

芯鞘型エレクトロスピンニング法によるナノファイバー表面へのタンパク質揭示

(福井大院工) ○藤田 聡、森山幸祐、長沼千尋、末 信一郎

【緒言】タンパク質リガンドを用いたアフィニティクロマトグラフィーでは、タンパク質を表面に固定化した多孔体やマイクロビーズ、膜等が担体材料として使用されてきた。昨今、より比表面積の高い材料としてナノファイバー不織布が着目されている。従来の多孔質担体に比べ、高い空隙率を有しているため、反応液を高流速かつ大容量で流すことが可能となり、高効率な分離につながると期待される。ナノファイバー不織布表面へのタンパク質の固定化については、従来、通常の繊維材料の後処理と同じく、多ステップから成る表面処理が適用されてきたが、煩雑かつ時間がかかるうえ、厚みのある繊維材料内部まで処理が施しにくいという課題があった。こうした課題を克服でき簡便かつ均一に、生理活性も損なわず、タンパク質をナノファイバー表面に固定化する手法が強く望まれている。ここで本研究では、芯鞘型エレクトロスピンニング法を用いて、ナノファイバー作製と繊維表面へのタンパク質の固定化を同時にワンステップでおこなう手法を検討した。この手法では、同軸構造を有するノズルより芯と鞘それぞれ独立して別のポリマー溶液を射出することで、芯鞘ナノファイバーを形成させることができる。これを利用し、芯材となるポリマーには紡糸性が良く水に不溶な酢酸セルロース(CA)を用い、鞘材にはポリビニルアルコール(PVA)を用いた。鞘材に用いる PVA 溶液にはあらかじめタンパク質と架橋剤を混合しておいた。またタンパク質としては、抗体精製用のアフィニティクロマトグラフィーへの応用を念頭に、抗体 IgG と高い親和性を有する Protein A (PA)を用いた。これにより、芯材の表面が PA を含む鞘材で覆われた芯鞘ナノファイバーを紡糸することができると期待される。本報告では、ナノファイバー不織布の作成と抗体吸着能について評価した結果について述べる。

【実験】<芯鞘ナノファイバーの紡糸>同軸スピナレットを用いたエレクトロスピンニング法によって作成した。鞘層には、*N,N*-ジメチルアセトアミド(DMAc)/アセトン(2:1)を溶媒とした 25% CA (Mw 100,000) 溶液を用いた。芯層には、ジメチルスルホキシド(DMSO)を溶媒とした 15% PVA 溶液に 0.1% PA および 0.05% 1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)を添加した溶液を用いた。鞘流量 1.5 ml/h、芯流量 0.5 ml/h で射出した溶液に電界 2.5 kV/cm を印加し、回転式コレクタ (線速度 9 m/s) 上に繊維を回収した。<ファイバーのキャラクタライゼーション>得られたナノファイバーの形態評価は光学顕微鏡、SEM および TEM により行った。タンパク質の表面揭示は、免疫染色および ATR-FTIR により評価した。<タンパク質揭示の定量>得られたナノファイバーに対し、抗体吸着能を ELISA 法により定量的に評価した。アガロースビーズに PA を化学架橋で固定化した担体との比較も行った。

【結果と考察】作製した芯鞘ファイバーの SEM 像および蛍光標識 IgG を吸着させた際の蛍光顕微鏡像を Fig. 1 に示す。これによりファイバー表面に均一に PA が揭示されていることが示された。作製したタンパク質揭示ファイバーの抗体吸着能を ELISA 法で評価したところ、ビーズ担体よりも高い抗体吸着能を示した。さらにタンパク質の脱離と吸着を繰り返すことで再利用性についても示した。

以上より、芯鞘エレクトロスピンニング法を用いてワンステップでタンパク質を効率的に表面に揭示する手法が開発できた。本手法を、メンブレンクロマトグラフィー等の分離用担体として利用するナノファイバー不織布の作成方法に利用するために、タンパク質固定化量の改善およびタンパク質の安定性に関するさらなる評価をすすめていく。

謝辞：本研究の一部は A-STEP (JST)により実施された。

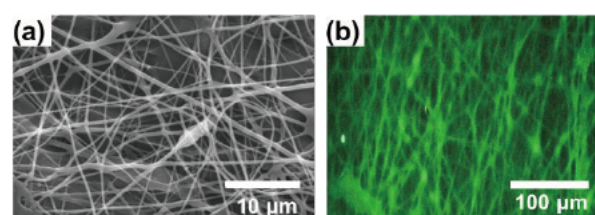


Fig. 1 (a) SEM and (b) fluorescent images of electrospun fibers.

Display of protein on nanofiber surface by using core-shell electrospinning.

Satoshi FUJITA, Kosuke MORIYAMA, Chihiro NAGANUMA and Shin-ichiro SUYE: Graduate School of Engineering, Dept. of Frontier Fiber Technology and Science, University of Fukui, 3-9-1 Bunkyo, Fukui 910-8507, Japan, Tel: 0776-27-9969, Fax: 0776-27-8747, E-mail: fujitas@u-fukui.ac.jp