

平成21年 5月27日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19760006
 研究課題名（和文） X線全反射現象を利用した抗原抗体反応の非標識観察に関する基礎研究
 研究課題名（英文） Investigation for Antigen-Antibody Reaction on Solid Surface Using Total X-ray Reflection
 研究代表者
 桑島 修一郎 (Kuwajima Shuichiro)
 京都大学・大学院工学研究科・講師
 研究者番号：80397588

研究成果の概要：固体基板上で2次元的に実現する抗原・抗体反応を「有機多層膜」と捉え、X線反射率法を用いて膜構造を精密評価することにより抗原特異吸着効率の向上を試み、次世代バイオセンサ応用への可能性を探った。その結果、抗原特異吸着による膜構造変化を世界で初めて観察し新規のタンパク検出法としての可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用物性・結晶工学

キーワード：抗原抗体反応、非標識、バイオセンサ、X線反射率、有機薄膜

1. 研究開始当初の背景

総合科学技術会議の第3期基本計画では、従来のライフサイエンス、情報通信、環境、ナノテクノロジー・材料、これら4分野を重点推進分野として継続し、科学技術面のみならずさらなる社会的貢献度の高い進展が盛り込まれている。しかしながら、経済的・社会的ニーズに応える短期的展望に立った研究開発とともに、次世代科学技術の「芽」となる新原理・現象の発見・解明を促す基礎研究の重要性がさらに強調されている。

このような中、申請者は一般の血液検査で行われている血中マーカー物質（腫瘍マーカー、ホルモン類、サイトカインなど）検出の高感度化を提案する。特に世界的に死因第一

位に挙げられる悪性腫瘍については、早期にマーカー物質を検出することが予後を大きく左右するため医学領域を超えた全分野的な取り組みが不可欠であると考え。

一般に尿や血清中に含まれるマーカータンパクの高感度検出技術として、抗体タンパクとの特異吸着の利用が重要な要素となっている。特に、物質の密度差によって生じる「界面」での光学現象を利用することにより高感度かつ高精度の検出が期待できることから、近年、非標識センシング法として表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)法や水晶振動子マイクロバランス(QCM)法などが精力的に研究されている。このような技術開発において、「界面」での均

一な 2 次元的タンパク固定化が不可欠であり、特に高いアフィニティはタンパク分子の配向など界面における固定化形態に大きく影響される。一般に、抗体分子は基板上に固定化される際に 4 つの分子配向(End-, Side-, Head-, Flat-on)が示唆されており、抗原タンパクを認識し結合する部位である Fab 部位を表面に向けた End-on 配向は最も抗原との反応性が高いとされている。一方、Xu らは固体基板上での抗原抗体反応におけるタンパク吸着を生体分子多層膜としてとらえ、分光エリプソメトリーおよび中性子反射率法を用いて膜構造を同定することにより抗体分子の配向性や抗原吸着能について評価したところ、分子軸が基板に接した Flat-on 配向が支配的であることを明らかにしており、高いアフィニティを示す End-on 配向とは大きく異なる結果を得ている。しかしながら、分光エリプソメトリーでは膜厚と膜密度の同定に不確定さを含んでおり、また中性子反射率法では溶液中の測定が可能であるけれども計測ダイナミックレンジが不十分なため、基板に直接固定化された抗体単分子膜の分子配向や吸着密度については同定できても抗原の特異吸着に伴うわずかな膜構造パラメータ変化についての評価までは困難であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、固体基板上で 2 次元的に実現する抗原・抗体反応を「有機多層膜」と捉え、全反射臨界面角近傍の X 線反射率から膜構造パラメータを精密決定することにより固体表面上での抗原抗体反応効率向上を試み、X 線を用いた次世代高感度・高精度バイオセンサとしての可能性を探る。試料として肝細胞癌の腫瘍マーカーである α -fetoprotein(AFP) を用い、固体基板上に固定化した抗体分子の配向状態および固定化密度を定量評価し、抗原タンパクとの特異吸着により期待される膜構造変化を広ダイナミックレンジ計測が可能 X 線反射率測定法を用いて詳細に検討するものである。

3. 研究の方法

本研究で提案する実験概念図を図 1 に示す。抗体分子の固定化には静電的な相互作用による吸着(物理吸着)および共有結合による積極的な固定化(化学吸着)の 2 種類を行った。基板としてはいずれも熱酸化膜付き Si ウェハー表面を aminopropyltriethoxysilane(APTES) で修飾したものを用いた。なお、化学吸着には glutaraldehyde(GA)を用いて基板との固定化を行った。抗 AFP モノクローナル抗体溶液(8.33 $\mu\text{g/ml}$)、次いで非特異吸着防止用タンパク(BSA)溶液(10 $\mu\text{g/ml}$)に浸漬し抗体およびブロッキングタンパクを吸着した後、AFP 溶液

(2.5 $\mu\text{g/ml}$)に十分浸漬し抗原特異吸着を行った。なお、各プロセスにおいてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて十分に洗浄しており、非特異吸着を除去している。測定は各プロセスの途中で大気中に取り出し十分に乾燥させたものについて行った。

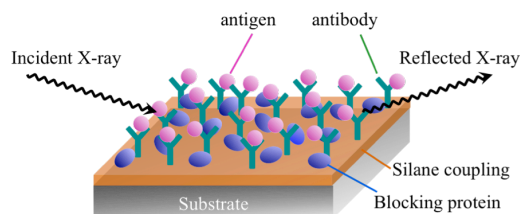


図 1 X 線反射率による固体基板上での抗原抗体反応評価。

4. 研究成果

(1) 物理吸着

各プロセス途中での X 線反射率プロファイルを示す(図 2)。見やすさのため各プロファイルは 2 桁ずつシフトさせている。抗 AFP および BSA まで吸着した試料では明らかに APTES 上に均一な単層膜が形成されており両タンパクが同一層を形成していることがわかる。一連のプロファイルに対するフィッティング結果を表に示す(表 1)。この結果から、抗体層は膜密度 1.07 g/cm^3 、膜厚 2.97 nm、表面粗さ 0.81 nm であり、生体物質では密度が 1 g/cm^3 程度であることから、抗体は密に吸着されていると考えられる。また抗体の最短軸長が約 4 nm であることから、Xu らと同様に Flat-on 配向の抗体吸着が支配的であると考えられる。約 1 nm ほど膜厚減少は乾燥によるものと考えられる。

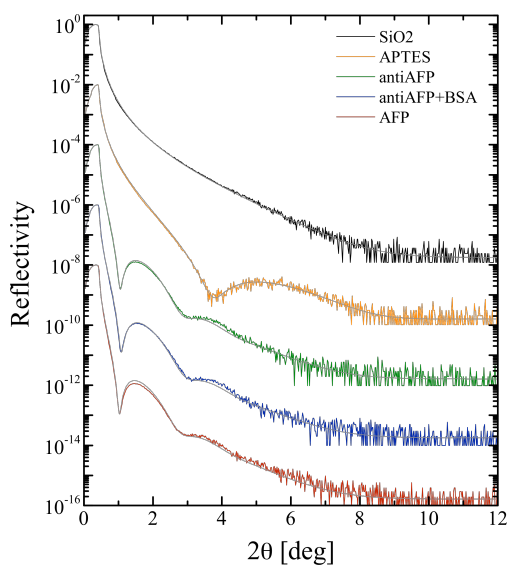


図 2 各プロセス途中で大気中に取り出した試料の X 線反射率プロファイル。

表 1 X 線反射率フィッティング結果。物理吸着による抗体単層膜(上)および抗原特異吸着後(下)の膜構造パラメータ。

特異吸着前			
	density [g/cm ³]	thickness [nm]	roughness [nm]
Protein	1.07	2.97	0.81
APTES	1.20	1.19	0.36
SiO ₂	2.20	500	0.34
Si	2.33	-	-
特異吸着後			
Protein	1.09	3.45	0.97
APTES	1.20	1.19	0.36
SiO ₂	2.20	500	0.30
Si	2.33	-	-

次に、AFP 特異吸着後のプロファイルでは膜厚を反映した干渉縞の間隔が小さくなっており、膜厚の増加が示唆された。フィッティングにおいて、タンパク層の膜パラメータは、密度 1.09 g/cm³、膜厚 3.45 nm となった。また最表面の粗さは 0.97 nm と大きく、この抗原層の反射率への寄与は小さく結果的にプロファイル変化も僅かであったと思われる。AFP の直径(約 5.8 nm)を考慮すると得られた膜厚は非常に薄いことから、おそらく AFP は分子の殆どが抗体+BSA 層に埋まっており一部が最表面に突出している状態を反映していると予想された。また密度増加も小さいことから均一な層を形成していないと考えられる。しかしながら、本研究において抗原抗体反応による X 線反射率プロファイル変化を検出できたことから、抗体分子配向やそれに伴う抗原吸着特性についてさらに詳細な検討が可能となると思われる。

(2) 化学吸着

GA による基板との共有結合を導入した X 線反射率プロファイルを図 3 に示す。均一な GA 単分子膜を示す干渉縞が観測されており良好な抗体固定化が行われていることを示唆している。フィッティングにより得られた膜パラメータから、各プロセスでの表面におけるタンパク吸着量 Γ [mg/m²]を見積もった(図 4)。タンパク吸着量については各プロセスにおいて物理吸着の方が上回っているが、ブロッキングタンパクおよび抗原特異吸着により顕著な増加が見られないことから、高い抗体吸着量による立体障害が抗原特異吸着を妨げていることが予想された。

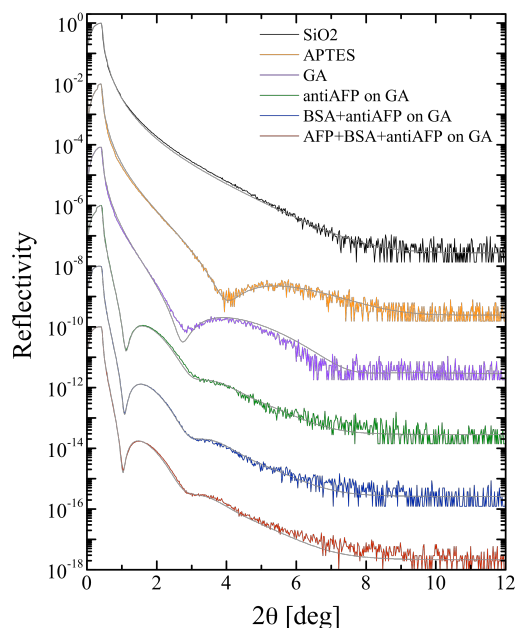


図 3 共有結合による抗体固定化における X 線反射率プロファイル。

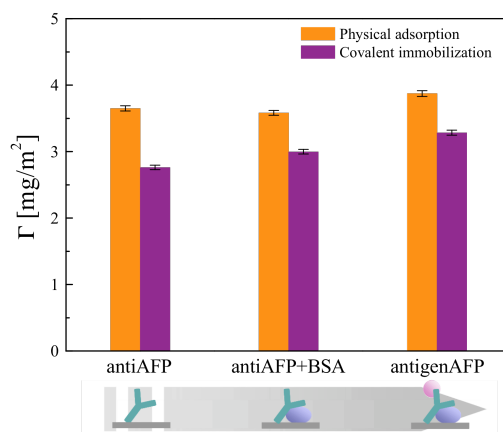


図 4 X 線反射率測定により決定された膜構造を用いて見積もられた、各プロセスにおける物理および化学吸着によるタンパクの表面吸着量 Γ [mg/m²]。

一方、GA による固定化ではブロッキングタンパクおよび抗原の吸着により表面吸着量に明確な増加が見られた。この結果から、抗原特異吸着による表面吸着量の増加率を見積もったところ、物理吸着で 17%、化学吸着で 22%と共有結合の導入によりわずかながら増加が見られた。このことから、表面での抗体の固定化密度が抗原特異吸着効率に大きく影響することが明らかとなった。しかしながら、物理および化学吸着いずれの X 線反射率プロファイルにおける干渉縞パターンは類似しており、抗体分子配向については変化が見られず、いずれも Flat-on 配向して

いることが予想された。今後、固定化密度に加えて、分子配向についても最適化することが可能となれば、抗原特異吸着効率は飛躍的に向上することが期待される。

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 1 件)

- ① S.Kuwajima, S.Horie, T.Horiuchi, H.Yamada, K.Matsushige, K.Ishida, “Crystal and Layer Structures of Ferroelectric Oligomer Thin Films”, *Macromolecules*, **42** (2009) 3353 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 合田圭佑, 寺村裕治, 桑島修一郎, 石田謙司, 松重和美, 岩田博夫, 小寺秀俊, “抗体単層膜の膜構造における抗体固定化の影響”, 第 56 回応用物理学関連連合講演会 (2009 年 3 月 30 日 筑波大学).
- ② K.Gohda, Y.Teramura, S.Kuwajima, K.Ishida, K.Matsushige, H.Iwata, H.Kotera, “Effect of Covalent Immobilization on Antibody Monolayer Structure”, 5th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (17,Mar.,2009 Miyazaki).
- ③ K.Gohda, Y.Teramura, S.Kuwajima, K.Ishida, K.Matsushige, H.Iwata, H.Kotera, “Layer Structure of Adsorbed Antibody Molecules Binding Antigen AFP”, 2nd International Symposium on Nanomedicine (invited speaker, 5,Feb.,2009 Okazaki).
- ④ 桑島修一郎, 寺村裕治, 合田圭佑, 石田謙司, 松重和美, 岩田博夫, 小寺秀俊, “X 線反射率法を用いた抗原抗体反応によるタンパク吸着膜の精密構造解析”, 第 57 回高分子討論会 (2008 年 9 月 26 日 大阪市立大学).
- ⑤ 合田圭佑, 寺村裕治, 桑島修一郎, 石田謙司, 松重和美, 岩田博夫, 小寺秀俊, “抗原抗体反応によるタンパク吸着状態の放射光 X 線反射率測定”, 第 69 回応用物理学学術講演会 (2008 年 9 月 3 日 中部大学).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑島 修一郎 (Kuwajima Shuichiro)
京都大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号：80397588