

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20960

研究課題名(和文) 抗原抗体反応の分子認識機能を援用した膜タンパク質の光触媒ナノ加工技術の開発

研究課題名(英文) Photocatalytic nanofabrication of targeted single membrane protein assisted with antigen-antibody molecular recognition

研究代表者

柴田 隆行 (Shibata, Takayuki)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10235575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：原子間力顕微鏡(AFM)に搭載する新規な機能として、標的となる膜タンパク質を一分子レベルで選択的に分解除去可能なナノ加工・計測技術の実現に向けた基礎的検討を行った。本研究では、TiO₂光触媒を被覆したAFMプローブを用いた細胞膜のナノ加工技術と分子認識機能を有する抗体修飾Agナノ粒子担持AFMプローブを開発した。本研究の実現は、将来のナノ・バイオテクノロジーを支える革新的な基盤技術として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度先進医療技術・革新的医薬品開発におけるライフ・イノベーションを創出するためには、生命現象の統合的理解とその制御が必要不可欠となる。本研究では、生体機能の一つである高感度かつ高選択的な分子認識機能(抗原抗体反応)を援用することで、細胞膜表面に存在する膜タンパク質を標的とした一分子レベルでの選択的除去加工技術の開発を目的としている。本提案技術の実現は、他の類を見ないユニークなナノ加工・計測技術を提供することにつながり、ナノ・バイオテクノロジーの革新的な発展に寄与することが大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：As a novel feature to be incorporated into atomic force microscopy (AFM), we conducted a fundamental study of a nanofabrication and nanomeasurement technique that can selectively degrade targeted membrane proteins at the single molecule level. In this study, we developed the photocatalytic nanofabrication of living cell membranes based on highly localized photochemical oxidation with a catalytic titanium dioxide (TiO₂)-functionalized AFM probe. Moreover, we also developed antibody-modified AFM probes functionalized with Ag nanoparticles for incorporating a highly specific molecular recognition ability. The realization of the novel AFM-based technique is expected to be an innovative technology required to support future advances in nanotechnology and biotechnology.

研究分野：MEMS, マイクロ・ナノ加工

キーワード：原子間力顕微鏡(AFM) AFMナノ加工 酸化チタン光触媒酸化反応 チップ増強ラマン分光法(TERS) 分子認識機能

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

高度先進医療技術・革新的医薬品開発におけるライフ・イノベーションを創出するためには、生命現象の統合的理解とその制御が必要不可欠となる。その中でも、細胞膜上に存在する“膜タンパク質”は、細胞内外の情報伝達や物質輸送などの生命の維持に不可欠な役割を担っており、創薬研究における重要なターゲットとなっている。一般論的には、細胞膜に存在する膜タンパク質が細胞の機能を制御している仕組みは想像に難くない。一方、特定の膜タンパク質が失われることによっても細胞の機能は大きな影響を受ける。このため、一分子レベルでの膜タンパク質の“細胞膜への形成”と同様に、“細胞膜からの除去”を人為的に操作可能な技術の確立は、生命機能の解明・制御という観点において重要な意義をもつ。本研究では、原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy : AFM) に搭載する新規な機能として、標的となる膜タンパク質を一分子レベルで選択的に分解除去可能な技術を提案する。本提案技術の実現は、他の類を見ないユニークなナノ加工・計測技術を提供することにつながり、ナノ・バイオテクノロジーの革新的な発展に寄与することが大いに期待できる。

2. 研究の目的

細胞は脂質からなる二重膜によって外界とは厳密に隔てられており、外界との物質 (分子) と情報 (シグナル伝達) のやりとりは“膜タンパク質”が担っている。このため、特定の膜タンパク質を人為的に破壊 (細胞機能の制御) することができれば、病気の原因の解明や創薬のための有益な知見を与える新たな研究手法の提供につながる。本研究では、生体機能の一つである高感度かつ高選択的な分子認識機能 (抗原抗体反応) を援用することで、細胞膜表面に存在する膜タンパク質を標的とした一分子レベルでの選択的除去加工技術の開発を目的としている。図 1 に概念図を示す。①Ag ナノ粒子を担持した光触媒 TiO_2 (AgNP@TiO_2) プローブ探針先端表面に標的タンパク質 (抗原) に特異的に結合する抗体を修飾 (固定化) し、②チップ増強ラマン分光法 (Tip-enhanced Raman spectroscopy : TERS) によって細胞膜表面の時系列 TERS スペクトルを取得し、③抗原抗体反応によって変化する分子構造の変化を主成分分析 (Principal component analysis : PCA) に基づく統計学的なスペクトル分離手法によって一分子レベルで特定し、④特定した膜タンパク質を TiO_2 光触媒酸化反応で特異的に分解除去 (探針先端の抗体と標的膜タンパク質が結合した状態で紫外線照射) する。同時に、⑤分解反応過程の時間変化 (分子構造変化) を *in situ* でモニタリング (TERS 分光) する。本研究では、基礎的検討として、光触媒 TiO_2 プローブ作製条件ならびに Ag プローブ表面へのビオチン分子の修飾条件の最適化を行った。

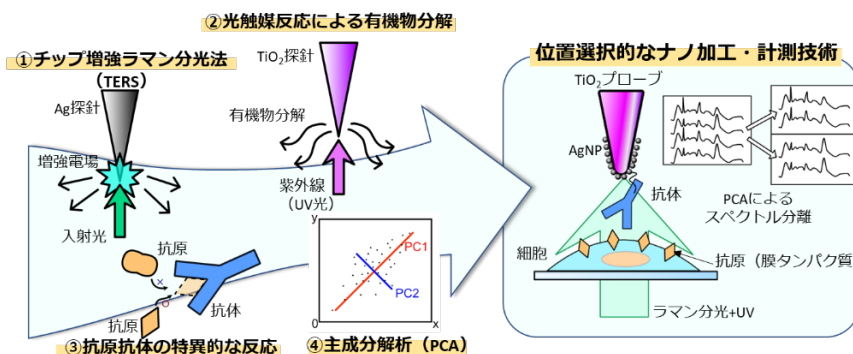


図 1 細胞膜表面の膜タンパク質を標的とした一分子レベルでの選択的除去加工の概念図

3. 研究の方法

(1) 光触媒 TiO_2 プローブの作製方法

本提案技術を実現する上で、これまで、光触媒 TiO_2 プローブ作製プロセスの再現性と歩留まりが大きな問題となっていた。その要因の一つとして、陽極酸化の再現性の低さがあった。具体的には、①陽極酸化時に発生する気泡によってプローブの変形や破損が生じること、②接触面積を大きくするために電極の Pt 線を数回折り曲げてプローブと接触させてシリコン樹脂 (PDMS) 製ジグで挟む固定方法では、実験ごとに接触抵抗にバラツキが生じていたことである。そこで、図 2(a) に示すように、マグネチックスターラーを用いて電解液を攪拌しながら陽極酸化を行うことで気泡の除去を促進した。さらに、PDMS 製のジグを改良し、Pt 線を埋め込む方式とし、プローブとの接触状態を安定化させた (図(b))。もう一つの要因として、熱酸化膜を形成した AFM プローブの先端直径が小さく、スパッタ法による Ti (100 nm) 成膜時に探針先端部分が破損する現象が認められていた。そこで、マッフル炉 (950℃) による熱酸化時間を 75 min から 120 min に変更し、膜厚を増加させた (熱酸化後の探針先端直径 : $27.1 \pm 2.8 \text{ nm}$ → $46.3 \pm 5.5 \text{ nm}$)。その結果、Ti 成膜の成功率は 16.7% から 80.0% まで向上した。

(2) AFM ラマン分光装置および Ag プローブ作製方法

図3に自作の AFM ラマン分光装置の概略図を示す。倒立顕微鏡（ニコン製 Ti-U）上に設置した市販の AFM 装置（Asylum Research 社製 MFP-3D-BIO）を用い、自作のラマン分光光学系を構築した。励起光源には、波長 532 nm の半導体励起固体（DPSS）レーザ（Cobolt 社製、出力 50 mW）を使用し、1/2 波長板と偏光子によって偏光方向と光強度の調整を行った後、ラディアル偏光子によって z 偏光成分を増加させた励起照明を形成し、ダイクロックミラーを介して倒立顕微鏡内に導入し、対物レンズ（60 倍、NA 0.7）によって AFM プローブ探針先端に集光する。また、測定対象（探針先端の極近傍）から得られたラマン散乱光は、同一の対物レンズで集光し、ダイクロックミラー、ノッチフィルタ（ 532 ± 5 nm）を介して励起光を除去した後、分光器（浜松ホトニクス製 C11713CA、分解能 10 cm^{-1} ）に導入する光学系となっている。なお、AFM 装置の防音カバー付き防振台内に収まるように、励起光とラマン散乱光を上下 2 段に平行して伝送することで、幅方向にスペースを取らないコンパクトな光学設計としている。また、Ag プローブの作製方法は、まず、市販の Si 製 AFM プローブ（オリンパス AC200TN、公称ばね定数 9 N/m 、公称先端半径 7 nm ）の探針表面に熱酸化（マッフル炉： 950°C 、120 min）を行い、その後、スパッタ法によって、密着層として Ti（10 nm）を成膜した後、Ag（膜厚：30 nm）を形成した。

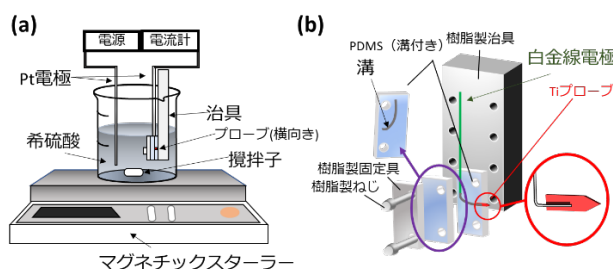


図2 陽極酸化による TiO_2 プローブ作製方法

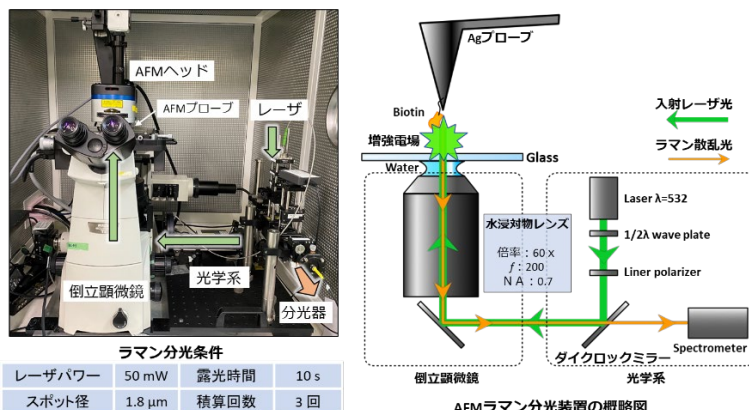


図3 倒立顕微鏡組み型 AFM ラマン分光装置（自作）

4. 研究成果

(1) 光触媒 TiO_2 プローブの評価

図4(a)に H_2SO_4 電解液濃度 0.5 mol/L 、印加電圧 140 V 、陽極酸化処理時間 30 s で作製した TiO_2 プローブの光学顕微鏡写真を示す。プローブ全体に均一に陽極酸化が行われていることがわかる。図(b)は探針先端部分を拡大した SEM 像である。先端直径は 150 nm となっており、プロセス改善前の先端直径（約 850 nm ）と比較して先端部分の損傷を大幅に低減することができた。図(c)は探針先端部分のラマンスペクトルである。作製したプローブ 7 本中 5 本でアナターゼ型 TiO_2 に起因するピーク（ 394 cm^{-1} 、 636 cm^{-1} ）が明瞭に確認され、歩留まりと再現性を大幅に改善することができた。さらに、作製したアナターゼ型 TiO_2 プローブを用いて、光触媒酸化反応による HeLa 細胞の細胞膜穿孔（穿刺荷重： 10 nN 程度）が可能であることを実証した。

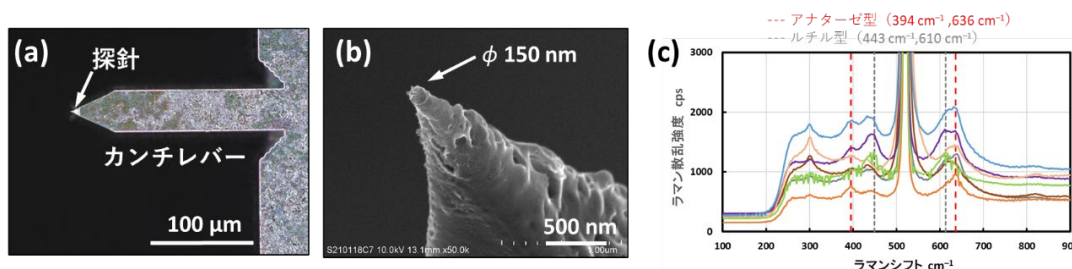


図4 作製した TiO_2 プローブおよび探針先端のラマン分光分析結果

(2) Ag プローブの TERS 活性評価

図 5(a)は作製した Ag プローブの SEM 像である。スパッタ成膜時間 2.5 min では先端直径は 80.3 ± 2.6 nm ($n=3$) であった。成膜時間を 4.0 min、5.0 min と増加させると、先端直径は比例して増加し、それぞれ 107.6 ± 2.6 nm ($n=3$)、 147.6 ± 4.8 nm ($n=3$) となった。図(b)は Si プローブおよび成膜時間の異なる Ag プローブで取得したナイルブルー A (NBA) のラマンスペクトルである。Si プローブではピークは確認できないが、Ag を被覆したプローブでは、 600 cm^{-1} 付近に NBA に起因するピークが確認でき TERS 活性を有していることがわかる。図(c)に成膜時間と NBA ラマンピーク強度との関係を示す。成膜時間 2.5~4.0 min の条件で高い TERS 活性が得られることがわかった。なお、予備実験の結果から、NBA に起因する 600 cm^{-1} 付近のピーク強度を評価することで、Ag プローブの TERS 活性が定量的に評価できることが明らかとなった。

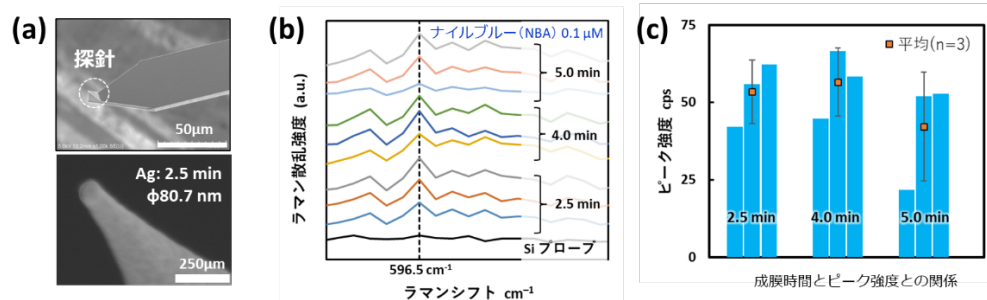


図 5 作製した Ag プローブおよびナイルブルー (NBA) のラマンスペクトルの解析結果

(3) Ag プローブ探針表面へのビオチン修飾

抗原抗体反応の高い分子認識機能を援用した TERS に基づく分子構造のリアルタイム可視化技術 (標的膜タンパク質の一分子同定) の基礎的検討として、生体分子の相互作用のモデル実験として最も広く利用されているアビジン (抗原) - ビオチン (抗体) 相互作用に着目した。そこで本研究では、ビオチン修飾 Ag プローブの作製条件を検討した。まず、Ag プローブ (成膜時間 2.5 min) を 1 mM システアミン含有エタノール溶液に 30 min 浸漬し、エタノールおよび HEPES 緩衝液で洗浄することで、Ag 表面にシステアミンの自己組織化単分子膜を形成し、ビオチンと結合するアミノ基 ($-\text{NH}_2$) で修飾した。次に、EZ-リンク NHS-PEG12-ビオチンを 30 min 反応させ、Ag 表面のアミノ基とビオチンの NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) - エステルとのアミド結合によって修飾し、最後に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した。

Ag プローブに修飾したビオチンの評価には、西洋ワサビペルオキシターゼ (Horseradish peroxidase : HRP) で標識されたストレプトアビジンを抗原抗体反応によって結合させた後、酵素 HRP に反応して青色に発色するテトラメチルベンジジン (TMB) を用いて評価した。図 6(a) は Si ウエハに Ag を成膜してビオチン修飾を行った基礎実験の結果である。システアミンで修飾した場合 (条件 1) でのみ酵素反応による TMB の青色発色が確認された。これは、ビオチンがシステアミンを介して Ag と化学的に結合していることを示唆している。図(b)は Ag プローブへのビオチン修飾結果である。ビオチン修飾をしていない Ag プローブでは発色は認められなかったが、システアミンを介してビオチン修飾した Ag プローブでは、ストレプトアビジンとの抗原抗体反応が正しく起こり、HRP 酵素反応による TMB の青色発色を確認することができた。

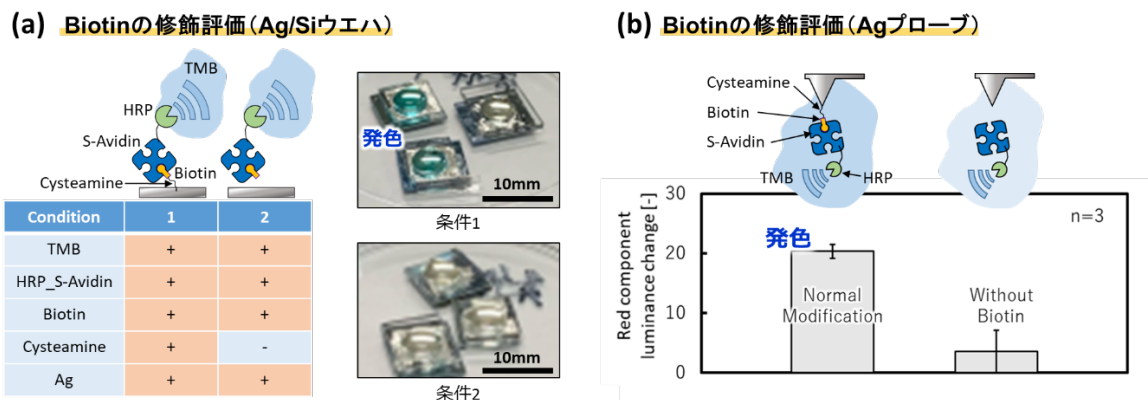


図 6 Ag 表面へのビオチン修飾の実験結果

(4) ガラス基板表面へのストレプトアビジン修飾

ビオチン修飾 Ag プローブを用いた抗原抗体反応を援用した一分子認識機能の評価するための基礎実験として、ガラス基板表面へのストレプトアビジンの修飾方法を検討した。図 7 に修飾実験の結果を示す。条件 1 と条件 2 において発色が確認され、条件 3 と条件 4 では発色が確認

されなかった。

条件1では、ガラス表面にポリ-D-リジン (PDL) がコーティング (アミノ基が修飾) されたガラスボトムディッシュ (フェニックスサイエンス P50GC-1.5-14-F) を使用した。先ず、ディッシュに2.5 vol%グルタルアルデヒド (GTA) 水溶液を滴下し、30 min 室温で静置し、ガラス表面のアミノ基 (-NH₂) を GTA のカルボニル基 (-CHO) に置換する。次に、PBS で洗浄後、ストレプトアビジン (PBS で0.17 mg/mL に調製) を滴下し、4°Cで30 min 静置して反応させた。最後に、HRP 標識ビオチンを抗原抗体反応によって結合させ、HRP 酵素反応による TMB の青色発色によって評価した。以上の結果から、アミノ基で修飾したガラス表面にグルタルアルデヒドを介して、ストレプトアビジンが修飾できることがわかった。しかし、条件2 (GTA 処理なし) でも青色発色が認められた。等電点を調査した結果、PBS (pH 7.4 前後) 溶液中では、PDL コートガラス表面は正に帯電しているため、負に帯電しているストレプトアビジンが静電相互作用によって物理的に吸着していることが原因であると推察される。一方、ストレプトアビジンの反応工程を介さずに、タンパク質の吸着防止の目的でウシ血清アルブミン (BSA、負に帯電) をコートすると、ビオチン (負に帯電) の静電吸着が抑制され、青色発色が起こらないこともわかった。また、条件4では、PDL をコートしてないガラス基板 (負に帯電) を用いているため、ストレプトアビジンの静電吸着が抑制され、ビオチンとの反応が起こらずに青色発色が確認できないこともわかった。以上のように、ガラス表面へのストレプトアビジンの修飾条件を明らかにした。

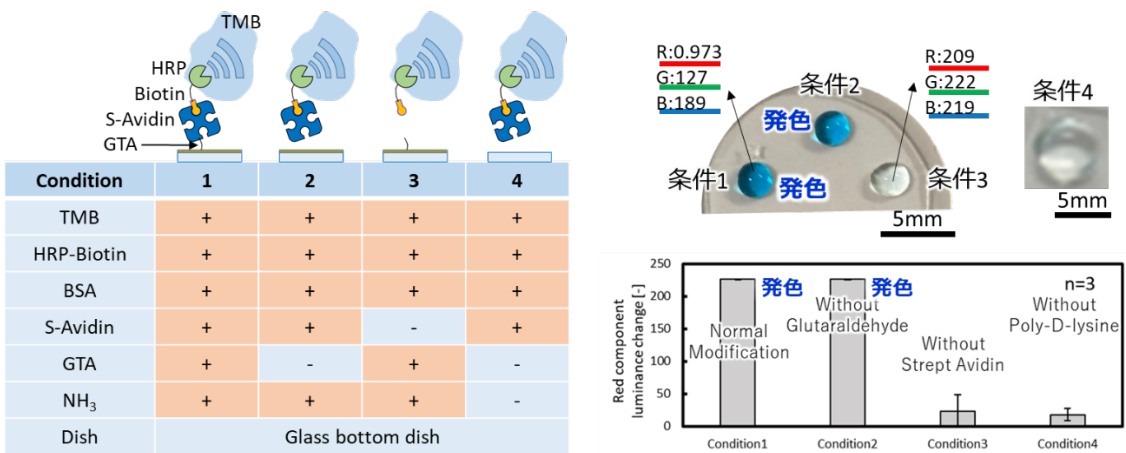


図7 ガラス基板表面へのストレプトアビジン修飾の実験結果

(5) まとめと今後の展望

本研究では、AFM に搭載する新規な機能として、標的となる膜タンパク質を一分子レベルで選択的に分解除去可能な技術の確立を目的として基礎的検討を行った。本提案技術の基礎となる光触媒 TiO₂ プローブの作製プロセスを最適化し、アナターゼ型 TiO₂ プローブを用いた光触媒酸化反応による細胞膜穿孔を実証した。また、作製した Ag プローブの TERS 活性の定量評価手法を確立したことで、実験の信頼性の大幅な向上が図れるようになった。さらに、Ag プローブ表面へのビオチン修飾ならびにガラス表面へのストレプトアビジン修飾の実験プロトコルを確立したことで、抗原抗体反応の高い分子認識機能を援用した一分子計測の実験準備が整った。加えて、取得したラマンスペクトルにおける微弱な信号から特徴量 (分子結合の差異) を高感度に抽出するために、主成分分析 (PAC) の手法を適用した結果、Ag プローブ先端からわずかに露出した Si 成分の検出が可能であることを確認した。今後は、抗原抗体反応過程 (分子認識) およびタンパク質の光触媒分解反応過程 (分子破壊) における分子の結合状態の変化をリアルタイムで可視化することを目指し、ナノ・バイオテクノロジーの発展を支える革新的なプラットフォームを提供する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 筒井舜平, 大道拓斗, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行
2. 発表標題 抗原抗体反応の分子認識機能を援用した膜タンパク質の光触媒ナノ加工技術の開発 ビオチン修飾AgコートAFMプローブの作製と性能評価
3. 学会等名 2022年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

豊橋技術科学大学 機械工学系 マイクロ・ナノ機械システム研究室ホームページ http://mems.me.tut.ac.jp/ 豊橋技術科学大学 教員紹介ホームページ https://www.tut.ac.jp/university/faculty/me/64.html
--

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
---------	---------