

令和元年6月12日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04928

研究課題名(和文) ナノ表面構造制御による高感度バイオセンサの開発

研究課題名(英文) Control of Nano-structure Surface for Highly Sensitive Biosensors

研究代表者

大貫 等 (OHNUKI, Hitoshi)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：60223898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高感度かつ再生可能なバイオセンサの開発を目的として、プロテインGによる抗体固定を利用したバイオセンサの開発を行った。プロテインGはIgG抗体と特定の方向で特異結合するタンパク質である。中性溶液中でこの結合は維持されるが、酸性溶液中ではその結合を絶つ。この特性を利用し、プロテインGを介して抗体を固定することで、分子方位を揃えた抗体表面を有したミオグロビンセンサを開発した。その結果、従来のセンサに比べ3倍以上のシグナル強度を示すセンサを得た。また、グリシン溶液への浸漬を行うことでセンサの再生が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞は発症後すぐに病院で治療を受けた際の死亡率が10%以下だと言われている。つまり、心筋梗塞による死者を減らすには早期発見が非常に重要となる。この早期発見において注目されている物質がミオグロビンである。本研究では、ミオグロビン等の疾病の進行に伴い急増するバイオマーカーを、高感度でその場測定する手法としてバイオセンサの開発を行った。さらに、本研究で開発されたセンサの再生技術を組み合わせれば、1回計測あたりの経費節減とセンサ作製時間の短縮が可能となる。このような高感度バイオセンサは、将来の予防医療分野の発展を促進し、健康福祉社会の実現に大きく貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：We developed novel biosensors which have antibody oriented surface together with regenerable feature. We employed Protein G as a receptor. The Protein G selectively binds to the IgG type antibody with keeping a fixed molecular direction under a neutral pH condition, but it cuts the bind under a low pH condition. Accordingly, the antibodies captured by the Protein G are oriented on the surface, exposed their sensing portion to the outside. In this study, the anti-myoglobin antibodies were immobilized on Protein Gs to form a myoglobin biosensor. The obtained myoglobin biosensor showed 3 times larger intensity and the regenerable property.

研究分野：有機薄膜工学

キーワード：バイオセンサ 免疫センサ 抗原抗体反応 配向制御 電気化学インピーダンス法 ミオグロビン 心筋梗塞

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

1. 研究開始当初の背景

日本の年間死亡者の主な死因は、悪性新生物、急性心筋梗塞、脳卒中が全体の 50% 以上を占めている。特に心筋梗塞は発症後いかに早く治療を受けるかが鍵となっており、発症後すぐに病院で治療を受けた際の死亡率は 10% 以下だと言われている。つまり、心筋梗塞による死者を減らすには早期発見が非常に重要となる。この心筋梗塞の早期発見のために注目されている物質がミオグロビンである。ミオグロビンはヒトの筋肉中に存在している色素タンパク質で、筋細胞が崩壊する際に細胞外へ逸脱し、血液中へ流入する。心筋梗塞を発症すると体内のミオグロビン濃度が上昇するため、このミオグロビン濃度を測定することにより心筋梗塞の早期診断を行うことができる。

2. 研究の目的

本研究ではミオグロビンを測定対象としたミオグロビンバイオセンサの開発を行った。ミオグロビンは抗ミオグロビン抗体と特異的に吸着する抗原抗体反応を行うことが知られている。すなわち、抗ミオグロビン抗体を固定化した電極をミオグロビン溶液中に浸漬すると、ミオグロビンは抗ミオグロビン抗体にのみ吸着する。この吸着反応は、抗体の特定の反応部位で起こることから、抗体の配向が反応活性に大きく影響すると考えられる。本研究では、この影響を調べるため、電極上に Protein G を固定化して抗ミオグロビン抗体を揃えたミオグロビンセンサ(図 1a)と、電極上に直接抗ミオグロビン抗体をランダムに固定化したミオグロビンセンサ(図 1b)を作製し、電気化学測定を用いてセンサ特性の違いを検証することを目的とした。

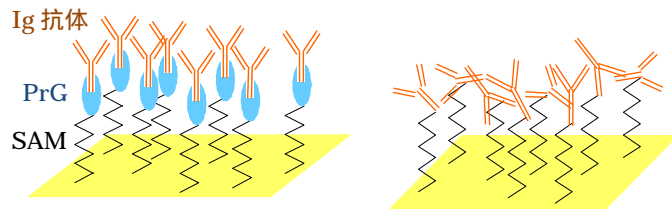


図 1 (a) 配向性試料, (b) ランダム試料の模式図

さらに、一度使用したセンサの再生技術を開発し、1 測定当たりの費用を抑えることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 抗体の配向制御

本研究では、抗体を電極上に固定化する際の配向制御の有無により、センサ特性の違いを比較した。抗ミオグロビン抗体は免疫グロブリン G (IgG) 抗体の一種である。図 2 の IgG 抗体において可変部は抗原と相互作用する部位であり、ミオグロビンはここに結合する。一方、定常部は、連鎖球菌の細胞壁に存在するタンパク質である Protein G と特異的に結合することが知られている。この Protein G の定常部への結合特性を利用し、Au 電極と抗ミオグロビン抗体の間に Protein G を固定化することで、抗ミオグロビン抗体の配向を揃えることができる(図 1)。

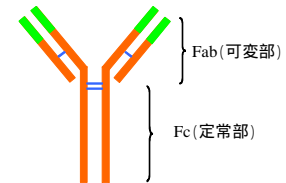


図 2 IgG 抗体

Protein G はくし形 Au 電極上に形成された 11-Mercaptoundecanoic Acid と 6-Mercaptohexanol を 1 : 9 混合自己組織化膜に化学結合させることで電極表面に固定した。

(2) 電気化学インピーダンス法

測定には電極反応の解析に広く用いられている電気化学インピーダンス(EIS)法を使用した。測定装置には電気化学アナライザ PGSTAT128N (Autolab, Netherlands) を用いた。EIS 法は測定対象に様々な周波数の交流電圧を印加し、応答電流を解析することで、測定対象の電気的なパラメータを求める手法である。バイオセンサへ適用する利点として、熱的・化学的に脆弱な生体物質の非破壊測定が可能、コストと手間のかかる標識を必要としないこと、比較的短時間で測定が可能なが挙げられる。

(3) 微細加工くし形電極

EIS 法を含む電気化学測定においては、隣り合ったバンド電極に異なる電位を印加し、可逆性の高い酸化還元種を酸化還元することで、電極間での物質移動を介した電流電圧特性を得ることができる。この特性を利用し、異なる電位を有するバンド電極を交互に多数配列したものがくし形電極である(図 3)。一方を陽極として活性種の酸化反応を行い、もう一方を陰極として酸化生成物の還元反応が行われることで、系を流れる電流が発生する。このとき電極間での活性種の拡散現象が律速となっており、くし形電極では拡散距離が極めて短いため、酸化還元サイクルの高速化がなされ、高効率な信号変換が可能となる。本研究では高感度検出のためこのくし形電極を使用した。

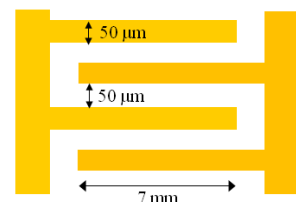


図 3 本研究で用いたくし形電極

4. 研究成果

(1) 評価方法

溶液中に浸漬した試料の等価回路を図 4 に示す。電極と溶液の異相界面では各相の内部電位の差から界面電位差が生じる。特に溶液側には電気二重層が形成されるため、大きな電気容量成分 (C_{dl}) を持つことになる。また、電極/溶液界面において電荷をやりとりする際、界面近傍の吸着分子の有無や表面粗さなどにより、電荷移動を阻害する因子である抵抗成分が生じる。これは電荷移動抵抗 (R_{ct}) と呼ばれ、その値は抗体などの分子吸着過程に伴って大きく変動することが知られている。そこで本研究では主に R_{ct} を評価することで電極表面への分子吸着量を求めた。以下では、横軸としてインピーダンスの実数成分を、縦軸として負の虚数成分をとるナイキストプロットで EIS スペクトルを示す。この表記法によると図 4 の等価回路は半円状のプロファイルを示し、 R_{ct} 値はその直径に相当する。なお図中の R_s は溶液自身の抵抗成分である。

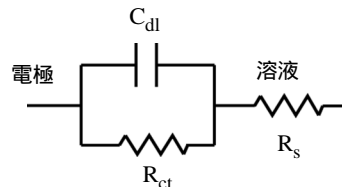


図 4 試料表面の等価回路

(2) 表面修飾過程の検証

EIS 測定は、試料を 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ を含む緩衝溶液中 (pH 7.6) に浸漬し、振幅電圧 10 mV、周波数 1 Hz - 100 kHz の正弦波電圧を印加して応答交流電流を測定した。

SAM 成膜表面、Protein G 固定化、BSA ブロッキング、抗ミオグロビン抗体固定化の各プロセス後の試料について EIS 測定を行った。測定結果を図 5 に示す。SAM 成膜後に Protein G を固定化すると、半円状のプロファイルの直径に相当する R_{ct} は減少することが分かる。これは、SAM 表面においては溶液中の電荷の担い手である $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ と SAM (MUA 分子) の末端基である COO^- との間に静電的な斥力が働き、これが大きな抵抗となるためである。一方、Protein G は電気的に中性に近い分子であるため、SAM 表面に固定化されると相対的に斥力が減少し、 R_{ct} の減少をもたらす。BSA ブロッキング後、抗ミオグロビン抗体後の試料では共に R_{ct} が上昇している。これは、かさ高い生体分子の吸着により電極と $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ との電荷移動が阻害されるためである。これら一連の R_{ct} の変化は表面修飾過程とよく対応しており、このことから表面修飾が適切に行われていることが分かった。

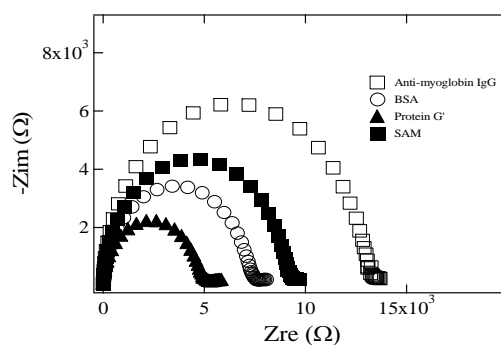


図 5 表面修飾過程での EIS 変化

(3) 配向性試料によるミオグロビンセンサ

配向性試料を 25 の異なる濃度のミオグロビン溶液 (0.001 ng/mL - 1000 ng/mL) に 30 分間浸漬し、電極表面で抗原抗体反応を行わせた。その後、EIS 測定溶液中で複素インピーダンスを測定することで、図 6 に示すナイキスト線図を得た。この図から分かるように、ミオグロビン濃度を増加するとともに半円の大きさが増大した。これは、濃度に応じたミオグロビンが抗原抗体反応により電極上に吸着し、この分子吸着が電極表面と $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ の電荷移動を阻害して R_{ct} の増加をもたらしたものと考えられる。また、反応は 10 ng/mL 付近で止まった。これは抗ミオグロビン抗体の反応サイトがすべてミオグロビンと結合し、これ以上のミオグロビンが吸着するサイトがなくなったためである。

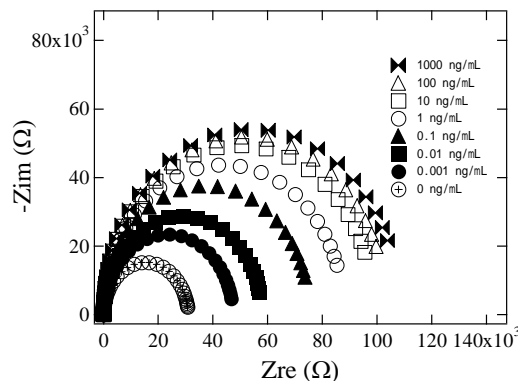


図 6 配向性試料のミオグロビン濃度による EIS スペクトル変化

(4) ランダム試料によるミオグロビンセンサの評価

上記の配向性試料と同様の条件で、抗ミオグロビン抗体の配向を揃えていないランダム試料の測定を行った。図 7 に結果を示す。配向性試料と同

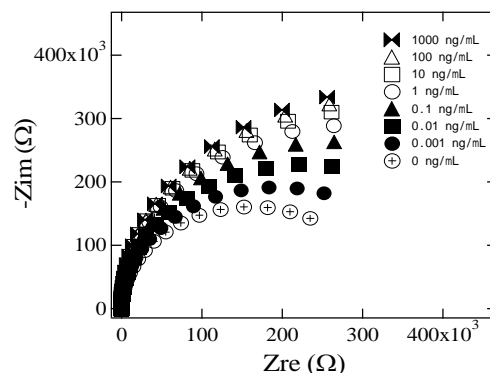


図 7 ランダム試料のミオグロビン濃度による EIS スペクトル変化

様に、本試料でもミオグロビン濃度の上昇に伴って R_{ct} が増加する。しかし本試料の R_{ct} はその初期値が大きく、また相対的な変化量も小さい。一方 100 ng/mL 以上のミオグロビン濃度で R_{ct} の増加が停止する。これは、配向性試料と同様に、100 ng/mL 付近で抗ミオグロビン抗体の反応サイトが全てミオグロビンと結合した為である。

(5) センサ特性の比較

得られた結果を用い、抗体の配向制御の有無によるセンサ特性の比較を行った。図 8 はミオグロビン濃度変化に対する R_{ct} 変化率 (R_{ct}/R_0 : R_0 は R_{ct} の初期値) を示したものである。配向性試料とランダム試料を比較すると、配向性試料では R_{ct} の増加割合が約 3 倍大きい。これは抗ミオグロビン抗体の配向を揃えることで、ミオグロビンの吸着反応が行われやすくなり、 R_{ct} の増加割合が増したものと考えられる。またランダム試料はミオグロビン吸着の飽和濃度が一桁大きい。これは、配向性試料がミオグロビンと一斉に抗原抗体反応を行うのに対し、ランダム試料では様々な方向を向いた抗体が存在するため、ミオグロビンに対する反応のしやすさに分布があり、高濃度下でも活性な吸着サイトがある程度残っているからであろうと推定される。

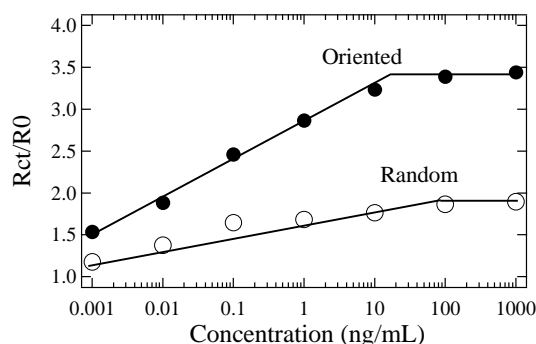


図 8 配向性試料およびランダム試料のミオグロビン濃度に対する電荷移動抵抗値の増加率

(6) センサ再生技術の開発

これまでの研究で高感度かつ高い選択性を持つミオグロビンバイオセンサの開発に成功した。しかし、開発したセンサは再利用できないという問題点があった。そこで、本研究では再生可能なセンサの開発をすべく Protein G の特性に着目し、センサの再生を試みた。Protein G はこれまでの研究で示されるように、IgG 抗体の方位を揃えて特異結合するタンパク質である。中性溶液中でこの結合は維持されるが、酸性溶液中ではその結合を絶つ特性を持つ。この特性を利用し、Protein G を介して抗ミオグロビン抗体 (IgG 抗体) を固定した試料を作製した。再生時には酸性溶液中で抗ミオグロビン抗体を Protein G から脱離させ、新たな抗体を固定することでセンサの再生を行った (図 9)。なお、酸性溶液はグリシン溶液を使用した。

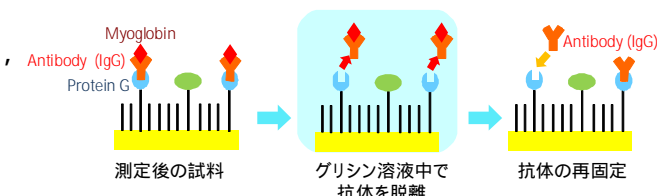


図 9 センサ再生の概略図

再生前後のセンサ特性を図 10 に示す。横軸にミオグロビン濃度、縦軸に再生前の R_{ct}/R_0 の最大値を 1.0 とした相対値をとっている。再生前のセンサ特性ではミオグロビン濃度に対して上昇率が線形的に上昇し、10 mg/mL 以降で変化が止む。再生後のセンサ特性は再生前のセンサ特性と同様のふるまいを示すことが確認できた。この結果はグリシン溶液で抗体を脱離させ、新たな抗体を再固定することで再生前と同様のセンサを作成することが可能であることを示唆している。しかし、再生前より R_{ct}/R_0 の変化割合が 0.7 程度にとどまっている点については、グリシン溶液による Protein G の変性が示唆される。そのため、再生時でのグリシン浸漬条件 (濃度、浸漬温度、浸漬時間) の最適化を施すことで、センサ特性の劣化を抑えることができると期待される。

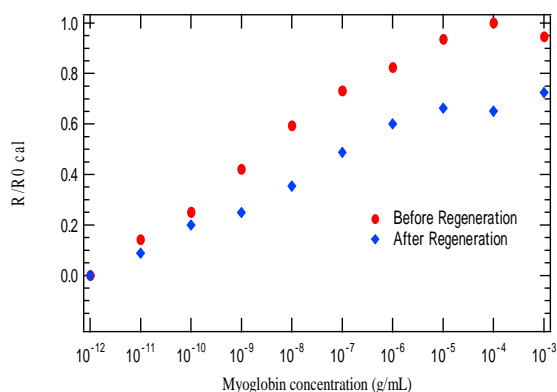


図 10 再生前後のミオグロビンセンサ特性

<引用文献>

S. Sallach, R. Nowak, M. Hudson, G. Tokarski, N. Khoury, M. Tomlanovich, G. Jacobsen, J. Lemos and J. McCord, "A change in serum myoglobin to detect acute myocardial infarction in patients with normal troponin I levels", Am. J. Cardiol., 査読有, Vol. 94, 2004, 864-867.

B. Akerstrom, T. Brodin, K. Reis, and L. Bjorck: "Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies", J. Immunol., 査読有, Vol. 135, 1985, 2589-2592.

J. S. Daniels and N. Pourmand: "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges", *Electroanalysis*, 査読有, Vol. 19, 2007, 1239-1257.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Hitoshi Ohnuki, Takuya Wako, Barbara Mecheri, Haiyun Wu, and Hideaki Endo, "Self-Powered Hydrogen Peroxidase Sensor and Its Biosensor Application", *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, 2019, SBBG16-1 - SBBG16-7
DOI: 10.7567/1347-4065/ab01d2

Kaiki Tsugimura, Hitoshi Ohnuki, Haiyun Wu, Hideaki Endo, Daiju Tsuya, and Mitsuru Izumi, "Oriented antibody immobilization on self-assembled monolayers applied as impedance biosensors", *Journal of Physics: Conference Series*, 査読有, 2017, 012015
DOI: 10.1088/1742-6596/924/1/012015

Kaiki Tsugimura, Hitoshi Ohnuki, Hideaki Endo, Daiju Tsuya, and Mitsuru Izumi, "Protein G based human immunoglobulin G biosensor by electrochemical impedance spectroscopy", *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol. 55, 2016, 02BE06-1 - 02BE06-4
DOI: 10.7567/JJAP.55.02BE06

[学会発表](計 6 件)

藤城 志遥, 大貫 等, 津谷大樹, 呉 海雲, 遠藤 英明, 櫛形電極ミオグロビンバイオセンサの再生技術の探索, 第 66 回応用物理学会春季学術講演会 (2019 年 3 月 10 日, 東京工業大学 大岡山キャンパス)

日下 裕介, 大貫 等, 津谷 大樹, 呉 海雲, 遠藤 英明, マイクロギャップ平行平板電極を用いた IgG インピーダンスバイオセンサ, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会 (2018 年 3 月 17 日, 早稲田大学 理工学部)

大貫 等, 日下 裕介, 次村 海輝, 抗体配向制御によるミオグロビンセンサの高感度化, 電気学会 誘電・絶縁材料研究会 (2017 年 7 月 28 日, 富山大学 工学部)

K. Tsugimura, H. Ohnuki, Y. Kusaka, H. Endo, H. Wu, M. Izumi, and D. Tsuya, "Oriented Antibody Immobilization on Self-assembled-monolayer Applied for Biosensing Application", 12th International Conference on Nano-Molecular Electronics (14-16 December 2016, Kobe)

K. Tsugimura, H. Ohnuki, D. Tsuya, H. Endo, and M. Izumi, "Myoglobin impedance immunosensing with oriented anti-body immobilization", *Biosensors 2016* (25-27 May 2016, Gothenburg, Sweden)

H. Ohnuki, K. Tsugimura, Y. Kusaka, H. Wu, H. Endo, D. Tsuya, and M. Izumi, "Electrochemical impedance spectroscopy biosensor for the detection of immunoglobulin G: the effect of mixed self-assembled monolayer", *Biosensors 2016* (25-27 May 2016, Gothenburg, Sweden)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~ohnuki/140626/index.html>

6. 研究組織

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。