

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19550147

研究課題名 (和文) ナノレベルで構造規制したバイオインターフェースの構築と機能制御

研究課題名 (英文) Fabrication of nano ordered / functional biointerface on the gold surface

研究代表者 佐藤 縁 (YUKARI SATO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員

研究者番号：40357132

研究成果の概要：本研究の目的は、水素結合や分子間力相互作用を中心とする生体分子間の弱い相互作用を検出するための方法の確立と、弱い相互作用を利用したインテリジェントな分子認識表面の構築を行うことにある。2007 年度は主に認識分子と非特異吸着抑制分子混合膜によるタンパク質認識最適条件の探索についての研究を進め、2008 年度は、非特異的な吸着をより効率よく抑えるための分子設計とこの単分子層の持つ機能の評価、タンパク質認識の実証を中心に研究を進めた。認識部位を膜を構成する分子全体のうちの 30%以下に押さえ、これを分散させることにより高感度タンパク質認識が可能になることを見いだした。また認識分子以外の膜構成分子について、非特異吸着抑制効果を深く検討し、実際に認識膜構築の際に導入することで、従来の表面よりノイズ応答を低く抑えた検出が可能になることを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

バイオインターフェース、糖鎖、自己組織化膜、金電極、電気化学計測、表面プラズモン共鳴、非特異吸着抑制、分子認識

1. 研究開始当初の背景

タンパク質・ウイルス・細胞などをリアルタイムに感度よく検出する手法の開発が望まれているが、生体分子間の多彩な認識

機構・機能発現は、分子間力相互作用や水素結合を中心とする弱い相互作用が中心的な役割をしており、これらは強固な化学結合に有効である従来の分析手法では検出す

ることが非常に困難である。生体分子の検出は現在、蛍光法を中心とする方法が主体となっている。蛍光法は分子検出に十分に高感度な測定手法ではあるが、一方で目的分子との間の結合が起こると起こらずとに関わらず蛍光を発するためどうしても検出精度に問題が残る。蛍光法を用いず、水素結合を中心とした弱い相互作用を、本当に相互作用能があるときのみその場で正確に評価したいという考えに基づき、我々は表面増強赤外分光法と電気化学法を組み合わせた核酸塩基の検出をスタートさせていた (Y. Sato et al., "In Situ Surface-Enhanced Infrared Study of Hydrogen Bond Pairing of Complementary Nucleic Acid Bases at the electrochemical Interface, *Anal. Chem.*, 76, 5564-5569 (2004)). 目的分子のみを高感度に検出するためには非特異的な吸着を出来る限り抑える方法を同時に検討する必要がある。これまでも表面に親水性の高分子を塗布し阻害物質の吸着を抑制する試み (J. Wang et al., "Enhanced Selectivity and Sensitivity of First-Generation enzyme Electrodes Based on the Coupling of Rhodinized Carbon Paste Transducers and Permselective Poly(o-phenylenediamine) Coatings" *Electroanalysis*, 8, 1127-1130 (1996) 他) や、機能性部位 (糖鎖部位、一本鎖 DNA) を表面にまばらに吸着させることにより、認識のための十分な自由空間を確保することにより分子認識能を高めた例 (E. A. Smith et al., "Surface Plasmon Resonance Imaging Studies of Protein-Carbohydrate Interactions", *Journal of the American Chemical Society*, 125, 6140-6148 (2003), M. Nakayama et al., "DNA sensors using a ferrocene-oligonucleotide conjugate", *Talanta*, 56, 857-866 (2002). 他) があった。

生体分子間の相互作用を検出するためには、生体膜で行われている高選択的な分子認識を手本にし、最適な膜構造を人工的に設計し、認識部位の膜内での配置を工夫すると同時に非特異的な吸着をできるだけ抑えるなど、認識膜としての設計に基づき結果を積み上げていく必要がある。人工的な膜修飾表面における生体分子認識には以下の課題が存在していた。

(1) 水素結合を中心とする、弱い生体分子

相互作用を検出するための決め手となる手法がなかった。

(2) 特定生体分子を認識するための分子を基板表面に配置した場合、期待されるような認識能が得られない (分子の立体障害、認識部位への到達阻害ほか)。

(3) 修飾表面の制御、特に膜の面方向におけるドメインサイズや相分離構造を積極的かつ望み通りにコントロールした膜作製がなされていない。

(4) 生体分子認識膜基板はかなり材料として高価 (貴重試料または基板材料が高価) であったとしても、基本的に繰り返し使用できない場合が多い。認識できた分子を効率よく回収する手法が確立されていない。

蛍光法を用いず、水素結合を中心とした弱い相互作用を、本当に相互作用能があるときのみその場で正確に評価する技術が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、核酸塩基-核酸塩基、タンパク質-タンパク質、糖鎖-タンパク質、糖鎖-細胞などの生体分子・物質間に存在し、分子認識に重要な役割が認識されつつもクリアな評価が難しかった水素結合や分子間力相互作用を中心とする弱い相互作用を検出するための方法を確立することと、弱い相互作用を利用したインテリジェントな分子認識表面を構築することにある。具体的には、(1) 生体分子との特異的相互作用部位を有する分子 (糖鎖など; 認識分子) と非特異的な吸着が起こらない分子とを用いて、生体分子認識部位がまばらに配置する修飾層表面を作り出すことで、認識分子のみから構成される修飾膜表面を超える高感度なタンパク質認識表面を作り出すこと、(2) 数十ナノメートルレベルに微細加工を施した基板の上に、構造制御された生体類似機能を有する表面構造を作りだし、同時にこれをそのままセンシングデバイスとして用いること、さらに(3) 外部からの刺激 (電位変化) により表面の性質 (親疎水性、電荷等) を可逆に変化できる分子を同時導入し、目的分子の認識・吸着前後で電極基板の電位を変化させることで表面の可逆的再生を行う。本研究により、弱い相互作用を評価する手法を提案

できれば、今まで数値化されにくかった水溶液内での生体物質相互作用を評価することができる。最終的には、タンパク質・糖鎖・細胞アレイなどのチップとして今回作製する機能膜を導入することで、これまでになかった高感度・高効率な認識系が構築できると考えられ、例えば創薬領域における薬物スクリーニングのための強力なツールを提供できる。

3. 研究の方法

認識分子と非特異吸着を抑制する分子を表面に共吸着させ、ノイズレベルを下げて目的分子のみの高感度検出を図る。その際、基板からの高さ方向を制御することで認識部位が効率よく機能するように膜設計する。基板表面上に第一分子（非特異吸着分子）、第二分子（認識分子）を順に配列させる。自然発生的な混合修飾膜形成とトップダウン的な面内方向・垂直方向の制御を積極的に行う。

非特異吸着分子部分に電気化学活性分子を新規に導入し、生体分子の認識および分子の吸着/脱離を電気化学的に可逆に制御する系の構築を目指す。目的分子の吸脱着が自在に制御でき、かつ、再生可能な認識表面の構築を行う。

4. 研究成果

初年度（2007年度）は主に認識分子と非特異吸着抑制分子混合膜によるタンパク質認識最適条件の探索につき研究を進め、次年度（2008年度）は、非特異的な吸着をより効率よく抑えるための分子設計とこの単分子層の持つ機能の評価、タンパク質認識の実証を中心に研究を進めた。

認識部位を膜を構成する分子全体のうちの30%以下、特に10-25%程度に分散させると高感度タンパク認識が可能であることを見いだした。ある特殊の条件下では、認識分子100%の時よりも、分散の系の方がタンパク質（レクチン）の固定化量を45倍高めることを確認した。さらに非特異吸着抑制効果を深く検討することで、従来よりノイズ応答を低く抑えた検出が可能になった。ポリエチレングリコール鎖のうち、機能発現に有効な最小単位とされるエチレングリコールユニット数3のトリエチレングリコール基と、緻密に膜構成が可能な直

鎖アルカンチオール($n=2, 4, 6, 8$)を併せ持つ分子(TEGC $_n$ SH)を合成し、まずこの分子単独で分子層を構築し、非特異吸着抑制能を検討した。各分子の吸着量を、電気化学手法（金基板表面から分子を還元脱離させる手法）により評価した。膜構成に直接関与するアルカンチオール鎖部分が長くなるにつれて単位面積あたりの吸着分子数が増加し（脱離ピーク電流量より評価）、分子間の相互作用も強固になり（脱離電位により評価）、分子の吸着形態も単一になってきており（脱離ピークの半値幅より評価）、より緻密な膜構築が行われていることを確認した。この分子膜は緻密に構成されているため、非特異吸着を完全に抑制できることも確認した。特に従来の高分子材料では抑えにくかった低分子量のペプチド分子（分子量400程度）から、高分子量の生体分子（タンパク質等、分子量数十万）まで、僅か本単分子層一層で完全に抑えられることを確認できた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計4件）

- (1) 佐藤 縁、吉岡恭子、田中睦生、村上悌一、石田美穂、丹羽 修、Recognition of lectin with a high signal to noise ratio: carbohydrate-tri(ethylene glycol)-alkanethiol co-adsorbed monolayer, Chem. Commun., 4909-4911 (2008).
- (2) 佐藤 縁、村上悌一、吉岡恭子、丹羽 修、12-Mercaptododecyl beta-maltoside-modified gold nanoparticles: specific ligands for concanavalin A having long flexible hydrocarbon chains, Anal. Bioanal. Chem., **391**, 2527-2532 (2008).
- (3) 村上悌一、佐藤 縁、芝上基成、Stereoselective glycosylations using benzoylated glucosyl halides with inexpensive promoters, Carbohydrate Research, **343**, 1297-1308 (2008).
- (4) 水谷文雄、加藤 大、栗田僚二、三重安

弘、佐藤 縁、丹羽 修、Highly-sensitive biosensors with chemically-amplified responses, Electrochemistry, **76**, 515-521 (2008).

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 佐藤 縁、「ソフトナノ界面による高感度タンパク質認識」産総研オープンラボ バイオ・医療応用へ向けたマテリアル・デバイス開発、2008 年 10 月 21 日、つくば.
- (2) Yukari Sato, Kyoko Yoshioka, Mutsuo Tanaka, Teiichi Murakami, Miho N. Ishida, and Osamu Niwa, “Effective lectin recognition on the carbohydrate-/protein - resistant alkanethiol co-adsorbed monolayer”, The joint international meeting of Electrochemical society and Electrochemical society of Japan (PRoME 2008), October 16th, 2008, Honolulu, HI, USA.
- (3) 吉岡恭子、佐藤 縁、田中睦生、村上悌一、丹羽 修、「糖鎖/トリエチレングリコールアルカンチオール混合自己組織化膜からなる高感度・高効率なレクチン認識薄膜」第二回化学センサー・バイオセンサーおよび計測技術合同ワークショップ、2008 年 9 月 4 日、千葉.
- (4) 佐藤 縁、吉岡恭子、田中睦生、村上悌一、丹羽 修、「ポリエチレングリコール基を含む単分子層の特性と非特異吸着抑制効果の検討」電気化学会第 75 回大会、2008 年 3 月 29 日、甲府.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

「非特異吸着抑制材料」、佐藤 縁、吉岡恭子、他、特願 2008-086149.

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 縁 (Yukari Sato) 産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員
(研究者番号：4035132)

(2) 研究分担者

吉岡 恭子 (Kyoko Yoshioka) 産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員
(研究者番号：50358321)

(3) 連携研究者