

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04746

研究課題名（和文）メカノスペクトル多次元分子解析システムと高精度前立腺癌診断法の創生

研究課題名（英文）Development of multidimensional molecular diagnostic system based on high-throughput molecular tensile testing

研究代表者

浮田 芳昭 (UKITA, Yoshiaki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：40578100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗原抗体反応の結合を力学的に計測することによる新規分子解析技術の開発に取り組んだ。本技術の原理は遠心力印加による分子引張試験を基礎としており、複数同時測定に適する点の特徴である。この研究により得た主な成果は(1)網羅的分子引張試験系の開発、(2)1000粒子程度の付着力測定技術の開発(3)粒子基板間の物理的相互作用の解明(4)物理的相互作用低減手法の開発などである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫反応を用いるセンサーは免疫センサーと呼ばれ、医療、環境、食品等幅広い分野で活用されている。一方、免疫反応が高い特異性を有するとは言え、超高感度測定等精密な測定においては、狭雑分子の誤認識が問題になるケースがある。これは、従来型の免疫測定系がセンサーに結合した物質の量を指標としていることによると考えた。そこで、本研究では分子の結合力測定原理を新たに開発することで、結合の質の評価に基づく新発想の免疫センサーを実現することを目的とした。これにより、信頼性の高い前立腺癌マーカーの解析技術の実現に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we worked on the development of a new molecular analysis technology by mechanically measuring the binding of antigen-antibody reaction. The principle of this technology is based on a molecular tensile test by applying centrifugal force, and it is suitable for simultaneous measurements of multiple single molecular interactions. The main results obtained from this research are (1) development of a comprehensive molecular tensile test system, (2) development of adhesion measurement technology for about 1000 particles, and (3) elucidation of physical interactions between particle substrates (4). Development of physical interaction reduction methods.

研究分野：分析化学

キーワード：分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

酵素、抗体、核酸等、生体分子の中には特定の物質を認識して相互作用する特異性を有するものがある。これらの生体分子の特性を活用し物質の測定する装置をバイオセンサーと呼ぶ。特に、抗体は任意の物質に対する特異性があるものを作成できることから、適用範囲が非常に広いと言える。特に、抗体を利用するバイオセンサーは免疫センサーと呼ばれる。一方、抗体が高い特異性を有するとは言えマイクロ構造が似通った分子同士を識別できずにこれらの両方に結合することもあり得る。このような結合現象は非特異的な相互作用と呼ばれ、特に測定対象物質の濃度が希薄となり、その他の狭雑物質中に非特異的な結合特性が多量に含まれる試料の測定においては誤検出シグナルの発生の原因となるためセンサーの高感度化においては本質的な問題となる。

2. 研究の目的

免疫センサーでは、化学的、光学的、電気的な様々な変換プロセスを経て、センサー表面に固定化した抗体に結合した物質の量を信号に変換して定量する。しかし、この変換プロセスにおいて信号に反映されるのは主に物質の量であり、種類を識別する原理は無い。そこで、本研究では抗原抗体反応により結合した、物質の結合力を指標とすることで物質の結合の質を指標とする新発想のバイオセンシングの実現に取り組んだ。

3. 研究の方法

図1に本研究で開発に取り組んだ抗原抗体反応の結合力を測定する手法の概略図を示す。基板表面に抗体を固定化しておく。この時表面に強固に結合させるためにシランカップリング反応や架橋材の利用によって共有結合により抗体を基板やマイクロ粒子に結合させておく。次に抗原(測定対象物質)を基板表面の抗体と反応させる。さらにこれに対してマイクロ粒子表面の抗体を結合させ、サンドイッチ状の分子複合体を形成する。この基板を適当な回転装置において回転させることでマイクロ粒子に遠心力を印加する。マイクロ粒子への遠心力は免疫複合体に対する引張力となり、回転数を変化させることでこの引張力を幅広く調整できる。また、基板上に複数のマイクロ粒子があった場合でも遠心力は全ての粒子に均一に作用するため、網羅的な測定を実現できることが本手法の特徴である。

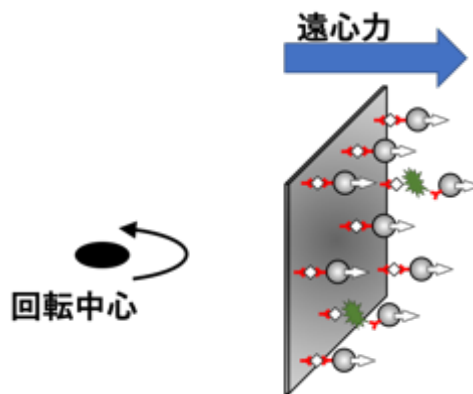


図1 分子引張試験法の概略図

4. 研究成果

4-1. 分子引張試験系の構築

本原理実証の実験プラットフォームとして図2に示す実験装置を構築した。ガラス製基板表面にアミノシラン (APTES) によるシランカップリング反応によりアミンを導入する。この基板をホルダーにセットし、これにシリコンゴム製のチャンパーを取り付け反応器を構築する。これに対してグルタルアルデヒドを架橋材として抗体を固定化する。抗原をこの抗体に対して反応させる。また、マイクロ粒子はカルボキシル基により表面修飾されたものを用い、これにカルボジイミドを架橋材として抗体を結合させる。これを基板に反応させた抗原に結合させ、免疫複合体を形成した。このホルダーを内製した遠心装置にセットしマイクロ粒子に遠心力を印加した。遠心装置の中核部はサーボモーターであり、これにホルダーをセットするためのフレームを取り付けてある。コンピューターにより回転数の制御プログラムをセットし、この通りに回転数が制御される。主に回転数は 0rpm~2000rpm の範囲で変化させて実験を行った。回転させた基板を一旦装置から取り外し、倒立顕微鏡によって、基板表面での粒子画像を撮影した。粒子のカウントを高速化するために画像解析ソフトによる自動的な粒子カウントを実現した。これにより 1000 粒子程度の計測

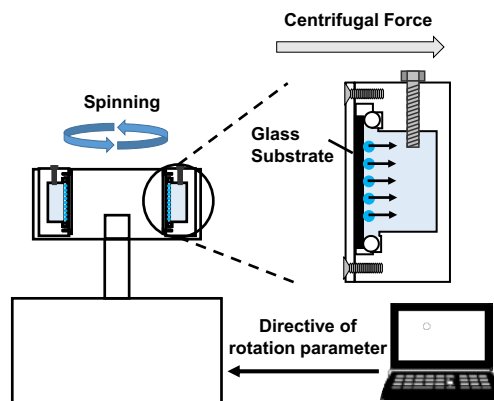


図2 分子引張試験装置の概略図

が可能となっている。結合力の分布情報を得るために、重力の印加による粒子の脱落数を最初に計測し、その後 100rpm 程度の低い回転数による遠心力の印加と、粒子分布画像の撮影をくりかえすことで、複数ステップでの結合力測定を行った。

4-2. 分子引張試験の結果

図 3 に測定結果の一例を示す。本結果では数 10pN 程度の頻度が高くなっている。複数の実験で数 10pN に極大値が観測されることが多く、このあたりに抗原抗体分子が関与する相互作用の特徴量が存在すると期待されるが、これまでの研究では未だ結論には至らなかった。この原因として、抗原抗体反応以外の基板と粒子間に生じる物理的な相互作用の影響が大きいことが考えられる。

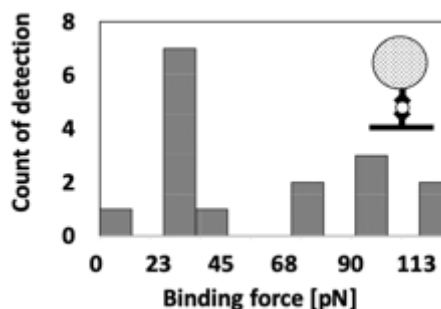


図 3 分子引張試験の結果

4-3. 基板とマイクロ粒子間の物理的相互作用の解明

図 4 に DLVO 理論の概要図を示す。基板とマイクロ粒子間の物理的相互作用にはファンデルワールス力と電気的な相互作用がある。ファンデルワールス力は物質間に普遍的に存在する相互作用であり、常に引力と考えられる。一方、基板とマイクロ粒子との間に生じる電気的相互作用は電気的な極性によって引力にも斥力にもなり得る。本研究では基板としてガラス基板を主に用いることからこの表面の性状とマイクロビーズ表面の性状との関係を踏まえて界面設計を行う必要がある。ガラスは本来表面に水酸基を有している。これはタンパク質実験を行う

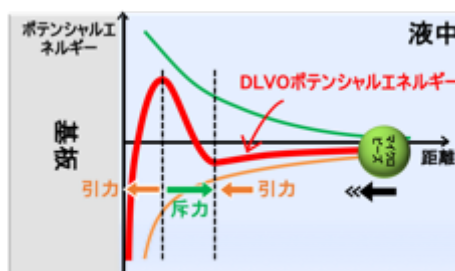


図 4 DLVO 理論の概要図

pH では脱プロトン化するため負極性を示す。さらに抗体を固定化するためには水酸基に対し、シランを反応させアミンを基板表面に修飾する。このアミンはタンパク質実験を行う pH では電気的に中性である。また、マイクロビーズ表面はカルボキシル基が修飾されており、カルボキシル基はタンパク質実験系の pH において負極性を示す。これを踏まえ、基板とマイクロ粒子に抗体の固定化やシランカップリング処理を施さず、相互作用を解析する実験を行った。この結果、シランカップリング処理を行っていない基板と抗体を架橋させていない粒子は溶液の塩強度が高くなるにつれて付着性が高くなることがわかった。これは、溶液の塩強度が高まることにより固相表面の電荷が対イオンにより遮蔽され電気的な斥力が中和されることによりファンデルワールス引力が相対的優位になるためであると DLVO 理論から説明される。また、ガラス基板にシランカップリング処理を施し、アミンを導入した場合には、低い塩強度においても高い粒子付着性を示すことがわかった。これはアミンがタンパク質実験系における pH では電気的に中性であるため、塩強度が低くとも電気的相互作用が小さく、常にファンデルワールス引力が優位になるためと説明される。

4-4. 基板とマイクロ粒子間の物理的相互作用の制御

物理的相互作用を低減する方法として、基板表面へのナノ粒子のコーティングを検討した。ファンデルワールス力による物理的相互作用は界面が数 10nm 以下の距離に近づいたときに顕著になる。このため曲率半径の大きなマイクロ粒子を使用すると、接触界面が平面同士に近くなるため、物理的相互作用に関与する有効界面積が大きくなる。本研究の系で顕著な物理的相互作用が観測されたのはこのためである。これを低減するには、粒子曲率半径を小さくすることが有効と考えられる。このためにガラス基板表面へのナノ粒子コーティング技術を確認した。図 5 のような基板を用いることによりアミン修飾粒子を用いた場合においても、物理的な相互作用が顕著に低減されることが確認された。

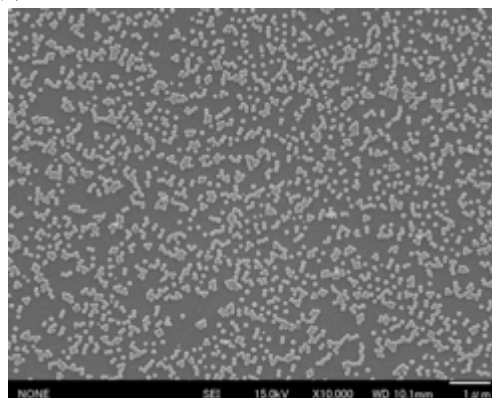


図 5 ナノ粒子コーティング基板の電子顕微鏡画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Mao Otake, Yoshiaki Ukita | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Force Analysis Method of Single Molecule Interaction Using Centrifugal Force | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics | 6. 最初と最後の頁 SIIC03 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7567/1347-4065/ab1b5e | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mao Otake, Yoshiaki Ukita | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Dynamic Measurement Method for Bio-molecular Interactions by Using Centrifugal Force | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Sciences | 6. 最初と最後の頁 1123-1127 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.19P137 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 大竹真央、浮田芳昭 |
| 2. 発表標題 画像投影法による付着微粒子のスクリーニング |
| 3. 学会等名 第 67 回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mao Otake, Yoshiaki Ukita |
| 2. 発表標題 Dynamic analysis method of single molecule interaction using centrifugal force |
| 3. 学会等名 14th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN-14) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大竹 真央, 浮田 芳昭 |
| 2. 発表標題 分子間相互作用並列測定のための抗体修飾基板における架橋剤の検討 |
| 3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 浮田芳昭 |
| 2. 発表標題 マイクロ流体工学を基盤とする免疫測定技術の開発 |
| 3. 学会等名 平成30年度 日本分析化学会関東支部山梨地区交流会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 大竹真央、浮田芳昭 |
| 2. 発表標題 ハイスループットな単一分子の力学解析法の提案 |
| 3. 学会等名 第65回応用物理学会春期学術講演会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|