

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860025

研究課題名(和文)高感度バイオセンシングを目指した金基板表面における抗体コンジュゲート界面の構築

研究課題名(英文) Fabrication of interface with antibody-polymer conjugates on gold substrate for high sensitive biosensing

研究代表者

笹井 泰志 (Sasai, Yasushi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60336633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水晶振動子マイクロバランス(QCM)によるバイオセンシングにおける抗体の利用効率と分子認識の向上を目的にビニルメチルエーテル-マレイン酸共重合体(VEMAC)を用いた抗体-高分子コンジュゲートを水晶振動子の金電極表面に構築し、その有用性について検討した。水晶振動子の金電極表面へのタンパク質の非特異的な吸着は、VEMACでの表面修飾により効果的に抑制できることを明らかにした。また、C-反応性タンパク質(CRP)の抗体をモデル抗体として、QCMの金電極表面にVEMACを介して固定化することにより、CRPが高感度に定量的に検出できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the fabrication of the polymer-antibody conjugates with high substrate recognition ability in biosensing was investigated. Vinylmethylether-maleic acid copolymer (VEMAC) was used as a polymer for the conjugation and the VEMAC-antibody conjugates were synthesized on the gold electrode of quartz crystal oscillators for quartz crystal microbalance (QCM) biosensing. The VEMAC modification of gold electrode surface effectively suppressed the non-specific adsorption of proteins onto the surface. In the QCM experiments with quartz crystal oscillators modified with VEMAC-anti-C reactive protein (CRP) antibody conjugates, the results suggested that the anti-CRP antibody in the conjugate can quantitatively detect CRP with high sensitivity.

研究分野：物理系薬学

キーワード：バイオセンシング 表面機能化 バイオコンジュゲート 水晶振動子マイクロバランス

1. 研究開始当初の背景

今日、生体内での特異的な分子間相互作用（例えば、抗原-抗体反応や DNA のハイブリダイゼーションなど）を利用したバイオセンサーが創薬ターゲットの探索、各種疾病の診断、および遺伝子関連の研究などにおいて広く利用されている。現在、水晶振動子マイクロバランス (QCM) や表面プラズモン共鳴 (SPR) といった分析原理が、生体分子間の相互作用の検出・解析に応用され、バイオセンシングに利用されている。QCM や SPR のセンサーチップには、一般に金が利用されており、その表面に抗体などのセンサー素子を固定化することにより、基質の特異的検出を可能にしている。

QCM や SPR を利用したバイオセンサーも含め、一般的に、バイオセンサーは測定対象と特異的に相互作用する基質認識部位とその相互作用を電気的信号などに変換する信号変換部からなる。センサー素子となる基質認識部位は、多くの場合、特異的分子認識能を有する抗体などの生体分子が基板表面に固定化された状態となっている。しかしながら、生体分子の分子認識能はその立体構造に強く影響され、たとえば、人工基板に固定化されたタンパク分子は、基板表面との静電的な相互作用、基板との結合に伴う化学修飾あるいは固定化生体分子間での相互作用によって容易に変性してしまう。また、一般的な固定化法では、基板にタイトに固定化されるため、生体分子の配向の制御が困難である。そのため、固定化生体分子は、生体内における溶液状態と比較して、通常、その分子認識能が著しく低下している。一方、そのような分子認識能の低下は、基板表面と生体分子とを繋ぐ、いわゆるインターフェイスを最適化することによって改善できることが知られている。¹⁾

2. 研究の目的

本研究では、QCM や SPR を利用したバイオセンサーの高感度化を目的に、金センサー基板に、生体適合性高分子として知られるビニルメチルエーテル マレイン酸共重合体 (VEMAC) と抗体とのコンジュゲートの導入について検討を行った。図 1 に抗体コンジュゲート界面の概念図を示す。図のように、高い水溶性を持つ VEMAC を介した抗体分子の固定化により、抗体は溶液状態と同様に基質分子を認識できると期待される。また、我々は、VEMAC で修飾した酵素の熱的安定性が劇的に向上することを明らかにしている。²⁾ さらに、VEMAC は、その生体適合性により、タンパク質の吸着抑制効果が期待できる。したがって、金センサー基板表面への VEMAC-抗体コンジュゲートの導入は、抗体分子の熱安定性を向上させるとともに、センサー基板表面への生体試料の非特異的吸着を効果的に抑制することが期待される。

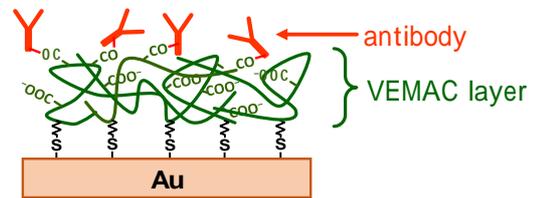


図 1 金センサー基板表面における VEMAC-抗体コンジュゲート界面の概念図

3. 研究の方法

本研究では、QCM を用い、バイオセンシングにおける金センサー基板表面への VEMAC-抗体コンジュゲートの導入の効果について検討した。QCM のセンサー基板である水晶振動子は、水晶の板状結晶を金属薄膜電極で挟んだ構造をしたもので、電極間に交流電場を印加したときに観測される共振周波数が電極表面に吸着および結合した物質の質量に応じて低下することを原理としている。金属薄膜電極としては、高い安定性や化学修飾が容易なことから金がしばしば利用される。

(1) 水晶振動子金電極表面への VEMAC-抗体コンジュゲートの導入 (図 2)

アミノアルカンチオール自己組織化単分子膜 (SAM) 形成による金表面へのアミノ基導入: QCM の水晶振動子をピラニア溶液 (濃硫酸:30%過酸化水素水 = 3:1) で洗浄後、6-amino-1-hexanethiol (6AHT) と 1-hexanethiol (1HT) からなる混合 SAM を水晶振動子の金電極表面に構築した。

表面アミノ化金電極表面の VEMAC 修飾: 表面にアミノ基を導入した金電極表面をビニルメチルエーテル 無水マレイン酸共重合体 (VEMA) のアセトン溶液で処理し、表面アミノ基と VEMA の無水マレイン酸部位との間でのアミド結合形成により、金電極表面へ VEMA を導入した。その後、未反応の無水マレイン酸部位は加水分解し、VEMAC 修飾金電極表面とした。

抗体のコンジュゲーション: モデル抗体として炎症性マーカーの一つである C-Reactive Protein (CRP) の抗体 (antiCRP) を用い、VEMAC のカルボキシル基を活性エステルに変換後、antiCRP 溶液を反応させることで、VEMAC のカルボキシル基と antiCRP のアミノ基間でのアミド結合形成により、金電極表面での VEMAC-antiCRP コンジュゲートを構築した。

(2) 表面分析

金電極表面の修飾状態は、X 線光電子分光スペクトル (XPS) 測定により評価した。

(3) QCM 分析

フロータイプのテフロン製セルに水晶振動子をセットし、6 mL/h での PBS 送液下、試料溶液をインジェクトし、その後の共振周波数の変化を周波数カウンターでモニターした。

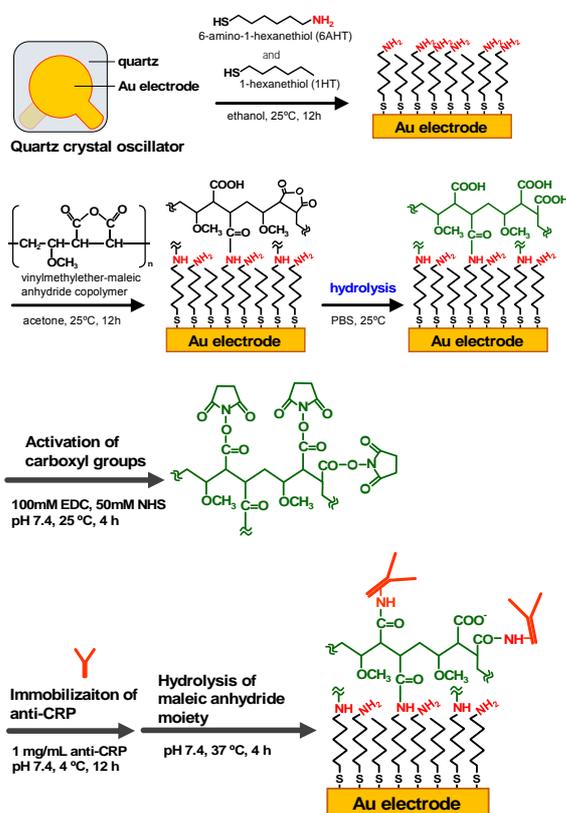


図2 金電極表面での VEMAC-antiCRP コンジュゲート構築の反応スキーム

4. 研究成果

(1) 水晶振動子電極表面への生体成分の吸着抑制における VEMAC の効果

水晶振動子金電極表面の修飾では、まず、6AHT と 1HT の混合 SAM を電極表面に構築したが、6AHT を 80% 以上の比率で反応させて SAM を作成しても、その後、VEMAC で修飾したときのカルボキシル基量に差異は認められなかった。そこで、本研究では、金電極表面に 6AHT : 1HT = 9 : 1 でまず混合 SAM を構築し、その後、VEMAC による修飾を行った。図3は、6AHT : 1HT = 9 : 1 で SAM を作成後、VEMAC 修飾した電極表面の炭素由来の XPS スペクトルを示しているが、SAM 表面では、認められないカルボキシル基の炭素由来のピークが VEMAC 修飾表面では新たに検出され、電極表面が VEMAC で修飾されていることを示している。

この VEMAC 修飾電極表面への生体成分の吸着特性を QCM により評価した。図4は、0.64mg/mL のタンパク質成分を含むウシ血清溶液を試料として、QCM 分析系にインジェクトしたときの共振周波数の変化をモニターした結果を示している。なお、比較の目的で、未修飾、6AHT : 1HT = 8 : 2 で SAM 作成、カルボキシル基表面を調製する目的で 5-carboxy-1-pentanethiol (5CPT) の SAM を作成した水晶振動子を用いた分析も行った。VEMAC 修飾をしたもの以外では、顕著な共振周波数の低下が認められ、電極表面への血清成分の吸着が認められた。一方、VEMAC

修飾表面では、共振周波数の変化は認められず、電極表面への血清成分の吸着が効果的に抑制されていることが示された。また、5CPT の SAM では、血清成分の吸着が認められることから、VEMAC 修飾表面における血清成分の吸着抑制は、高度に水和された VEMAC 層のエントロピー弾性に起因するものと考えられる。

タンパク質吸着抑制効果が報告されている高分子には PEG やベタイン型両性イオン高分子などが知られているが、VEMAC も同様の効果が期待できることが示唆された。

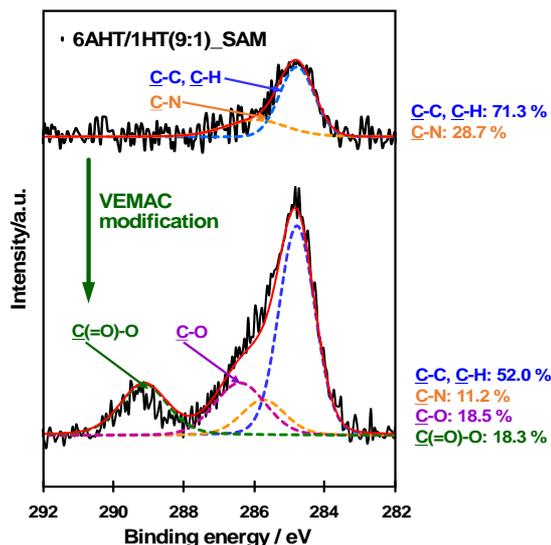


図3 XPS スペクトルとそのデコンボリューション解析結果

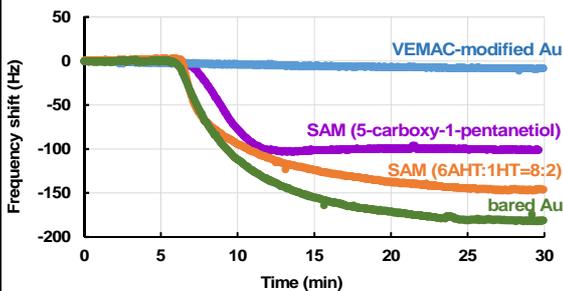


図4 QCM 分析結果

(2) VEMAC-antiCRP コンジュゲートの分子認識能

VEMAC 修飾金電極表面に antiCRP を結合させその分子認識能を評価した。図5は、異なる濃度の CRP を含む PBS 溶液を試料としてインジェクトしたときの、CRP 濃度と共振周波数減少量との関係を示しているが、図に示すように、両者には良好な相関が認められた。したがって、金電極表面に構築した VEMAC-antiCRP コンジュゲートは、高感度にかつ定量的に基質分子を認識することが示唆された。

現在、各種生体成分を含む試料溶液を用いた特異的な基質分子の認識能を評価し、バイ

オセンシングにおける VEMAC-抗体コンジュゲートの有用性を詳細に検証している。

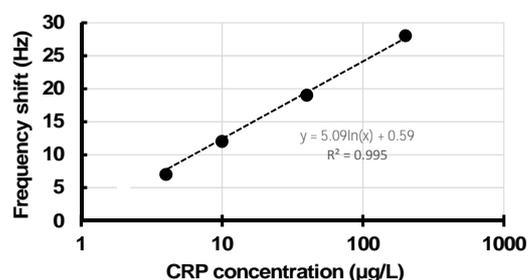


図5 VEMAC-antiCRP コンジュゲートで修飾した水晶振動子を用いた QCM 分析における CRP 濃度と共振周波数変化との相関

<引用文献>

- 1) C. M. Niemeyer et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47** (2008) 9618
- 2) 神野泰旨ほか、日本薬学会第132年会要旨 (30E11-pm03S)、2012

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Y. Sasai, D. Mishima, T. Rikihisa, S. Kondo, Y. Yamauchi, M. Kuzuya, Preparation of enzyme-immobilized filter paper using plasma surface treatment, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 26, 2013, 559, 査読有

[学会発表](計4件)

笹井泰志、三島大史、カク倫美、近藤伸一、山内行玄、葛谷昌之、プラズマ表面処理を利用する酵素固定化濾紙の開発、第30回国際フォトポリマーコンファレンス、2013年6月、千葉

笹井泰志、樋渡ゆりえ、田中岬、近藤伸一、山内行玄、葛谷昌之、マレイン酸含有共重合体修飾トリプシンのプロテアーゼ活性の改善に関する研究、日本薬学会第134年会、2014年3月、熊本

Y. Sasai, H. Kanno, S. Kondo, Y. Yamauchi, M. Kuzuya, Highly stabilized trypsin conjugates with autolysis resistance: Synthesis and evaluation, *ITNano*, 2014年7月、ボストン(米国)

笹井泰志、近藤伸一、山内行玄、葛谷昌之、バイオセンシングを指向したQCM電極の表面修飾に関する研究、日本薬学会第135年会、2015年3月、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 泰志 (SASAI YASUSHI)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60336633