

ペルオキシダーゼ内封リボソームのキャラクタリゼーションと
免疫測定法の標識物質への応用に関する研究

学位論文内容の要旨

リボソームはリン脂質二分子膜から成る閉鎖小胞であり、その内水相に多くの分子を内封できることから、近年、機能性分子集合体として注目されている。計測化学の分野においても、生体物質をより高感度に測定するため、リボソームの応用が注目されている。これまで、生体物質を高感度に測定するため、蛍光分子や酵素を測定対象物質に標識化することが試みられてきた。しかしながら、測定対象物質に直接的に標識化できる分子の数は数分子であった。一方、リボソームはその内水相に多くの分子を内封できることから、蛍光物質あるいは酵素を内封したリボソームを標識物質に応用することが試みられている。しかしながら、これまで標識物質として広く利用されているペルオキシダーゼをリボソームに内封する試みはなされていない。

このような観点から本論文では、ペルオキシダーゼを内封したリボソームを標識物質とする新規な計測法の確立を目的とし、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)内封リボソームのキャラクタリゼーションならびに免疫測定法によるIgGの検出法における標識物質への応用を試みた。

本論文はそれらの経緯をまとめたもので、全7章から構成されている。各章の概要は以下の通りである。

第1章は序論であり、本研究の背景と目的について述べている。

第2章では、リボソームの構成成分であるリン脂質の自動分析法について検討している。リボソームの物性はリン脂質の含量により変化するため、リボソームの調製時にリン脂質の定量が必要になる。しかしながら、従来の吸光光度法によるリン脂質の定量は分析操作が煩雑なことから、ICP発光分析法によるリン脂質の自動分析法の開発を試みている。その結果、ICP発光分析法は従来法に比べ、より広い濃度範囲のリン脂質を迅速に自動分析できることを見出している。

第3章では、押し出し法によりHRPを内封した1枚膜リボソームを調製

し、ゲルクロマトグラフィーによるHRP内封リボソームの分離・精製法を検討している。HRP内封リボソームを分離後、リボソームの粒径分布、HRPの保持効率および内封されたHRPの分子数についてキャラクターゼーションを行なっている。その結果、リボソーム当たり内封されるHRPの分子数が約4300であることを見出している。リボソームの膜表面にHRPを直接結合する場合には、100~200分子のHRPを結合することができる。したがって、HRPをリボソームに内封することにより、HRPの保持量が著しく増大することを明らかにしている。

第4章では、リボソームに内封したHRPの活性測定法としてルミノール化学発光法の応用を検討している。リボソームに界面活性剤を加えてリボソーム膜を開封し、リボソームから溶出したHRPの活性をルミノール化学発光法により測定した。その結果、同一濃度のHRPについて、リボソームへの封入、未封入によらず、単位時間当たりの発光速度は等しいことから、HRP内封リボソーム調製前後におけるHRPの活性は変化しないことを見出している。また、リン脂質および界面活性剤共存下におけるルミノール化学発光によるHRPの測定法の最適化を行なっている。

第5章では、HRP内封リボソームを標識物質に利用する免疫測定法の確立を目的とし、抗体へのリボソームの結合方法ならびに測定方法の最適化について検討している。最初に、パルミトイル化抗体担持リボソームを調製し、HRPを抗体に直接的に結合した場合との抗体当たりの発光強度を比較している。パルミトイル化抗体担持リボソームを標識物質に用いると、HRPを抗体に直接的に結合した場合より、発光強度が125倍増大するを見出している。つぎに、ビオチン結合HRP内封リボソームの調製を行い、アビジン-ビオチン結合を利用してリボソーム表面に抗体を結合させ、イムノドットプロット法によるウサギIgGの検出を行った。その結果、IgG当たりの発光強度はHRPをビオチン結合により直接的に抗体に結合した場合の発光強度と比較して約20倍増大するを見出している。

第6章では、リボソーム内にHRPを安定に存在させる因子を解明するため、HRPの漏出量に影響する因子について検討している。HRP内封リボソームからのHRPの漏出量の経時変化を化学発光法を用いて検討した結果、コレステロールおよび酸性リン脂質の含量を増加させることによりHRPがリボソームにより安定に保存できることを見出している。さらに、蛍光物質であるピレンをリボソーム膜内の疎水部に導入し、蛍光スペクトルの変化から、リボソーム膜の膜流動性を検討した結果、コレステロールおよびビオチン結合脂質が膜の流動性を抑える働きを持つことを見出し、それらの含量を増加することにより、HRPがより安定にリボソーム内に保存できることを明らかにしている。

第7章では、以上の結果を総括している。

学位論文審査の要旨

主査	教授	上 館 民 夫
副査	教授	高 井 光 男
副査	教授	木 下 晋 一
副査	教授	棟 方 正 信
副査	助教授	谷 博 文

学位論文題名

ペルオキシダーゼ内封リポソームのキャラクタリゼーションと 免疫測定法の標識物質への応用に関する研究

リン脂質二分子膜から成る閉鎖小胞であるリポソームは、その内水相に多くの分析試薬を内封できることから、計測化学の分野において新たな標識物質としてのリポソームの応用が注目されている。本研究の目的は、分析試薬として広く使用されている西洋わさび由来のペルオキシダーゼ(HRP)をリポソームの内水相に保持できることを明らかにすることである。また、HRP内封リポソームと抗体との結合法を開発し、免疫測定法における新たな標識物質を開発することも目的としている。

本論文は7章から構成されており、第1章では本研究の背景と目的について述べられている。以下に著者が見出した主要な成果を述べる。

- 1) リポソームの物性はリン脂質の含量により変化するため、リポソームの調製時にリン脂質の定量が必要になるが、従来の吸光光度法は分析操作が繁雑で分析に時間を要する問題点があった。そこで、著者はICP発光分析法によるリン脂質の自動分析法の開発を試み、従来の吸光光度法に比べ、より広い濃度範囲のリン脂質を迅速に自動分析できる分析法を開発した。
- 2) 押し出し法により調製した1枚膜リポソームにHRPが約4300分子保持できることを見出した。さらに、HRP内封リポソームの粒径分布およびHRPの保持効率を測定し、調製したHRP内封リポソームのキャラクタリゼーションを行なった。

3) リポソームに内封したHRPの測定法として、リポソームに界面活性剤を加えてリポソーム膜を開封したのち、リポソームから溶出したHRPをルミノール化学発光法で測定する方法を開発した。また、同一濃度のHRPについて、リポソームへの封入、未封入によらず、単位時間当たりの発光速度は等しいことから、HRP内封リポソーム調製前後におけるHRPの活性は変化しないことを明らかにした。

4) HRP内封リポソームを標識物質に利用する免疫測定法の確立するため、抗体へのリポソームの結合方法を開発した。最初に、パルミトイル化リポソームを抗体に結合する方法を開発した。HRPを抗体に直接的に結合する方法と抗体当たりの発光強度を比較し、パルミトイル化リポソーム担持抗体を標識物質に用いると、発光強度が125倍増大するを見出した。つぎに、アビジン-ビオチン結合を利用してリポソーム表面に抗体を結合する方法を開発した。その抗体を用いて、イムノドットブロッキング法によるウサギIgGの検出を行った結果、IgG当たりの発光強度はHRPをビオチン結合により直接的に抗体に結合した場合の発光強度と比較して約20倍増大することを見出した。

5) リポソーム内にHRPを安定に存在させる因子を解明するため、HRPの漏出量に及ぼすコレステロールおよび酸性リン脂質含量の影響を検討し、その結果、コレステロールおよび酸性リン脂質の含量を増加させることによりHRPがリポソームにより安定に保存できることを見出した。さらに、蛍光物質であるピレンをリポソーム膜内の疎水部に導入し、蛍光スペクトルの変化から、リポソーム膜の膜流動性を検討した結果、コレステロールが膜の流動性を抑える働きを持つことを見出し、それによりHRPがより安定にリポソーム内に保存できることを明らかにした。

これを要するに、著者はリン脂質の分子集合体であるリポソームに酵素を安定に保持する方法を開発し、さらに、酵素内封リポソームを標識物質に応用することにより、生体分子の高感度な検出システムを開発したものであり、生物機能化学および生物計測工学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。