(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4225891号
(P4225891)

(45)発行日　平成21年2月18日(2009.2.18)　(24)登録日　平成20年12月5日(2008.12.5)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 17/00	(2006.01)	C07K	17/00	
C12Q 1/00	(2006.01)	C12Q	1/00	ZNMC
C12N 11/00	(2006.01)	C12N	11/00	

請求項の数 15　(全 14 頁)

(21)出願番号	特願2003-500283 (P2003-500283)
(86)(22)出願日	平成14年5月29日 (2002.5.29)
(65)公表番号	特表2005-500026 (P2005-500026A)
(43)公表日	平成17年1月6日 (2005.1.6)
(86)国際出願番号	PCT/AT2002/000165
(87)国際公開番号	WO2002/097118
(87)国際公開日	平成14年12月5日 (2002.12.5)
審査請求日	平成17年3月9日 (2005.3.9)
(31)優先権主張番号	A 843/2001
(32)優先日	平成13年5月29日 (2001.5.29)
(33)優先権主張国	オーストリア(AT)

(73)特許権者　503427430
ナノ―エス　バイオテクノロジィ　ゲエムベーハー
オーストリア国　１１８０ウイン　グレゴールメンデルストラッセ３３，　ユニヴァシテエート　フュア　ボーデンカルチャ／ツェトウエフ
(74)代理人　100080698
弁理士　小田　治親
(72)発明者　スレイトル・ウベ・ビー
オーストリア国　エイ―１２２０ウイン　ウエッグ２６／エヌアール．４５　インダストリストラッセ７８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】機能分子層の生成方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

機能分子の担体を提供するため基体表面にＳ層タンパク質の層を生成する方法であって、

基体表面を提供するステップと、

Ｓ層タンパク質を含む第１の溶液を提供するステップと、

前記第１の溶液を前記基体表面に接触させ、かつ、前記第１の溶液中に比較電極を提供するステップと、

前記第１の溶液と接触している前記基体表面上の第１の電気化学的条件が前記第１の溶液中の前記比較電極に対して前記基体表面に第１の電気化学ポテンシャルを付加することによって提供され、該第１の電気化学的条件において前記基体表面にＳ層タンパク質を層状に堆積させるステップと、

前記基体表面上の第２の電気化学的条件が前記比較電極に対して前記基体表面に第２の電気化学ポテンシャルを付加することによって提供され、該第２の電気化学的条件において前記基体表面に堆積したＳ層タンパク質の前記層中に二次元結晶構造を形成するステップと、

を備えることを特徴とするＳ層タンパク質の層を生成する方法。

【請求項２】

Ｓ層タンパク質の層が二次元結晶構造を形成する際に前記第１の溶液と接触しており、Ｓ層タンパク質の層を堆積するステップと結晶構造を形成するステップとの間で、前記第

１の溶液の少なくとも一つの化学パラメータを変えることを特徴とする請求項１に記載の方法。

【請求項３】

Ｓ層タンパク質の層が二次元結晶構造を形成する際に前記第１の溶液と接触しており、Ｓ層タンパク質の層を堆積するステップと結晶構造を形成するステップとの間で、前記第１の溶液の少なくとも一つの電気化学パラメータを変えることを特徴とする請求項１又は請求項２に記載の方法。

【請求項４】

前記Ｓ層タンパク質の堆積及び／又は前記結晶構造の形成において、前記タンパク質の立体配座の変化が生じることを特徴とする請求項１から請求項３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】

前記Ｓ層タンパク質の堆積及び／又は結晶構造の形成が、経時的に変化する電気化学ポテンシャルによって制御されることを特徴とする請求項１から請求項４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】

前記Ｓ層タンパク質の堆積が比較電極を有する前記第１の溶液中で行われ、前記結晶構造の形成が第２の溶液中で行われることを特徴とする請求項１、請求項４及び請求項５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】

前記第１の溶液へ接触させる前に、静電気的に正味の電荷を前記基体表面に印加し、前記複数の溶液を通過する工程の間、この電荷を維持することを特徴とする請求項６に記載の方法。

【請求項８】

前記第１の溶液中で前記基体表面に正味の電荷を電気化学的に印加し、前記複数の溶液を変えてもこの電荷を維持することを特徴とする請求項６又は請求項７に記載の方法。

【請求項９】

堆積用の第１の溶液槽から結晶化用の第２の溶液槽へ前記基体表面を移送することによって、前記溶液の変更を行うことを特徴とする請求項６から請求項８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０】

前記Ｓ層タンパク質の堆積前においても機能分子を該Ｓ層タンパク質に結合し、さらに、該Ｓ層タンパク質の堆積と同時に該機能分子を前記基体表面上に堆積することを特徴とする請求項１から請求項９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】

前記Ｓ層タンパク質の層内で前記結晶構造が形成された後、前記結晶構造によって規定される位置の前記基体上に機能分子を堆積することを特徴とする請求項１から請求項１０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２】

前記Ｓ層タンパク質の層内で前記結晶構造が形成された後、前記結晶構造によって規定される位置の前記基体上に電気化学的ナノ粒子を堆積することを特徴とする請求項１から請求項１１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１３】

前記基体の前記電気化学ポテンシャルを定電圧的に制御することを特徴とする請求項１から請求項１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】

前記立体配座の変化がＳ層タンパク質の変性であることを特徴とする請求項４から請求項１３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】

前記立体配座の変化がＳ層タンパク質の再生であることを特徴とする請求項４から請求

項１３のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、機能分子の担体を提供するため基体表面にＳ層タンパク質の層を生成する方法に関する。
【０００２】
タンパク質（細菌細胞表面層）を含む結晶性細胞表面層から再結晶化Ｓ層を固体基体又は液体素材上に製造することについて、例えば欧州特許第０１５４６２０Ｂ１号（＝米国特許第４，７５２，３９５号明細書）に記載があり、具体的には、原核細胞の多層の細胞表面層（以下Ｓ層と称する）の生成方法及び限外ろ過膜としてこれを使用する方法に関して記載されている。
【０００３】
Ｓ層は、原核細胞の細胞壁成分として生じるタンパク質からなり、Ｓ層タンパクのアミノ酸配列は通常、型特異性又は株特異性があり、Ｓ層タンパク質は通常、単純タンパク質又は糖タンパク質である。現在、細胞表面が結晶構造である細菌株として数百のものが公知である。これらの構造の格子定数は、約３から３５ｎｍの範囲内にあり、単分子層としてのＳ層は大部分が３から３０ｎｍ厚である。
【０００４】
単離された－もとの細胞から単離された－Ｓ層タンパク質は、溶液中で集合して、本来の細胞の細胞壁の結晶構造にほぼ相当する単分子格子群（Ｓ層）を作る能力を示す。通常、ｐＨ値を低下又は上昇させることによって、カオトロピック（chaotroper）剤の濃縮溶液中でＳ層を完全に分離させることができる。Ｓ層タンパク質の再構成（「再結晶」）の際、Ｓ層タンパク質固有の特性、及びｐＨ値、イオン強度、溶液中のイオン組成などのＳ層形成条件に応じて、平らな層、円柱などの管状構造、及び密閉構造（小胞）が、いわゆる自己集合生成物を形成し、単層のほか、多層Ｓ層も形成する。Ｓ層構造の形成についての情報はすべて各単量体に含まれているので、Ｓ層の形成は自己集合によって生じる。Ｓ層は、境界層上、例えば空気／水の境界上、脂質膜上、シリコンウェハ、電極、又は合成ポリマーなどの固体基体面上に好ましくは形成される。Ｓ層タンパク質には、電荷分布、疎水性、境界層の成分間での特定の相互作用など特定の表面特性があるので、境界層への付着及びＳ層結晶格子への組み込みを行うと、Ｓ層（単量体、オリゴマー、又は小さい晶子）に所定配向が生じる。
【０００５】
Ｓ層は高度に多孔質の膜であって、Ｓ層結晶格子の一部をなす孔は、約２～６ｎｍの範囲内で均一のサイズと形を有し、多孔率は領域の７０％までを占めるまでになる。さまざまな分子を固定するためにＳ層結晶格子を使用することが公知であるが、これは、Ｓ層タンパク質ユニットの面上に配置される官能基の厚みが大きく、官能基の位置及び配向が規定されているためである。Ｓ層サブユニット間に共有結合を生じさせて、安定性を改善するために、同一の二反応基を架橋するさまざまな長さのアミノ基特異架橋結合剤（例えばグルタルアルデヒド）によってＳ層結晶格子を架橋結合する。Ｓ層タンパク質の活性化末端基の上に酵素を多く固定すると、Ｓ層結晶格子の外側面に分子を強固に結合した単層が形成される。Ｓ層タンパク質の極めて特徴的な形態的性質及び生物物理学的性質、特に、官能基、及び同等のサイズ及び形態の孔によって定義される空間構成を表面に有する単分子の結晶格子に自身を組織化する能力は、バイオテクノロジー、ナノテクノロジー、及びバイオメトリクスにおいて幅広く応用することができる。
【０００６】
Ｓ層に関するさらなる詳細については、「超分子ポリマー（Supramolecular Polymers）」の５章、ニューヨーク、ア・シッフェリ・マルセル・デッカー株式会社（A Ciferri Marcel Dekker Inc.）編集、２０００年（ＩＳＢＮ０－８２４７－０２５２－２）のＵ．Ｂ．スレイトル（Sleytr）らの論文「細菌細胞表面の結晶構造層（Ｓ層）：多用途の自己

集合システム（Crystalline Bacterial Cell Surface Layers (S-Layers): A Versatile Self-assembly System）」を参照するとよい。

【０００７】

Ｓ層をセンサシステムの形成に使用することが、Ａ．ノイバウエル（Neubauer）氏らのセンサ及びアクチュエータ（Sensors and Actuators）Ｂ４０（１９９７年）Ｐ２３１～２３６に記載されている。この論文は、いわゆるＰＬＤ法（「パルスレーザ堆積法」、高真空下でパルスレーザを用いて堆積すること）を用いてＳ層上に金の層を堆積することについて扱ったものであり、ここではグルコースオキシダーゼなどの酵素をあらかじめＳ層に固定しておく。また、金属層をＳ層上に堆積する別の方法もあり、特にＤ．パム（Pum）氏ら著の論文、Ber. Bunsenges. Phys. Chem. １０１（１９９７年）１６８６～１６８９、及びＡ．ノイバウエル氏らのＰＴＢレポートＰ－３４（１９９８年）ｐｐ．７５～８１に記載されている。

【０００８】

後者の論文では、Ｓ層上での金属層（例えば金）の電気化学堆積についても議論している。これは、堆積された金属層が、その下に位置するＳ層の構造には該当しない顆粒状組織を有するので、満足するほどの成功は得られていない。

【０００９】

Ｓ層タンパク質を含む溶液からＳ層を堆積させる場合、Ｓ層の単量体ユニットを基体表面に直接堆積する。この単量体は、最初は表面上で組織化されていない状態にあり、堆積プロセス中で初めて結晶構造の形成が生じる。この形成は結晶化核から一般的な方法によって始まる。特に、基体表面上のＳ層タンパク質の濃度が、まだあまり高くない場合、各ユニットは表面上で動き回ることができ、その移動度は、とりわけ表面のタイプに依存する。十分な量のＳ層ユニットが基体表面に堆積すると、自然に規則的な構造へ遷移し、これが頻繁に生じる。結晶化Ｓ層を形成した後でも、溶解Ｓ層タンパク質を溶液から沈殿させて、Ｓ層結晶格子に付着させることができる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１０】

公知の堆積方法にもあるように、溶液中のＳ層単量体ユニットからＳ層及びさまざまなサイズのＳ層自己集合生成物が構成され、溶液又は懸濁液に残されたままになるか、基体上に堆積する。このため、この作用は、基体上へのＳ層単量体ユニットの直接堆積と競争を始める。このことから、Ｓ層の生成工程の制御は、特に単層を確実に堆積させる場合困難であることがわかる。さらに、Ｓ層単量体ユニット堆積のプロセスは、結果的に２層及び多層の結晶を形成することになる。第２の（露出された）Ｓ層の大部分が（基体表面に結合された）第１のＳ層に対して鏡像として結合されるので、用途に必要とされる機能をもったＳ層領域を覆ってしまう。このため、このプロセスはさまざまな用途には極めて破壊的な影響を及ぼす。

【００１１】

さらに、公知の方法では、生成されたＳ層構造の長い軌道状配列に対し改良を必要としている。特に、前述の方法によって生成される結晶構造では、Ｓ層構造は、上記のような構造のために膨張性がかなり小さい領域を多数必然的に含んでしまう。大きな面積の領域を得るためには、Ｓ層の結晶構造の形成が始まる場所となる領域の数又は核の数を制限することが望ましい。

【００１２】

欧州公開特許第４６３８５９Ａ２号公報では、バイオセンサ電極上で生体分子種（例えばグルコースオキシダーゼのようなタンパク質）の堆積について記載している。この明細書では、まず同じ電荷符号を有する生体分子種を含む溶液を用意し、バイオセンサ電極と対極との間に定電流を印加する。その結果、生体分子は両電極間を移動し、バイオセンサ電極上に集合して膜になる。この公知文献は、堆積する生体分子の結晶状配列に対してなんら考慮しなくてもよい定電流法に基づくものである。また、堆積する層は、約１μｍ以

上と比較的厚いが、（結晶性）単層がひとつ又はいくつか生成される実際のＳ層では、これとは異なり、その厚みはそれぞれ４～１５ｎｍである。

【００１３】

上記課題を鑑み、本発明の目的は、公知の方法を改善した方法によってＳ層の形成及びＳ層結晶構造の形成を制御可能にすることである。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

本発明の課題は、機能分子の担体を提供するため基体表面にＳ層タンパク質の層を生成する方法であって、基体表面を提供するステップと、Ｓ層タンパク質を含む第１の溶液を提供するステップと、第１の溶液を基体表面に接触させ、かつ、第１の溶液中に比較電極を提供するステップと、第１の溶液と接触している基体表面上の第１の電気化学的条件が第１の溶液中の比較電極に対して基体表面に第１の電気化学ポテンシャルを付加することによって提供され、第１の電気化学的条件において基体表面にＳ層タンパク質を層状に堆積させるステップと、基体表面上の第２の電気化学的条件が比較電極に対して基体表面に第２の電気化学ポテンシャルを付加することによって提供され、第２の電気化学的条件において基体表面に堆積したＳ層タンパク質の層中に二次元結晶構造を形成するステップとを備えるＳ層タンパク質の層を生成する方法により解決できる。

【００１５】

本発明によれば、基体表面上へのＳ層形成は、溶液－基体系の電気化学的操作によって制御される。電位の設定は、定電圧で都合のよい方法で行う。電極を流れる電流は、本明細書中では第２に重要なことである。電気化学パラメータの経時変化によって、及び／又は電気化学方法を用いて溶液中及びに基体表面上で異なる条件を設定することによって、Ｓ層形成の制御を改善することができ、また、Ｓ層形成の所望のプロセス経路を選ぶことができるので、例えば、Ｓ層単層群、又は所望の数あるいは連続したＳ層を備えた層群の生成が容易になることは明らかである。さらに、基体表面の被膜が迅速にできるようになり、特に固定基体上に単分子の結晶性Ｓ層を形成することができるようになり、Ｓ層タンパク質を正しく配向させて堆積することができるようになる。

【００１６】

本発明の電気化学的手段は、帯電、及び基体表面上の電気化学的二重層（いわゆるヘルムホルツ層、図１）の組成の制御を提供することに成功したものである。正確には、特に静電気的に結合したイオンで構成される外部ホルムヘルツ層、及び化学結合した荷電粒子によって形成される内部ホルムヘルツ層の外因性化学組成の制御を提供する。さらに、本発明は、電気化学的二重層の拡散部分、いわゆる拡散層（ヘルムホルツ層上にある）の制御により、吸着及び脱着の移行制御を可能にする。これらの層では、化学的条件が、溶液中の化学的条件とは異なり、基体表面に対して直接設定され、Ｓ層タンパク質の堆積及び／又は結晶化を行う目的で設定される。このため、10^5Ｖ／ｃｍの範囲の電界強度が、例えば基体表面の真上の層に直接生じるようにすることができる。このような電界強度は、溶液から基体表面へＳ層タンパク質を付着する際に重要な特徴を示す。

【００１７】

本発明の特に注目すべき効果は次のとおりである：

（１）Ｓ層堆積の前でも、改善された方法で基体の分子精製を行ったり、基体を一新したり、再生可能な方法によって基体を形成したりすることができる。これは、電気化学的方法を使用して現場で堆積をすることができるためである。

（２）表面領域において高濃度のＳ層サブユニット（単量体）、Ｓ層オリゴマー、又は結晶格子（例えば核生成種）を実現することができ、結晶構造の形成の前に濃度超過（表面超過）を実現することもできる。

（３）分子配向を改善する。例えば、Ｓ層サブユニット及び核生成種の外側及び内側に対する分子配向を改善する。

（４）Ｓ層サブユニット及び／又は基体表面の陽子化の実現可能性を制御する。これによって、基体表面への結合（固定）性を決定できる。

（５）結晶化を促進する物質、例えば一価又は二価のイオンを、溶液又は基体からＳ層の上へ共同吸着（物理的及び／又は化学的吸着）させることが実現できる。
（６）固定－促進のようなリアクタンドの共同吸着が実現できる。
（７）Ｓ層サブユニット又はＳ層結晶、又はＳ層核生成種の電気化学的保持（つまり構造安定化）及び／又は電気化学的変形を実現できる。
（８）品質管理が容易である。
（９）Ｓ層タンパク質の吸着及び再結晶を方法論的に個別の工程で実現できる。
（１０）基体精製、Ｓ層タンパク質の吸着、及び再結晶を個別の工程で、必要に応じて物理的に分離させた状態（例えば異なる溶液槽）で行うことができる連続処理を実現できる。

【００１８】
プレート、多孔体、又は分散相（懸濁）のような任意の形及び寸法をもった凝縮相は、本質的に基体として考えることができるものである。

【００１９】
結晶格子を形成するために、基体表面の電気化学的制御によって、結合Ｓ層サブユニットの結晶化に最適な条件を設定することができる。できるだけ妨害されない方法によって、特に広範囲な結晶性Ｓ層領域への側方拡散によって、結合Ｓ層サブユニットを再構築することができる条件が特に求められている。Ｓ層タンパク質の結晶格子の大部分では外側及び内側で正味の電荷が異なるので、帯電表面へのＳ層タンパク質の結合も厳密に規定された配向状態で生じる。このため、固体基体の表面電荷の設定を制御することによって、目的としている溶解Ｓ層タンパク質（及び核生成種、つまりＳ層結晶格子）の吸着を達成することができる。Ｓ層タンパク質の表面電荷もタンパク質溶液のｐＨ値に依存するので、吸着作用（吸着時のＳ層タンパク質の配向）、及び固体基体表面へのＳ層タンパク質の結合強度も、周囲条件の変化によって影響を受け、周囲条件の変化によって最適化することができる。さらに、電荷に依存するＳ層タンパク質の吸着及び結晶化も、構造化した表面（例えば半導体材料、プリント配線板、導電性高分子材料、複合材料）上で特定の堆積を実施するために使用することができる。

【００２０】
本発明は、さらに、堆積／結晶化のために必要な特定の条件を繰り返し対応させることによって、基体表面上に所定の連続物としてＳ層をいくつか形成することもできる。

【００２１】
本発明の好ましい別の成果は、溶液及び／又は基体の異なる電気化学的条件を用いて、Ｓ層タンパク質の堆積、及び堆積されたタンパク質層中の結晶構造の形成が、互いに時間的に異なって生じることである。この場合、Ｓ層サブユニットは、堆積と結晶化との間にある未組織状態で基体表面に存在し、基体表面上で面に沿って移動することができる。Ｓ層単量体／オリゴマーを吸着させるための最適な周囲条件がある一方、他方では表面に結合したタンパク質の結晶化させるための最適な周囲条件があり、両条件は一般に異なり、例えば該当するパラメータを連続的に取り換えれば、両方を時間系列中で設定することができる。

【００２２】
この場合、堆積と結晶化との間で行われる電気化学的条件の変更は、溶液に対して基体表面の電気化学ポテンシャルを変更することから成るようにすれば有利になる。さらに、堆積と結晶化との間で電気化学的条件を変更するために、溶液の少なくとも一つの化学のパラメータを変えることもできる。特に、イオン濃度又は溶解材料の濃度のほか、支持電解質の濃度又はイオン強度、ｐＨ値、酸素濃度、又は一般に電子伝達反応の電位も、化学パラメータとして考慮にいれる。さらに、そのプロセスも、溶液の他のイオンの濃度によって、又は温度によって影響を受ける場合もある。同様に、上記のパラメータの代わりに、又は上記のパラメータと組み合わせて、基体の電気化学パラメータの少なくとも一つのパラメータ、例えばその電荷、イオン（例えば水酸化物イオン）の範囲、又は化学的変化（粗さなどメゾスコピックレベル及び／又は原子レベルの寸法形態）を堆積と結晶化との

間で変更して、電気化学的条件を変更することもできる。

【００２３】

基体表面の電極及び対向電極のほかに比較電極を設け、これを使用することによって電流の流れない有利な方法で溶液の電位を測定することができる。主に溶液の電位差を測定することになっている電極の表面から短い距離の間に比較電極を配置すると都合がよく、次にポテンシオスタットの電流制御によって対向電極の電位差を間接的に生成する。その結果、基体表面の電極上の実際の電圧と設定電圧とが互いに一致する。

【００２４】

本発明の別の効果的な変形によれば、Ｓ層タンパク質の正味の電荷をこのタンパク質に静電気的に印加する。例えば、タンパク質吸着の後に基体の表面電荷を変更することによって、最適条件を設定することができる。さらに、表面に電圧を印加することによって、結晶性Ｓ層の形成後にＳ層結晶格子の表面上、又は孔中に追加の帯電分子又は金属クラスターを結合又は堆積させることもできる。

【００２５】

さらに、Ｓ層タンパク質の堆積中及び／又は結晶構造の形成中に、タンパク質の立体配座の変化が生じると、特に変性又は再生が生じると有益である。これも、Ｓ層の形成の制御を促進するものである。

【００２６】

経時的に変化する電気化学ポテンシャル、例えばパルス型又は傾斜型曲線で表される変化によって、Ｓ層タンパク質の堆積及び／又は結晶構造の形成を制御することができる。

【００２７】

タンパク質の吸着及び結晶化は、それらのプロセス工程に対して設定できる特定の条件下で、異なる処理槽又は異なる処理槽区画でも行われうる。ここでは、例えば溶解物質に関して区別しうる異なる溶液が処理槽に入っているが、リード化合物及び／又は溶媒は同じに保たれている。またこのことは、第１の溶液を空にし、第２の溶液を満たすなど、使用する溶液を連続的に又は不連続的に変更することによって、ひとつの槽中で行うことができる。このようにすると、基体上のＳ層タンパク質の堆積は第１の溶液中で行われ、結晶構造の形成は第２の溶液中で行われる。このような場合、第１の溶液に浸漬する前に正味の電荷を静電気的に又は電気泳動的に基体に印加し、溶液を変更するときはこの電荷を維持することが有利である。さらに、堆積を行うための第１の溶液槽から結晶化（いわゆる浸漬）のための第２の槽に基体表面を移送することによって溶液を変更することができる。これはバッチ法に相当する。この変形として、この移送を連続移送プロセスで行うことができる。例えば、コンベヤベルト方式でベルト状又は糸状基体を異なる槽を通過させながら連続的に送り、同じ基体の異なる部分がそれぞれ同時に異なる槽内に位置するようにすることができる。

【００２８】

例えば、Ｓ層タンパク質堆積の前でもＳ層タンパク質に機能分子を結合することによって、さらにＳ層タンパク質の堆積と同時に機能分子を堆積させることによってＳ層上に機能分子を固定することができる。このような場合、機能分子がＳ層タンパク質の一方の面に、例えば細胞壁の内側に相当する側に独占的に又は少なくとも大部分が結合されると好都合である。また、堆積に関しては、Ｓ層タンパク質が結果として双極子モーメントを有するような電気化学的条件が選択されると好都合である。このとき、電位差の結果として生じる電場中での基体表面近くの双極子モーメントの配向によって、上記のＳ層タンパク質の面が基体表面からみて反対を向くことになる。

【００２９】

あるいは、これと組み合わせて、Ｓ層の層中で結晶構造が形成された後に、結晶構造によって規定された位置の基体上に機能分子を堆積することによって固定をすることができる。

【００３０】

特に、酵素、ウィルスタンパク質、又は他のタンパク質機能を機能分子として使用する

ことができる。再結合した融合タンパク質として、一つ以上の機能ユニットを有するＳ層タンパク質によっても機能ユニットを実現することができる。

【００３１】

さらに、Ｓ層の層中で結晶構造が形成された後に、結晶構造によって規定された位置の基体上にナノ粒子を堆積するか、沈殿させることができる。これには、第２の相の堆積用テンプレートとしてＳ層を使用することも含まれている。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３２】

以下、いくつかの典型的な実施の形態を用いて、添付図面を参照しながら本発明を詳細に説明するが、これは本発明の範囲を制限するものではない。

【００３３】

実施例では、以下に記載の方法論について扱う。この方法論では、本発明によって、単量体、オリゴマー、又は晶子を使用して、タンパク質（Ｓ層タンパク質）を含む細胞表面層から電気伝導性の基体表面上に電気化学的に機能分子の層を沈殿させ、２次元結晶化させ、最終的に電気化学的に定着させる。Ｓ層ユニットの（１）吸着、（２）配向、（３）表面拡散、（４）結晶化、及び（５）定着が電気化学的に制御されたプロセスで進むような方式による処理プロセスに対して、電荷の導電及び／又は蓄積ができる基体材料の条件を決める。

【００３４】

基体材料の定電圧電気化学的制御を用いて、上記プロセスに明らかな影響を及ぼす電気化学的表面を基本的に三つのタイプに設定することができる。第１のタイプは、負の表面電荷が存在することを特徴とし、第２のタイプは正である正味の電荷が設定されていることを特徴とする。第３のタイプは、さらに多くの陽電位が生成され、表面が電気化学的に変換され、これによって、水酸化表面又は酸化表面を介して、又は他の特定の吸着されたイオン種類を介して基体のみが吸着物と相互作用し続けることを特徴とする。最初の二つのタイプでは、吸着物との相互作用は、主に静電気力によって決まり、二次的には化学的な力（例えばファンデルワールス力）のみによって決まる。対照的に第３のタイプでは、化学的な相互作用（例えば水素架橋結合）及び非静電気的な相互作用が優勢である。

【実施例１】

【００３５】

成熟タンパク質としての層タンパク質ＳｂｓＢ－例えばこれが再結合によって生成された形の場合ｒＳｂｓＢｇ２-９２０として表す－が有する理論上の等電点（ｐＩ）は４.９５である。三つのいわゆるＳ層相同構造（ＳＬＨ構造）を含むＮ末端領域（アミノ酸３２-２０７）は、８.９４のｐＩを有し、残りの配列（アミノ酸２０８-９２０）について計算すると、ｐＩは４.７３であった（表１を参照）。再結合によって生成されたＮ末端基の短いＳｂｓＢ形は、ＳＬＨ構造が最大三つ欠損しており、これを用いた実験から、Ｎ末端基が自己集合作用に関係しないことがわかった。

【００３６】

【表１】

Ｓ層タンパク質の形態	SbsB	SbpA	SbsC
GBAN	X98095	AF 211170	AF 055578
成熟タンパク質	pI 4.95 アミノ酸 32-920	pI 4.60 アミノ酸 31-1268	pI 5.40 アミノ酸 31-1099
Ｎ－末端基	pI 8.94 アミノ酸 32-207	pI 4.49 アミノ酸 31-202	pI 9.13 アミノ酸 31-270
残りの配列	pI 4.73 アミノ酸 208-920	pI 4.63 アミノ酸 203-1268	pI 4.88 アミノ酸 271-1099

表１：成熟Ｓ層タンパク質、Ｎ－末端基および残りの配列の理論上の等電点（pI）
GBAN の行は GenBank アクセス番号を示す。

【００３７】

可溶性Ｓ層タンパク質（固体表面上で結晶化させるためのＳ層単量体又はオリゴマー）

を生成するために、１ｍｌの５Ｍグアニジン塩酸塩（ＧＨＣｌ）を５０ｍＭのＴＲＩＳ－ＨＣＬ緩衝液（ｐＨ７．２）に溶かしたものに、ｒＳｂｓＢアミノ酸３２-９２０のＳ層自己集合生成物（サイズ０．１～５μｍの単分子Ｓ層タンパク質結晶）０．２ｍｇを溶解し、精製水を使用し、４℃で２４時間透析した。Ｓ層タンパク質が低濃度であるため、透析のあいだ、自己集合生成物の形成は避けられたが、透析終了後、一応４℃で２０分間、４０，０００ｇの遠心分離にかけて、明らかに残った残留物を除いた。溶液のｐＨ値は、０．０１ＮのＮａＯＨを用いて６．５に調整し、この溶液４００μｌを結晶化に使用した。

【００３８】

まず、Ｓ層タンパク質のない電解液中で洗浄工程を行った。このとき、ｐＨ値を保ちながら、極値間の電極電位サイクルを繰り返す（例えば飽和硫酸水銀電極では－１．２Ｖから＋０．８Ｖまでの電位サイクルを金に対して繰り返す）ことによって、基体の表面の原子を完全に交換し、これによって汚染された層をすべてなくした。

【００３９】

これに続くＳ層吸着では、電気伝導性材料を固体基体として使用することができる。この基体として考えられるのは、特に金のような金属、シリコンのような半導体、導電性高分子材料、又は黒鉛のような他の材料がある。

【００４０】

吸着したＳ層サブユニットの配向は、固体基体の正味の電荷を設定することによって制御することができる。第１の例では、固定された基体の表面（５ｍｍ^2）が負の正味電荷を有するように、この表面の条件を決める。このような条件下では、Ｎ末端基を含みｐＨ値６．５で正に帯電する内側によってＳ層サブユニット（単量体）が単層として結合する。第２の例では、固体基体の表面が正の正味の電荷を有するように、この表面の条件を決め、ｐＨ値６．５で負に帯電する外側によってＳ層サブユニットが結合する。

【００４１】

Ｓ層サブユニットの吸着後、Ｓ層タンパク質溶液を除去し、精製水で数回洗浄した。結晶格子の形成を行うために、二価の陽イオンの溶液を精製水に加え（例えば５ｍＭの$CaCl_2$）、２０℃でインキュベートした。Ｎ末端基部分（ｐＩ８．９４）は自己集合プロセスに関係しないので、二価の陽イオンを追加して負電荷を中和することは主にアミノ酸２０８-９２０の範囲内で重要である。基体表面上の結晶性Ｓ層状構造の確認は、ＡＦＭスキャナ顕微鏡（「原子間力顕微鏡」）で行った。約１～１０μｍのサイズを有する単結晶の範囲を検知することができたが、相互に異なる配向を示した。

【００４２】

対照的に、吸着については、酸化物形成された第３のタイプに電位が移動すると、これに続き、完全に変更された基体表面が、すでに形成された結晶化Ｓ層に他の化学結合（例えば非静電気相互作用）を縦方向に受け容れることができる。

【実施例２】

【００４３】

この実験では、再結合して生成されるｒＳｂｓＢ－ストレプトアビジン・タンパク質を生成した。Ｓ層タンパク質のＣ末端側に機能的領域（ストレプトアビジン）を結合させる。ＳｂｓＢのアミノ酸２０８-９２０の間にあり、ヘテロ四量体ストレプトアビジンを含む配列のｐＩは５．６０である。Ｃ末端ＳｂｓＢ－ストレプトアビジン融合タンパク質は水溶性で、あらかじめ調整しておいた表面（例えば、Ａｌγ－ヘモ－タイプのペプチドグリカン、及び組織としては典型的な二次細胞壁重合体を含むバシラス・ステアロサーモフィラス（Bacillus stearothermophilus）ＰＶ７２／ｐ２の細胞壁球形嚢）にのみ斜格子のＳ層を形成する。

【００４４】

再結晶をするために、５００μｌ精製水に融合タンパク質２００μｇを含む溶液を、負に帯電した５ｍｍ^{2}サイズの固体表面に接触させた。この場合、融合タンパク質の結合が、ｐＨ値６．０で正に帯電したＮ末端領域上に生じた。Ｓ層結晶格子を安定化させるために、１－エチル－３，３’－ジメチルアミノプロピル－カルボジイミド（ＥＤＣ）を含む

溶液５００μｌを、ゼロレングス架橋剤（精製水１ｍｌ当たり１ｍｇＥＤＣ、溶液のｐＨ値は０．０１ＭのＨＣｌで４．７５に調整）として加え、２０℃で６０分間インキュベートした。ＥＤＣは、隣接するＳ層サブユニットの場合のようにアミノ基及びカルボキシル基が直接静電的相互作用している場所で架橋のみを行う。インキュベーションの後、基体を精製水で数回洗浄した。次に、Ｓ層結晶格子の構造をＡＦＭ顕微鏡で評価した。斜格子のＳ層をはっきりと見ることができた。異なる配向をした領域では、約１～１０μｍのサイズを有していた。

【００４５】

成熟Ｓ層タンパク質ＳｂｐＡ（アミノ酸３１-１２６８；ｐＩ４．６０；表１を参照）は、正方形の格子に結晶化する。成熟Ｓ層タンパク質のＮ末端部分（アミノ酸３１-２０２）は、三つのＳＬＨ構造及び二次細胞壁重合体の結合領域を含み、ｐＩが４．４９である。残りの配列（アミノ酸２０３-１２６８）のｐＩは４．６８である。Ｎ末端部分は自己集合作用に関係しない。

【００４６】

正方形格子の自己集合生成物の形成には二価の陽イオンが必要である。精製水１ｍｌ当たりｒＳｂｐＡを２００μｇ含みｐＨ値６．０である溶液を、サイズ５mm^2の正に帯電した基体表面に塗布し、２時間２０℃でインキュベートした。次に、超過のＳ層タンパク質溶液を洗い流した。この結晶格子を形成させるために、１０ｍＭのＣａＣｌ２溶液を基体表面に付け、２０℃で２時間インキュベートした。精製水で洗った後、基体をＡＦＭで評価した。サイズが約０．５μｍの正方形格子の領域を観察することができ、ニつの異なる構造化領域が約１：１の比率で存在した。このことから、Ｓ層サブユニットの外側（滑らかな曲面）も内側（荒い表面）も吸着できたことがわかる。この例によって、Ｓ層サブユニットが内側面及び外側面で異なる帯電領域を有する場合、帯電基体上にはＳ層サブユニットの均一に配向された堆積物のみが生じることが示される（実施例２及び実施例３を参照）。

【００４７】

ここでは、再結合して生成される融合タンパク質ｒＳｂｓＣ－Ｂｅｔ　ｖ１を固体表面上で結晶化することにした。ｒＳｂｓＣ－Ｂｅｔ　ｖ１では、カバノキ花粉の主要アレルゲンＢｅｔ　ｖ１の配列（１６１アミノ酸）が、架橋剤としてのニつのグリシン基を介し、アミノ酸３１-９２０を含みｐＩが６．０９である短いＳｂｓＣ形のＣ末端部に結合されている。成熟ＳｂｓＣ（アミノ酸３１-１０９９）は５．４０のｐＩを有する。Ｎ末端基領域（アミノ酸３１-２７０）のｐＩは９．１３であり、基の配列（アミノ酸２７１-１０９９）は４．８８である（表１を参照）。Ｎ－末端部は自己集合作用に関係する。

【００４８】

結晶化させるために、精製水１ｍｌ当たりｒＳｂｓＣ－Ｂｅｔ　ｖ１融合タンパク質を２５０μｇ溶かしたｐＨ値６．０の溶液を、正味の電荷が負である固体表面に付けた。このようにすると、正に帯電したＮ末端基によって融合タンパク質の吸着が生じた。このため、Ｃ末端部に付いたＢｅｔ　ｖ１配列は、外側に露出された状態になった。２０℃で２段階インキュベーションをした後、０．０１ＭのＨＣｌを加えてｐＨ値を６．０９に設定すると、その結果Ｃ末端Ｓ層タンパク質の負の正味の電荷が失われ、Ｓ層サブユニット同士は「接合した」。すなわち正味の電荷が損失したために、相互に接近し合うことになり、この作用によって、規則的な格子構造が形成された。

【実施例５】

【００４９】

この実施例では、ベルト材形状の基体に連続的にＳ層を形成する層形成について例示する。

【００５０】

このことは、例えば図２に示すように、装置Ｖ２で実施することができる。コーティング用ベルトＢＢは、例えばプラスチック基体材料で作られ、Ｓ層を堆積することになっている面に金属コーティングが施される。このベルトはローラＢＲから回転によって繰り出

され、適切な偏向ドラム又はローラＡＲによって案内され、処理槽Ｂ１，Ｂ２，Ｂ３，Ｂ４を通る。この場合、処理槽の数は一例として普通に挙げただけのもので、所望のプロセスに合わせることができ、したがって処理槽を増やしたり減らしたりすることができる。導電性ベルト材料は摺動接点Ｓ１，Ｓ２を介して公知の方法によって帯電するか、又は処理槽の列を通過させた後に再び放電する（接地する）。

【００５１】

ここに記載の本実施例では、各槽を以下のように充填する。

槽Ｂ１：箔を洗い浄化するための精製水

槽Ｂ２：Ｓ層タンパク質を箔に載せるためのＳ層タンパク質を含む溶液（精製水中ｒＳｂｓＣ；５０μｇ／ｍｌ、ｐＨ５．７）

槽Ｂ３：吸着されたＳ層タンパク質の結晶化用溶液（精製水による２０ｍＭのＣａＣｌ$_2$溶液）

槽Ｂ４：結晶層で化学架橋を起こして一層の安定化を図るための架橋剤溶液（０．２Ｍのカコジル酸Ｎａ緩衝液による０．５％のグルタルアルデヒド、ｐＨ７．０）

各槽中のベルトの滞留時間又は実行時間は２０～１２０分である。コーティング及び化学架橋のあとに、洗浄工程及び乾燥工程のような追加工程（不図示）を実施する。

【００５２】

槽系列Ｂ１～Ｂ４の代わりに、実施例１から４のいずれかに対応するような別の槽も使用可能なことは言うまでもない。

【００５３】

本実施例の変形として、重合体フィルムのような非導電性材料をコーティングすることができる。この場合、図２のような摺動接点によるベルト材料の帯電はしないが、静電気的な帯電は生じる。図３を参照する。帯電ドラム又はロッドＲ１に薄膜ＢＢ’を直接接触させて通過させるか、又は少し距離をあけて通過させることによって、静電気的に帯電させる。この目的のために、ロッドＲ１を、例えば１０００Ｖの高圧に設定すると都合がよい。このロッドＲ１は、摺動接点Ｓ１の代わりに図２の装置Ｖ２に搭載されることになる。

【実施例６】

【００５４】

本実施例では、例えばＢ．カステンリング（Kastenring）氏ら著、ジャーナル・オブ・エレクトロアナリティカル・ケミストリ（Ｊ．Electroanal．Chem.）、２６５（１９８９年）、ｐｐ．７７～１０１の電気化学懸濁セルに示される電気泳動法を使用するＳ層タンパク質の結晶化を扱う。図４に図示するカステンリングが記載した電気化学懸濁セルには、黒鉛で作られた円錐形の回転体ＦＤが設けられ、「供給チャンバ」として使用される第１のホッパーＣＣ内の右側に、構造化を受ける表面が位置する。電位差計ＰＳを使用して、対向電極ＸＣの電位Ｕｏと比較される一定の仕事電位Ｕｗで回転体ＦＤは維持され、さらに、セル系列の中に組み込まれる粒子への特定の電位を与えることになる「フィード電極」として使用される。

【００５５】

図５は、粒子上のＳ層結晶化のプロセスを示す。図５ａに示すように、フィード電極ＦＤの表面ＦＳ上では、懸濁液及びホッパーＣＣに存在してフィード電極ＦＤ上を流れる粒子ＮＰに電荷が移送される。ここに記載の本実施例では、上に示すように粒子ＣＰが電気泳動的な扱いを受け、フィード電極ＦＤから負電荷を受け取る。図５ｂに示す次の工程で、これら粒子表面上に位置する帯電領域及び電荷の分布によって決まる配向で、Ｓ層ユニットＳＵが粒子ＣＰ上に堆積する。このことは、本実施例の場合、正の正味の電荷を有するｒＳｂｓＢのＮ末端を介して生じる。なお、この末端基は、図５ではＳ層サブユニットの斜線を引いた先端部として示している。表面上では、さらにオリゴマーＳＭの形成も生じうる。Ｓ層の結晶化によって、結合Ｓ層ＳＬによって覆われる粒子ＥＰが得られる。このような粒子のコアＫＰ’として、Ａｕ、Ｐｔ又は他の金属から作られる金属粒子、黒鉛粒子又は活性炭素の形をした炭素、プラスチック被覆粒子、又は磁気粒子など、さまざま

な分散材料を使用することができる。

【００５６】

粒子を帯電させるために、図４の装置中で、ポンプＰＭを用いてメイン回路Ｋ１の中で溶液がフィード電極ＦＤ上を流れるようにする。ホッパーＣＣは、溶液の電位Ｕｒを電流フリーで測定するための比較電極ＲＤを有する。さらに、測定器ＭＣを通って導く第２の回路Ｋ２を設け、この測定器ＭＣ内では、測定電極ＭＤを使用して溶液中に懸濁されている粒子の電荷を測定することができる。この目的のために、例えば、仕事電位Ｕｗでの測定電極ＭＤと円筒電極ＣＤとの間の電圧を、定電圧源ＣＶによって生成し、（電圧Ｕｍとして測定された）電流から、公知の方法で粒子の電荷を測定することができる。吸入弁ＩＶ及び吐出弁ＯＶを介して利用する溶液及び添加剤を供給及び排出するために、測定器ＭＣを使用することもできる。

【００５７】

直径が１μｍのポリスチレン・ラテックス・ボール５ｇの緩衝液（０．１Ｍのクエン酸Ｎａ溶液、ｐＨ６．０）による懸濁液２５ｍｌを電気化学懸濁セルへ注いだ。ポリスチレン・ラテックス・ボールの代わりに、ラテックス被膜のないポリスチレンボールを使用することもできる。使用するボール材料はともにインディアナ州（米国）のバンクス・ラボ（Banks Lab.）の製品である。フィード電極ＦＤの電位は、ボールが負の表面電荷、例えば飽和硫酸水銀電極ＸＣに対して－１Ｖを帯びるような方法で設定される。２０分間供給した後、Ｓ層タンパク質溶液（ｒＳｂｓＢ；精製水１ｍｌ当たり０．２５ｍｇ、ｐＨ値６．０）２５ｍｌを、例えば容器ＭＣの中に、又は分岐した回路Ｋ２によって注入する。ｐＨ値６．０であって内側に位置する正に帯電したＮ末端部分によってＳ層タンパク質を所望どおりに吸着させるために、懸濁液を２０℃で２時間循環させる。この循環は、ホッパーＣＣの供給ライン中のバルブ（不図示）によって回路Ｋ１を閉じ、分岐回路Ｋ２の循環によって生じるようにすると好都合である。この結果、フィード電極ＦＤ上へのＳ層タンパク質の堆積が防げられる。次に、懸濁液をセルから出して、２０℃で４０，０００グラム、２０分間遠心分離にかけ、明らかに残った超過残留物を捨てた。また、遠心分離によって残った流出液、いわゆるペレットを、１０ｍＭのＣａＣｌ$_2$溶液２０ｍｌに懸濁させる。次にこの懸濁液を２０℃で４時間軽く攪拌する。二価の陽イオンの存在下、最初に吸着したＳ層タンパク質が再構成され、結合した結晶性Ｓ層タンパク質格子になる。次に、懸濁液を再び遠心分離にかけ、１０ｍＭのＣａＣｌ$_2$溶液２０ｍｌで洗う。このように生成したペレットでは、Ｓ層に固定された機能物質（例えば抗体のようなレセプタ）を、高濃度の懸濁液として手に入れることができる。

【００５８】

顕微鏡で評価するために、１～２μｌのペレットをフレオン２２で凍結し（液体窒素で冷却し）、フリーズエッチングを施した。結晶格子の形成を評価するために、この調整物を透過型電子顕微鏡で観察した。斜格子に構成されたＳ層タンパク質によって完全に覆われたパーティクルがみられた。

【図面の簡単な説明】

【００５９】

【図１】電気化学二重層の構造を示す図である（グイ（Gouy）氏、チャップマン（Chapman）氏、及びスタン（Stern）氏による）。

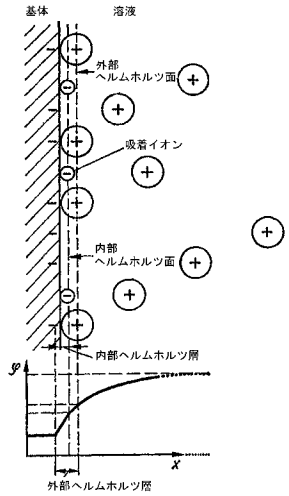
【図２】ベルト基体用の連続塗布プロセスを行うための装置を示す。

【図３】図２のベルト基体を帯電させるための構成配置を示す。

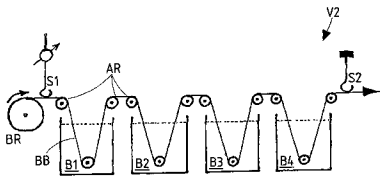
【図４】Ｂ．カステニング（Kastening）氏らによる電気化学懸濁セルに基づいたＳ層定電圧堆積装置を示す。

【図５】定電圧で誘導した堆積の動作を示す。

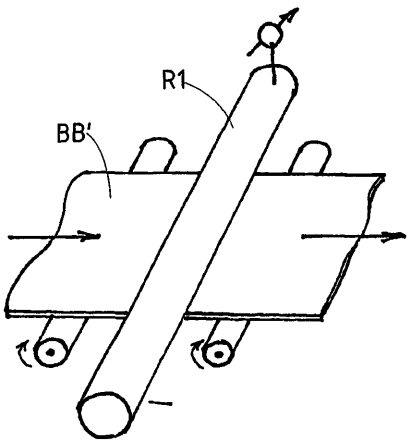
【図１】


基体
溶液
外部
ヘルムホルツ面
吸着イオン
内部
ヘルムホルツ面
内部ヘルムホルツ層
φ
x
外部ヘルムホルツ層

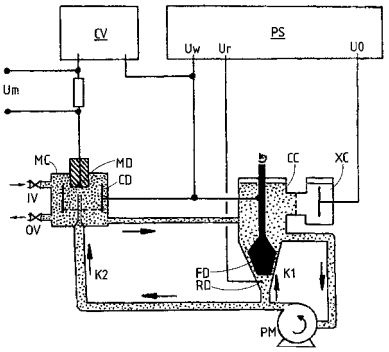
【図２】


V2
S1
AR
S2
BR
BB
B1
B2
B3
B4

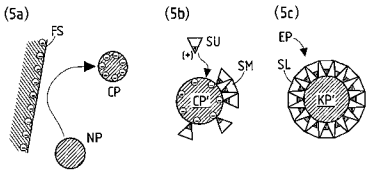
【図３】


R1
BB'

【図４】


CV
PS
Uw
Ur
U0
Um
MC
MD
CD
CC
XC
IV
OV
K2
FD
RD
K1
PM

【図５】


(5a)
FS
CP
NP
(5b)
SU
(+)
SM
CP'
(5c)
EP
SL
KP'

フロントページの続き

(72)発明者　サラ・マルギット
オーストリア国　２２３０ゲンザーンドルフ　ヴァツェクガッセ８４
(72)発明者　カウテック・ヴォルフガング
オーストリア国　１１９０ウイン　ゲブハードッガッセ４

審査官　清水　晋治

(56)参考文献　相澤益男，生体分子系ネットワークの界面構築，界面シンポジウム前刷集，１９９５年１１月，Ｖｏｌ．２，ｐ．４５－５１
Nature. 1997, Vol.389, No.6651, p.585-587
The Journal of biological chemistry. 2000, Vol.275, No.48, p.37876-37886

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 27/00-27/92
C12N 11/00-11/18
C07K 14/00-19/00
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)