

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12505

研究課題名(和文)ハイスループット1分子ひっぱり試験による結合カスペクトルの測定とアッセイ応用

研究課題名(英文) Study of high-throughput single molecular tensile testing for binding force spectrum and application to bio-analysis

研究代表者

浮田 芳昭 (UKITA, Yoshiaki)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：40578100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗原抗体反応等の分子間相互作用の質的評価手法の研究として分子ひっぱり試験法の研究を行った。ひっぱり試験法に用いるマイクロビーズへの抗体固定化法を確立し、これによるひっぱり試験プラットフォームを確立した。また、これによりマウスIgGと抗マウスIgGの間に生じる相互作用力を力学的に解析した結果、数10pN~100pN程度であることが示唆され、原子間力顕微鏡を用いた先行例とも整合する数値を得ていることから、提案手法を確立できたと言える。

研究成果の概要(英文)：This study explored a molecular tensile testing method that able to measure the mechanical force characterization of bio-active molecules, such as antibody. Antibody-immobilized microbeads and molecular testing platforms were developed. The measurements of binding force between Mouse IgG and anti-MouseIgG antibody were carried out based on the developed testing platform. By the series of investigations, we obtained the molecular binding force extending from few 10 pN to 100 pN, which is consistent with the previously reported binding forces of biomolecule measured by atomic force microscopy. Therefore it is concluded that the proposed method is successfully established.

研究分野：マイクロシステム

キーワード：生体分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

生体分子の中には特定の物質を認識し、結合・反応等の応答を示す性質を有するものがあり、抗体、酵素、核酸 (DNA, RNA) などが例として挙げられる。これらは生体内に於いて生命活動の恒常性の維持に寄与しているが、工学的にはバイオセンサーやバイオ燃料電池などの応用が研究されており、環境、食品、臨床、医学、エネルギーなどの様々な分野における応用が期待される。また、これらの分子の相互作用の機械的物性を巧妙に制御することで分子機械や分子ロボット、あるいは、人工的に設計したタンパク質薬剤や酵素などへの応用も期待出来る。一方、このような分野の発展には、分子と分子の間に生じる相互作用を力学的に解明することが重要であると考えられる。

バイオセンサーに関してもう少し掘り下げて述べておきたい。現在バイオセンシングへの応用としては抗体を用いる免疫センサーの研究が中心になっており、この高感度化が広い分野で求められている状況にある。この様な状況において、センサーのパフォーマンスを律速する重要なファクターが抗体分子の特異性である。この問題を図1に図示する。抗体は特定の分子に対して高い特異性を有するものの、特異的分子によく似た構造の夾雑分子が系に多量に存在する場合は幾分かこれらの夾雑分子も抗体に結合することになる。これは特異的分子が十分に存在する場合には、センサーにより得るシグナルはほとんど特異的分子由来になるため、無視でき

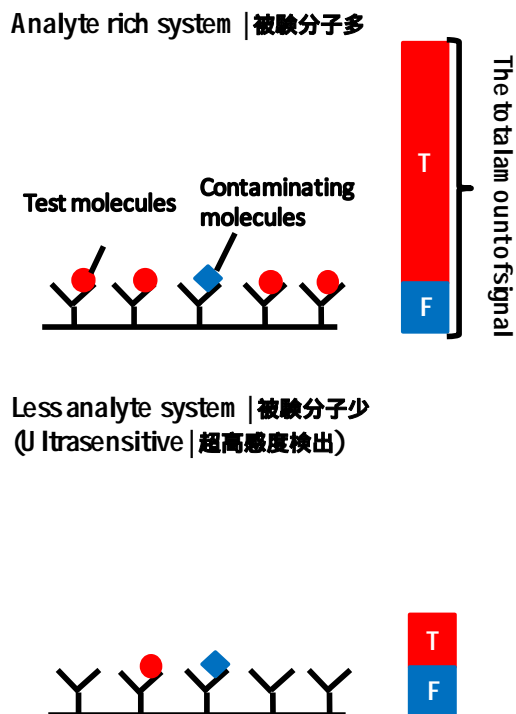


図1 超高感度免疫センサーにおける特異性の課題

る。一方、非常に微量の特異的分子を検出する必要がある超高感度測定において、夾雑分子濃度が高い場合には、センサーにより得られるシグナル中においてこの夾雑分子由来のシグナルが占める割合が大きくなるため、真正なシグナルがこれに埋もれてしまうことが問題となる。

上記課題の本質は、既存の免疫センサーは抗体に結合した分子の量を測定する原理に基づいているため、たとえ目的の分子と異なる種類の分子が結合したとしてもこれを目的分子と識別できないということである。このような課題に対して、抗体と抗原との結合の“質”を評価する分子解析技術の研究が重要であるという思想が、本研究の着想の根幹となる。質の評価を実現する上で着目したのが、抗原抗体結合の力学的特性、即ち、結合力である。図2に示すように、特異的分子と抗体との結合においては、高い結合力で結合していると考えられ、一方、非特異的結合により結合している抗原抗体結合に於いては、これとは異なる(おそらく低い)結合力で結合していると仮説を立てられる。通常の免疫センシングとは異なり、本研究では一旦結合した抗原と抗体を引き剥がし、結合力を測定することで、これまでに得られなかった質的な情報を取得し、超高感度化など新たな価値を有する免疫センシングを実現できると着想し、生体分子の相互作用により生じる結合力を測定するためのひっぱり試験法の開発に取り組んだ。

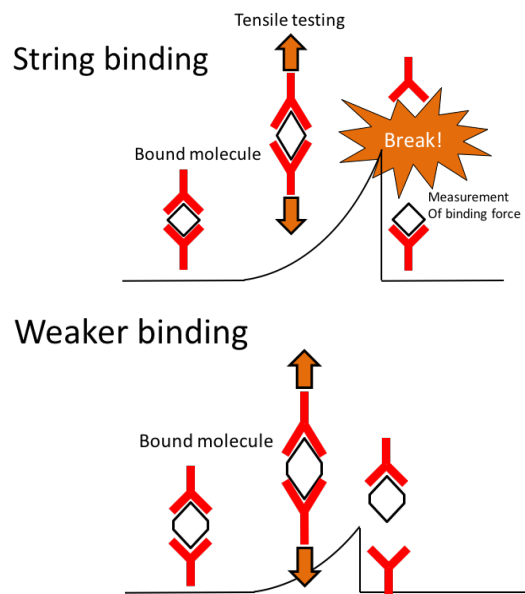


図2 ひっぱり試験による特異的結合と非特異的結合の識別方法

2. 研究の目的

分子間の力学測定は1980年代に原子間力顕微鏡を用いて活発に取り組まれており、この年代にNatureやScienceなどのトップジャーナルの紙面をにぎわせていた。これらの研究は分子レベルの力学的な様相を明らか

にした点で特に生物物理学の分野では科学的にエポックメイキングな仕事であったと評価されている。一方、これらのアプローチでは原子間力顕微鏡プローブへの生体分子固定の手間がかかることなどから、応用研究への展開が困難であったと推測される。本研究は、我々が得意とする遠心マイクロ流体工学の観点から、遠心力を用いることでこの分子解析技術を簡便かつハイスループットに展開することを目的とするものであり、分子の力学的解析を初めて応用展開にアプローチさせる試みであることが特色であると言える。

3. 研究の方法

比重の異なる2種類のビーズを抗体分子に結合させ、あらかじめこれらのビーズを結合力を測定したい分子により結合させて複合体を形成しておく。これらのビーズの中間の比重に調節した密度溶媒にこのビーズの複合体を懸濁する。この状態で遠心力を印加すると比重が小さいビーズには浮力が作用し、比重の大きいビーズには重力が作用することによって沈降する。したがって2つのビーズを結合している分子に引張力が作用することになる。最初、懸濁したビーズ複合体は複合体を維持したまま沈降または浮上し、チャンバーの壁面と接触する。壁面との接触により一方の力が壁面からの反作用によって打ち消され、引張力は一方のビーズに作用する浮力か沈降力のみから見積もられる状況となる。これを初期状態として遠心力を徐々に増加させていくと、ビーズに作用する力も徐々に大きくなり、ある回転数に達した時点でビーズ間の結合が破断して2つのビーズが分離する。このときの引張力を求めることで、ビーズを結合させていた生体分子の相互作用を見積もることができる。

実験の手順は以下ようになる。CD 状の基板に 5 mm 角のジメチルポリシロキサン (PDMS)チップを貼り付ける。PDMS チップ

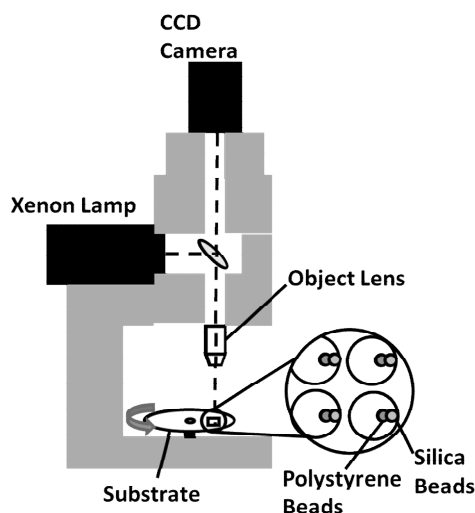


図3 分子ひっぱり試験観察装置の概要

には直径 200 μm のマイクロチャンバーがパターニングされている。直径ポリスチレンとシリカの2種類のビーズに抗マウス IgG 抗体を固定化する。抗体を固定化した2種のビーズにマウス IgG を加えて抗原抗体反応によってビーズ複合体を作成する。ビーズ複合体を中間比重に調整した比重溶媒と共に上記デバイスのマイクロチャンバーに封入する。の CD 基板を実験装置に取り付け、遠心力を印加しながらビーズの挙動を観察する。測定に用いた装置の概要は図3のようなものになる。本装置はサーボモーター回転機構とストロボ発光を同期して顕微鏡撮影できるものであり、数 100 μm 以下の微細な挙動も可視化可能な装置である。

4. 研究成果

上記実験方法で実際に実験を行ったところ、ビーズ複合体は 1000 rpm に達した瞬間に分離する結果を得た。ビーズが分離したときにビーズに作用していた力は 80 - 90 pN と見積もられる。また同様の実験の繰り返しによってさらに数 10 - 100 pN で結合力が分布する結果を得た。先行例である、原子間力顕微鏡を用いた生体分子間の相互作用の測定法結果に於いては、その結合力は数 10 ~ 100 pN と報告されており本結果と整合性があると言える。よって、上記結果により遠心マイクロ流体デバイスを用いた生体分子間相互作用測定の原理を実証できたと言える。

さらに複数のビーズ結合を形成し、同時測定にも取り組みこれに成功している。抗原添加系に於いて形成したビーズ結合の結合力は 30pN と 100pN の付近に二つのピークを示すことがわかった、一方、ファンデルワールス力等の作用により非特異的に結合したビーズの結合力は 10pN にも満たないことがわかった。よって、本技術により分子レベルでの結合形態を力学量として検出できることを実証できたと言える。

<引用文献>

E.-L. Florin ら, Biosensors & Bioelectronics, 10(1995), 895

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

Mao Otake, Yoshiaki Ukita, Proposal of Molecular Tensile Testing by a Centrifugal Microfluidic Approach, 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2016), 査読有, 11P-11-112L, Kyoto,

2016.11.8-11

大竹 真央, 浮田 芳昭, 遠心マイクロ流体デバイスを用いた生体分子間相互作用測定法の提案, 山梨講演会 2016, 査読なし, 山梨県甲府市(山梨大学甲府キャンパス), 2016.10.22, 口頭発表

大竹 真央, 浮田 芳昭, ハイスループット生体分子間相互作用測定法のための抗体固定化基板の開発, 第64回応用物理学会春季学術講演会, 査読なし, 16a-P3-22, 神奈川県横浜市(パシフィコ横浜), 2017.03.14-17, ポスター発表

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 分子計測法およびそれを用いた分子計測装置

発明者: 浮田芳昭

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-192894

出願年月日: 2016年9月30日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浮田 芳昭 (UKITA, Yoshiaki)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号: 40578100