

令和元年6月11日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02315

研究課題名(和文) ペプチドアプタマーを用いた分子認識診断膜およびシステムの設計・開発

研究課題名(英文) Systematic Design of Membrane-based Sensors for Disease Diagnosis

研究代表者

山口 猛央 (YAMAGUCHI, TAKEO)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：30272363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体システムの精緻で高度な制御機構から発想して、多孔質膜細孔内を反応場として有効利用した、新しい簡易医療診断用機能膜システムを設計・開発した。本課題で開発したプラズマグラフト重合により作製した膜型センサは、膜細孔内に標的タンパク質を認識するセンサー部位を、高密度かつ均一に有していることを示した。反応場である膜細孔内に、対流により積極的に標的タンパク質溶液を透過させることで、この膜型センサは、高い感度及び選択性を有するにもかかわらず、測定時間を従来の検出技術よりも大幅に短縮することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で開発した独自のプラズマグラフト重合により、センサー部位の種類によらず高密度かつ均一にセンサー部位を膜細孔内に導入することが可能となった。また、開発した膜型センサは、現在主流の技術であるELISAを超える感度および高い選択性を有するにもかかわらず、測定時間をELISAの1/6の35分までに短縮できることを実証し、後期高齢化社会でニーズが高まっている、家庭などその場で迅速に病気の検査を行う、Point-of-Care診断への利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed membrane-based sensors whose pore space is effectively utilized as a reaction space for disease diagnosis. Using our developed plasma graft polymerization technique, sensor moieties such as antigen were homogeneously and densely introduced into pore surfaces inside a porous membrane. This membrane sensor showed higher sensitivity and selectivity compared with conventional ELISA and the total measurement time was shortened to 1/6. This rapid, selective, and sensitive membrane sensor is expected to be an ideal candidate for Point-of-Care Testing devices.

研究分野：化学工学

キーワード：診断膜 生体分子認識 微小細孔内 膜透過 プラズマグラフト重合

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人工膜は一定の分離性能を示す機能材料であるが、生体膜では機能を能動的に変化させ、特に分子の認識をトリガーとして構造を変化させ、情報の出力、物質の選択透過を行い、生体システム全体の維持を行っている。このような生体システムの精緻で高度な制御機構を応用すれば、新しい簡易分析や医療用の機能膜への展開が期待される。

### 2. 研究の目的

多孔質膜におけるナノスケールの均一細孔には、その高い比表面積や、対流による物質拡散律速の解消といった利点を有する。本研究は、生体システムの精緻で高度な制御機構から発想して、膜細孔内を反応場として有効利用した、新しい簡易医療診断用機能膜システムの設計及び開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細孔内へのセンサー部位高効率導入法の開発

ペプチドアプタマーをはじめとするセンサー部位を多孔質基材の細孔内に高効率にグラフト固定する方法の開発を行った。多孔質ポリエチレン基材の細孔表面にプラズマグラフト重合法で N-isopropylacrylamide (NIPAM) と glycidyl methacrylate (GMA) の共重合体を固定化し、続く開環反応と Click 反応によって GMA 中のエポキシ基を分子認識部位のモデル化合物であるビオチンに変換した (Fig. 1)。

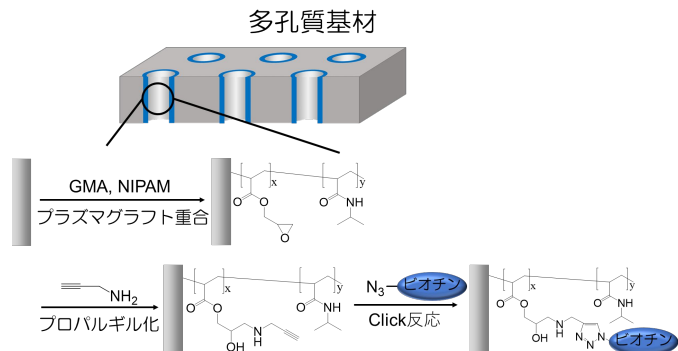


Fig. 1 多孔質基材細孔内へのセンサー部位高効率導入法

#### (2) 高感度化に向けたタンパク質認識法の検討

これまで我々が開発してきた診断膜は、標的タンパク質溶液へ膜を浸漬する認識法(含浸法)により、センサー部位と標的タンパク質の架橋形成と温度刺激を組み合わせ、細孔閉塞法を用いた<sup>1)</sup>。対流を使って標的分子を膜細孔内へ導入することができれば、標的分子とセンサー分子の接触頻度が向上し、感度が大幅に改善されることが期待される。そこで、(1)で作製した膜に対して、モデル標的タンパク質であるアビジンを透過させることで、細孔内に標的分子を積極的に送り込む新しい分子認識法(透過法)を検討した。コントロールとしてウシ血清アルブミン (BSA)を用い、一定流速に対する供給圧の変化を装置内の圧力センサーによって測定した。

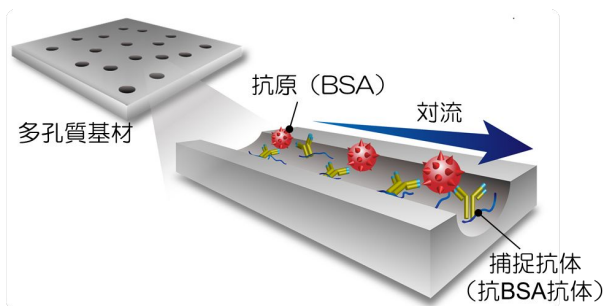


Fig. 2 診断用膜型センサの概略図

#### (3) 診断用膜型センサの開発

センサー部位をより汎用性の高い抗体とし、(2)で検討した透過法を利用した、膜細孔内を抗原抗体反応場とする膜型センサの構築を目指した(Fig. 2)。モデル抗原として BSA を用いることとし、(1)で開発した方法で抗 BSA 抗体を化学的に固定した膜を作製し、溶液透過により酵素免疫測定法 (ELISA) と同様の反応を行うことで、分子検出試験を行った。コントロールとして、ヒト血清アルブミン

(HSA)を含有する BSA 溶液を用いて同様の分子検出試験を行った。

### 4. 研究成果

(1) FT-IR と重量変化により、90%と高効率にビオチン部位が導入できており、ゲート膜作製に成功したことが確認された。GMA はプラズマグラフト重合法により均一にグラフトすることが可能で、GMA 中のエポキシ部位は反応性に富んでおり、様々な官能基に変換可能である。センサー部位の導入に、Click 反応をはじめとする、高い収率や官能基選択性を実現する反応を利用することができる。従って、本法によって、センサー部位をその種類によらず、均一かつ高効率に導入した膜の作製が可能になった。

(2) 透過法を用いることで、アビジンの特異的認識により温度刺激や架橋なしで自然と細孔が閉じていくことを確認し、従来の細孔閉塞法とは異なり、より簡便かつ迅速に診断可能であることを実証した。供給側圧力で規格化した透過流速の逆数を透過抵抗 R と定義し、従来の含浸法と R 値の比較を行った。含浸法での BSA 透過後とアビジン透過後における R 値の比は約

2倍であるのに対し (Fig. 3a)、透過法における比は約30倍と高い差が示され (Fig. 3b)、透過法を用いることで高感度なセンシングが達成可能であることを示した。これは、細孔内にアビジン分子を積極的に透過させることにより、溶液中・膜細孔内の拡散律速が解消され、細孔内のビオチンにアクセスしやすくなったためと考えられ、透過法の有用性を実証した。

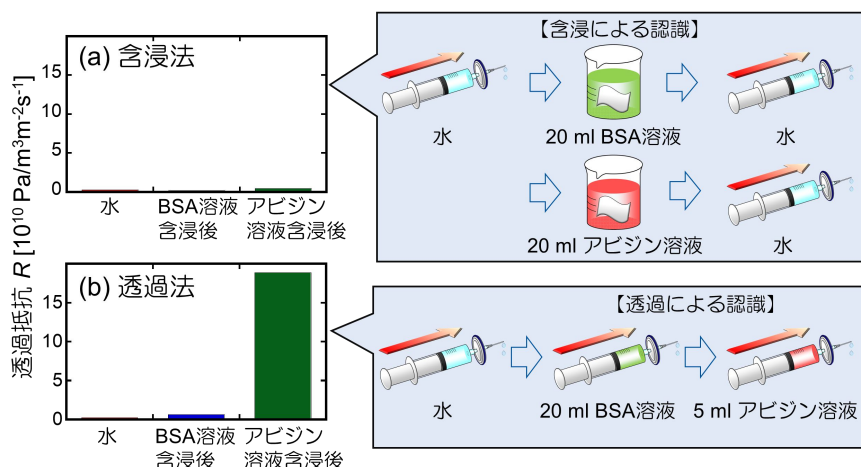


Fig. 3 (a)含浸法と(b)透過法における透過抵抗の比較

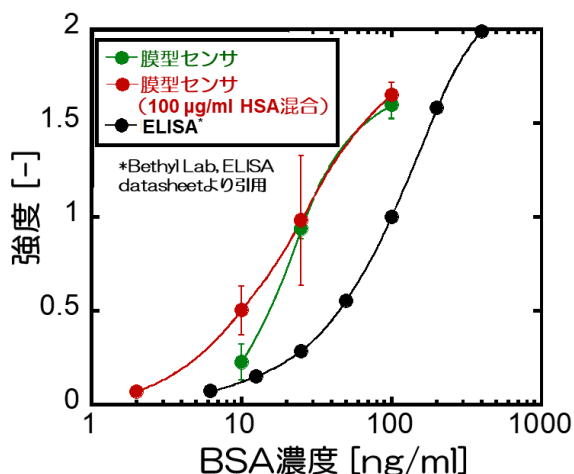


Fig. 4 膜型センサとELISAにおける分子検出試験 (ELISAのデータは、Bethyl Lab, ELISA datasheetより引用)

(3) (1)で構築したセンサー部位導入法を応用して、多孔性高分子基材の細孔表面に抗BSA抗体を、高分子グラフト鎖を介して、高密度かつ均一に化学固定することに成功した。この膜型センサは、現在主流の酵素免疫測定法 (ELISA) を超える感度および高い選択性を有するにもかかわらず (Fig. 4)、測定時間をELISAの1/6の35分までに短縮できることを実証した。これは、抗体を高密度かつ均一に固定した微小細孔内で、検体が細孔を流れる膜透過によって効率よく抗原抗体反応が起こったことに加え、グラフト鎖がタンパク質の非特異的吸着を抑制する効果を有するため、ELISAでは必要なブロッキングプロセスを省略できたためである (Fig. 5)。本膜型センサは、検査に長い時間を要するELISAの課題を解決しうるものであり、急性心筋梗塞の診断をはじめとする Point-of care

testingに向けた有効な手法になると考えられる。

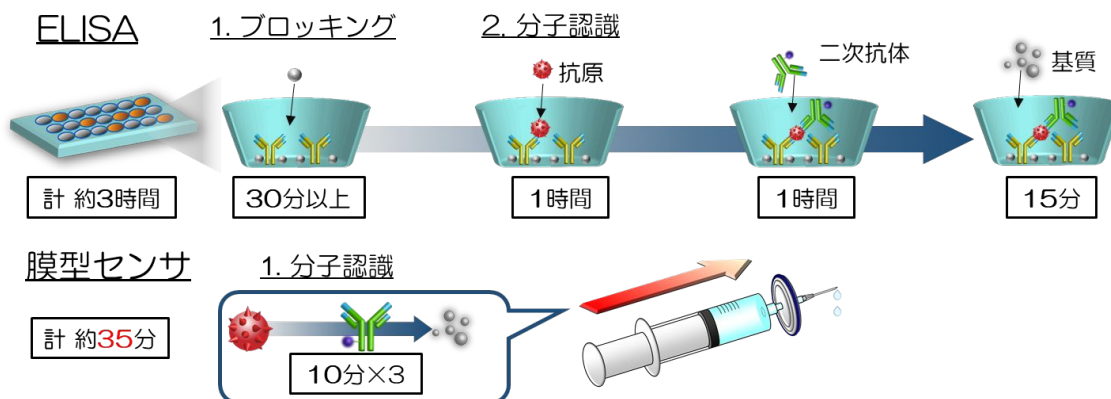


Fig. 5 膜型センサとELISAの操作時間の比較

#### 引用文献

1) Hidenori Kuroki, Taichi Ito, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi, Biomolecule-Recognition Gating Membrane Using Biomolecular Cross-Linking and Polymer Phase Transition, *Anal. Chem.*, **83**(24), 9226–9229 (2011).

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, Development of an aptamer-functionalized molecular recognition gating membrane targeting a specific protein on the basis of the aggregation phenomena of DNA-PNIPAM, *Polymer*, **62**, 86–93 (2015). 査読有
2. Yuhei Oshiba, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Hidehiko Hirakawa, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune, Takeo Yamaguchi, Correlation between the activity and molecular structure around the active center of cytochrome P450cam conjugates, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **49**(5), 475–480 (2016). 査読有
3. Hidenori Ohashi, Xueqin Chi, Hidenori Kuroki, Takeo Yamaguchi, Response Sensitivity of a Gating Membrane Relevant to Grafted Polymer Characteristics, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **55**, 1575–1581 (2016). 査読有
4. Seiichi Amamiya, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, Non-equilibrium thermodynamic model of a highly permeable forward osmosis membrane, *J. Chem. Engr., Japan.*, **50**(8), 618–631 (2017). 査読有
5. Hiroto Okuyama, Yuhei Oshiba, Hidenori Ohashi, and Takeo Yamaguchi, Control of Target Molecular Recognition in a Small Pore Space with Biomolecule-Recognition Gating Membrane, *Small*, **14**(18), 1702267 (2018). 査読有

〔学会発表〕(計61件)うち招待講演9件

1. Takeo Yamaguchi, Advanced membranes inspired from bio-systems, University Essen Duisburg Colloquium, July 7th, 2015, University Essen Duisburg, Germany. 【招待講演】
2. 山口猛央, システム的思考で材料機能を設計・開発～分離膜から燃料電池材料まで～, 日本脱塩協会特別講演会, 2015年7月17日, 東レ(株)本社, 東京【招待講演】
3. 山口猛央, 海水淡水化 FO 技術: FO 技術が有効となる条件, 2016JDA フォーラム～世界の最先端有機高分子膜技術とその実用化～, 2016年1月28日, 東京ビックサイト, 東京【招待講演】
4. 山口猛央, 生体システムから発想した機能膜: 膜材料の階層構造と機能発現, 日本膜学会 第38年会, 2016年5月11日, 早稲田大学 西早稲田キャンパス, 東京【招待講演】
5. 山口猛央, 機能膜のシステム設計～エネルギーから水処理まで～, 日本化学会 第97春季年会, 2017年3月16日, 慶應義塾大学 日吉キャンパス, 神奈川【招待講演】
6. Takanori Tamaki, Systematic Material Design for Enzymatic Biofuel Cells, 2017 AIChE Annual Meeting, Nov. 2nd, 2017, Convention Center, Minneapolis, MN USA. 【招待講演】
7. Takeo Yamaguchi, Systematic Membrane Design for Fuel Cells, Bio-inspired Materials and Desalination process, 11th conference of the Aseanian Membrane Society (AMS11), July 7th, 2018, The Rydges Hotel, Brisbane Southbank, Australia 【招待講演】
8. 田巻孝敬, パイオ燃料電池酵素電極の材料システム設計, 第28回日本MRS年次大会, 2019年12月18日, 北九州国際会議場, 福岡【招待講演】
9. Takeo Yamaguchi, Functionalized Membranes for Fuel Cells, Bio-inspired Materials and Water Purification, Intelligent Surfaces and Materials Joint Workshop RWTH Aachen University and Tokyo Institute of Technology, Mar. 21st, 2019, RWTH Aachen University, Germany. 【招待講演】

〔図書〕(計1件)

1. 菅原勇貴, 山口猛央, 刺激応答性高分子ハンドブック 第5章・第6節「分子認識ゲート膜とその展開」, 株式会社 エヌ・ティー・エス, p. 714–722 (2018).

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 複合体の検出方法、並びにそれに用いる担体及び検出キット

発明者: 山口猛央、大柴雄平、奥山浩人

権利者: 国立大学法人東京工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2019-004554

出願年: 2019年

国内外の別: 国内

〔その他〕

・東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 分子機能化学領域 山口・田巻研究室ホームページ

<http://www.res.titech.ac.jp/~zairyosys/yamaguchilab/index.html>

・東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所ホームページ「最新の研究」疾患診断に向けた生体分子認識ゲート膜の汎用化・高感度化

<http://www.res.titech.ac.jp/news/research/201802yt.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

大橋 秀伯 (OHASHI Hidenori)

東京農工大学・大学院工学研究院・特任准教授

研究者番号：00541179

大柴 雄平 (OSHIBA Yuhei)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：10708530

田巻 孝敬 (TAMAKI Takanori)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：80567438

菅原 勇貴 (SUGAWARA Yuuki)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：10814791

### (2)研究協力者

無し

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、研究者個人に帰属されます。