク質吸着実験を行った。p-Glu を 20 mg 混合した場合 Cyt c については 0.10 mg /mg HAp、BSA については 0.02 mg /mg HAp の吸着量を示した。しかし、5 mg 混合した場合 Cyt c については 0.09 mg /mg HAp、BSA については 0.07 mg /mg HAp の吸着量を示し、タンパク質の選択吸着性が大きく低下することが分かった。また、p-Lys を複合化させた場合も同様な結果を示し、複合化させたペプチド量が増加するに従って、タンパク質の選択的吸着性が大幅に上昇することが明らかとなった (Fig.2)。

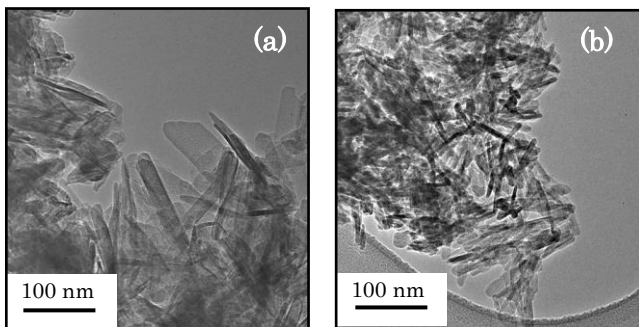


Fig.1. TEM micrographs of synthesized HAp: (a)p-Glu-HAp, (b)p-Lys-HAp.

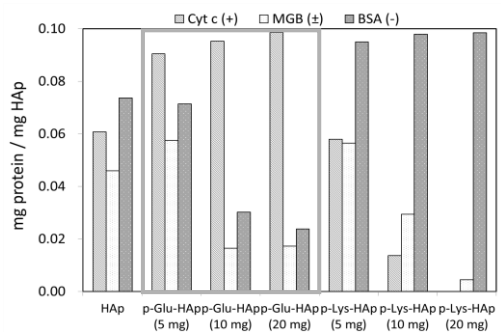


Fig.2. Adsorption of Cyt c, MGB and BSA on synthesized HAp particles.