

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390009

研究課題名(和文)流動性あるリン脂質自己組織化膜を用いた超高感度検出技術開発の基礎研究

研究課題名(英文)Fundamental research on the development of high sensitive detection of target molecules by the use of self-assembled phospholipid layer possessing fluidity

研究代表者

近藤 伸一 (Kondo, Shin-ichi)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90240944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、リン脂質自己組織化膜の流動性を利用した膜表面での分子間相互作用、特に糸状部位と環状部位との相互作用によるロタキサン構造の形成による新規な超高感度検出技術開発を目的とするものである。その結果、本リン脂質自己組織化膜上に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を起こす組み合わせとしてよく知られているCy3とCy5で標識した2種類のシクロデキストリン誘導体を固定化することで、ポリエチレングリコール添加によりロタキサン構造が形成される結果、蛍光強度変化を利用した新しい検出技術の開発が期待できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop the novel high sensitive detection method of target molecules utilizing the formation of rotaxane structure on the surface of self-assembled phospholipid layer possessing fluidity. It is well-known that the rotaxane structure is formed by mixing cyclodextrin (CD) and polyethylene glycol (PEG) in water, in which many CD units are threaded by PEG. Two kinds of CD derivatives, which possessed Cy3 or Cy5 to induce the fluorescence resonance energy transfer (FRET), were immobilized on the surface of self-assembled phospholipid layer. It was observed that the fluorescence intensity change d by adding PEG aqueous solution to the film immobilizing CD derivatives possessing Cy3 or Cy5 due to the formation of rotaxane structure. It is hoped that the high sensitive detection of PEG might be developed by this method.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、物理系薬学

キーワード：リン脂質自己組織化膜 流動性 プラズマ ロタキサン構造

1. 研究開始当初の背景

近年、微量成分の検出をはじめ、高感度検出技術の開発が望まれている。このような高感度検出技術の開発は病気の早期発見につながり、我が国のような高齢化社会においては医療費の削減にも寄与することから高い関心が寄せられている。さらに、検出部位の小型化や短時間での検出が可能になれば、在宅での診断に用いられるヘルスケアチップへの応用など、幅広い需要が見込まれる技術となると期待される。

一方、本申請者らは最近、低圧気体の放電を利用するプラズマ表面処理技術を用いて、高分子材料表面に熱的にも安定なリン脂質自己組織化膜を構築する方法を開発した。本方法により構築したリン脂質自己組織化膜は、細胞膜と同じように流動性を持つため、その表面に固定化した分子の位置が移動可能である。すなわち、従来高分子表面等に分子を化学的に固定化する方法では、固定化した分子の位置を移動することはできないが、流動性を持つリン脂質膜表面に固定化すれば、分子の移動が可能となるとともに、表面に固定化した分子間での相互作用も期待され、従来法とは異なる新しい高感度検出技術の開発が可能になると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

既存の生体分子固定化技術のように高分子基材等に直接センサー分子等を固定化する方法では、基材表面に固定化した分子間での相互作用を実現するのは不可能である。高分子基材上に構築した流動性あるリン脂質自己組織化膜表面に分子を固定化することにより、高分子基材に直接結合していないため分子の移動が可能となり、膜上の分子間での相互作用が可能になり、新しいタイプのデバイス開発が実現できると考えられる。本研究は、上述の新規デバイス開発の基礎研究として、膜流動性を利用した膜表面での分子間相互作用、特に糸状部位と環状部位との相互作用によるロタキサン構造の形成による新規な超高感度検出技術開発を目指す。

図1は、その概要を模式的に示したものである。A)のように両末端にかさ高い置換基を持ち、かつ一方が酵素特異的に切断される部位を有する糸状分子とリン脂質膜上に環状分子が固定された基材を用いるシステムの開発を行う。すなわち、糸状分子が酵素により切断されないときは、かさ高い置換基が両末端にあるためロタキサン構造を形成できないが、酵素により切断されるとロタキサン構造を形成し発色(発光)するシステムの開発を目指す。あるいは、B)のようにロタキサン構造を形成しておき、末端が酵素で分解されるとロタキサン構造が分解し、消光するシステムの確立を目指す。そのために、期間内では以下の項目について研究を行う。

1) リン脂質自己組織化膜上でのロタキサ

ン構造の形成条件を確立する。

2) ロタキサン構造形成時に発光するための、蛍光色素団の導入と安定性について検討する。特に、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した検出法と糸状分子と環状分子の相互作用を利用した発光について検討する。

3) 本方法により構築されるリン脂質自己組織化膜の特性、特に流動性とその制御について明らかにする。

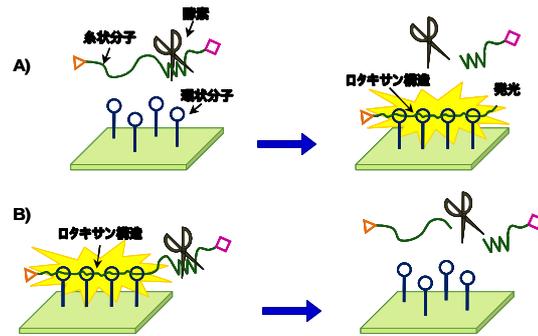


図1 リン脂質自己組織化膜上でのロタキサン構造形成を利用した高感度検出技術開発の概要

3. 研究の方法

(1) リン脂質自己組織化膜の特性評価

リン脂質自己組織化膜の膜厚は、光学干渉式リアルタイム膜厚測定装置(Avantes)を用いて測定した。

リン脂質自己組織化膜の熱安定性は、加熱により遊離したリン脂質量を定量することにより行った。

(2) 流動性評価

リン脂質自己組織化膜の半分にフルオレセインで標識したアルブミンを固定化し、このフィルムを水に浸漬させ、経時的に共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss LSM 700)によりフィルム表面の蛍光部分の範囲を測定し、単位時間当たりの蛍光部の移動距離より流動性を評価した。

(3) Cy3 あるいは Cy5 で標識した Per-6-amino-β-cyclodextrin (Per-6-ABCD-Cy3 あるいは Per-6-ABCD-Cy5) の合成

Per-6-amino-β-cyclodextrin (Per-6-ABCD)は既報の方法により合成した。Amersham Cy3-Mono-Reactive あるいは Amersham Cy5-Mono-Reactive を Per-6-ABCD と等モルになるように室温で24時間反応させ、目的物を得た。

(4) 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の測定

リン脂質自己組織化膜表面に等モルになるように Per-6-ABCD-Cy3 と Per-6-ABCD-Cy5 を固定化した。このフィルムをリン酸生理緩衝食塩水(PBS)に浸漬し、ポリエチレ

ングリコール(PEG)のPBS溶液を添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Cy3の励起波長555nmを照射し、Cy5の蛍光強度を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) リン脂質自己組織化膜の温度に対する膜厚の変化

リン自己組織化膜の熱安定性に関する知見を得るため、膜厚の異なるリン脂質自己組織化膜を調製し、加熱に伴う膜厚の変化を評価した。

図2は、その結果を示したものである。1 mmol/lのリン脂質懸濁液に浸漬して得られたリン脂質自己組織化膜の膜厚は約9 nmであるのに対し、2 mmol/lの懸濁液を用いた時は約15 nmであった。一般にリン脂質二重膜の膜厚は、5~6 nmといわれていることから、1 mmol/lの時は3層、2 mmol/lの時は5層構造を取っていることが示唆された。この結果は、高分子基板表面が疎水性であることから一致している。60に加熱した時、1 mmol/lで調製したものは膜厚の変化は見られないのに対し、2 mmol/lの試料では約6 nmの膜厚の低下が認められた。この膜厚の減少は、リン脂質2層分に相当しており、5層構造から3層構造に変化したことが示された。80では、両試料ともに検出限界以下の値となったため、リン脂質自己組織が崩壊したことが明らかとなった。

以上の知見より、以降の研究においては熱安定性の高かった1 mmol/lで調製したリン脂質自己組織化膜を用いて実験を行った。

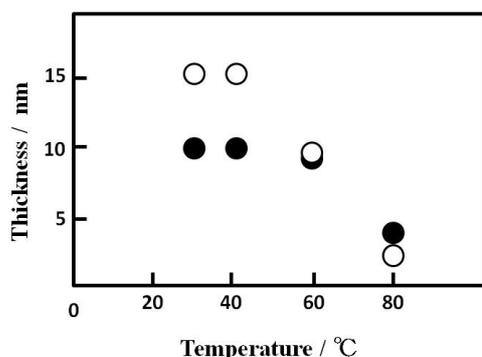


図2 加熱によるリン脂質自己組織化膜の膜厚変化

- ; 1 mmol/l リン脂質懸濁液により調製
- ; 2 mmol/l リン脂質懸濁液により調製

(2) リン脂質自己組織化膜の流動性評価

本リン脂質自己組織化膜には Per-6-ABCD を固定化するための足場として、ステアリン酸(StA)をリン脂質膜内に導入している。一方、細胞膜中にもリン脂質以外に様々な脂肪酸が含まれており、脂肪酸の種類や量により膜の流動性が変化することもよく知られている。本研究で目指す新規検出法においては、膜の流動性が検出時間に大きな影響を与

えることが予想される。そこで、種々の StA 含有リン脂質自己組織化膜を調製し、その流動性を評価した。本実験条件においては、StA の導入密度が最大のときが 0.30 nmol/cm² であり、この範囲内においては StA を含んでいないリン脂質自己組織化膜と熱安定性に差異がないことを別途確認している。

表1は、StA 密度に対するリン脂質自己組織化膜の流動速度の結果を示したものである。0.15 nmol/cm²までは、流動速度に変化は認められなかったが、0.30 nmol/cm²では明らかに大きな値を示しており、StA 含有量の増加に伴い流動速度が増すことが明らかとなった。この結果は、上述のように細胞膜の結果とも同じ傾向を示している。

以上の知見より、本実験条件において流動速度の最も大きかった StA 密度 0.30 nmol/cm² の試料を以下の実験において用いることとした。

表1 ステアリン酸密度に対するリン脂質自己組織化膜の流動速度

ステアリン酸密度 (nmol/cm ²)	流動速度 (mm/min)
0.06	0.050
0.15	0.050
0.30	0.092

(3) 蛍光標識した Per-6-ABCD の固定化とロタキサン構造形成の評価

リン脂質自己組織化膜上でロタキサン構造形成による FRET 現象を引き起こすため、膜上への固定化と蛍光分子の固定化を考慮し、構造内にアミノ基を7個持つ Per-6-ABCD の合成を既報に基づき行った(図3)。

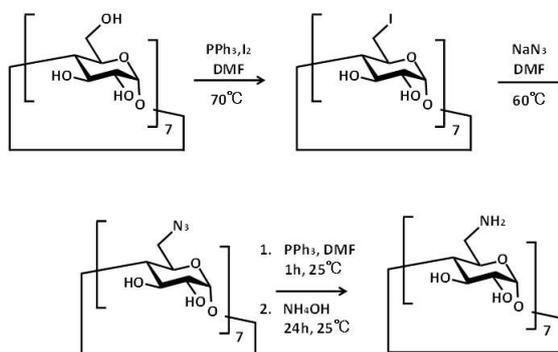


図3 Per-6-ABCD の合成^{a)}

a) P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.*, **61**, 903-908 (1996)

次に、合成した Per-6-ABCD と蛍光色素との縮合反応を実施した。蛍光色素には、FRET を起こす組み合わせとしてよく知られるシアニン色素である Cy3、Cy5 を選択した。Per-6-ABCD と N-hydroxy-succinimide ester (NHS) 型の Cy3 あるいは Cy5 を等モル反応させ、目的とする蛍光標識化合物 Per-6-ABCD-Cy3 あるいは Per-6-ABCD-Cy5 を得た。

リン脂質自己組織化膜上に Per-6-ABCD-Cy3 と Per-6-ABCD-Cy5 を等モル固定化し、その表面を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。蛍光強度の結果を図 4 に示す。Cy3 の励起波長 555 nm の励起では Cy3 の蛍光が(左端の棒グラフ)、Cy5 の励起波長である 639 nm の励起では Cy5 の蛍光(右端の棒グラフ)が観察された。この結果より、2 種類の蛍光色素がリン脂質自己組織化膜上に固定化されていることが確認された。しかしながら、予想に反して、ブランクの強度と比較して、両色素を固定化した膜では Cy3 の励起波長 555 nm で励起した時の Cy5 の蛍光強度は明らかに高い値を示した。(左端から 2 つ目の棒グラフ) この結果より、FRET がすでに起きている可能性が示唆された。すなわち、Cy3 あるいは Cy5 どちらかの一部が CD に包接された結果、FRET がおきたものと考えられる(図 5)。

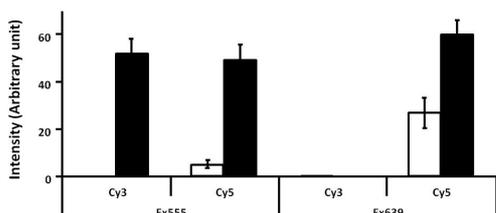


図 4 リン脂質自己組織化膜上に蛍光標識した Per-6-ABCD を固定化したときの各励起波長での蛍光強度
; ブランク、 ; 蛍光標識試料

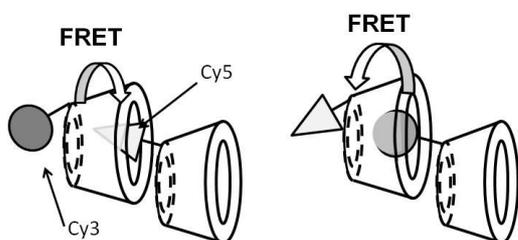


図 5 Per-6-ABCD-Cy3 と Per-6-ABCD-Cy5 との間での包接錯体形成の模式図

そこで、PEG の添加により包接錯体が崩壊し、蛍光強度に変化が生じるものと考え、本試料への PEG 添加による蛍光強度の変化について検討した。その結果、添加後 5 時間までは PEG 濃度依存的に蛍光強度が減少する傾向が示された。(図 6) さらに、低濃度においては 5 時間以降に蛍光強度が回復する傾向が示され、ポリロタキサン構造形成による FRET の発現、あるいは一部包接錯体が再形成される可能性が示唆された。

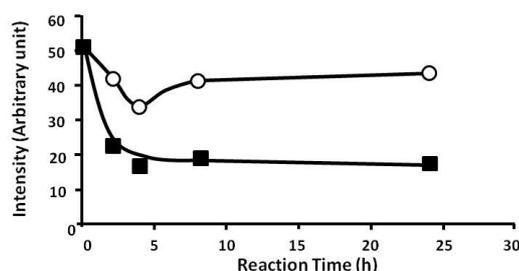


図 6 PEG 添加による励起波長 555nm における Cy5 の蛍光強度の経時変化
; 1.5 nmol/l PEG 溶液
; 15 nmol/l PEG 溶液

以上の知見より、流動性のある本リン脂質自己組織化膜上に FRET ペアを持つシクロデキストリン誘導体を固定化することで、膜上での FRET を利用した新しい検出技術の開発が期待できることが明らかとなった。今後は、さらに詳細に PEG 濃度と FRET 強度変化との関連を明らかにするとともに、PEG の分子量による FRET 強度変化についても明らかにする。さらに、現時点では Per-6-ABCD と等モルの蛍光色素を結合させているが、蛍光色素量の増大 (Per-6-ABCD に対して 2 あるいは 3 分子の蛍光色素の結合) による高感度化を進める。また、包接錯体を形成しないようにするため、-CD に変えても検討を行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Shin-ichi Kondo, Masako Suzuki, Yasushi Sasai, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Intermolecular Interaction of Cyclodextrin Derivatives Immobilized onto the Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method, J. Photopolym. Sci. Technol., 査読有, 2014, 27, 未定
<http://www.photopolymer.org/>
Shin-ichi Kondo, Masako Suzuki, Yasushi Sasai, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Immobilization of Cyclodextrin Derivatives onto the

Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method, J. Photopolym. Sci. Technol., 査読有, 2013, 26, 545-548

DOI:10.2494/photopolymer.26.545
Shin-ichi Kondo, Yasushi Sasai, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Evaluation on Fluidity of the Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method and its Application, J. Photopolym. Sci. Technol., 査読有, 2012, 25, 501-506

DOI: 10.2494/photopolymer.25.501
Shin-ichi Kondo, Yasushi Sasai, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Immobilization of Proteins onto the Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method, J. Photopolym. Sci. Technol., 査読有, 2011, 24, 467-470

DOI: 10.2494/photopolymer.24.467
Yasushi Sasai, Yuko Tanaka, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Fabrication of Scaffold for Cell Adhesion on Plasma-irradiated Polystyrene, J. Photopolym. Sci. Technol., 査読有, 2011, 24, 417-420

DOI: 10.2494/photopolymer.24.417
Shin-ichi Kondo, Yasushi Sasai, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Activity Evaluation of Antibody Immobilized onto the Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method, J. Photopolym. Sci. Technol., 査読有, 2010, 23, 567-570

DOI: 10.2494/photopolymer.23.567
Yasushi Sasai, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Plasma Surface Modification of Polymer Substrate for Cell Adhesion Control, J. Photopolym. Sci. Technol., 査読有, 2010, 23, 595-598
DOI: 10.2494/photopolymer.23.595

〔学会発表〕(計17件)

Shin-ichi Kondo, Yasushi Sasai, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Fabrication of Self-Assembled Phospholipid Layer by Plasma-Assisted Method onto a Hydrophobic Polymer Surface and Its Bio-application, International Conference on Surface Engineering (ICSE 2013), 2013/11/17-23, Korea.

Shin-ichi Kondo, Masayuki Kuzuya, Application of Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method as a

Biointerface, Twelfth International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-12), 2012/1/24-27, Nagoya.

近藤伸一、プラズマを利用した高分子表面改質とそのバイオアプリケーション、表面技術協会第124回講演大会、平成23年9月21日(水)~22日(木)、名古屋。
近藤伸一、プラズマを利用したバイオアプリケーション - リン脂質自己組織化膜の構築とその応用 -、第3回先端プラズマ技術セミナー/第28回 PLAM 研究会、平成23年4月28日、名古屋。

〔図書〕(計1件)

Yasushi Sasai, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Cold plasma techniques for pharmaceutical and biomedical engineering, InTech, Biomedical Engineering-Trends in Materials Science (edited by Anthony N. Laskovski), 2011, 101-123

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤伸一 (KONDO, Shin-ichi)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90240944

(2) 研究分担者

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

山内行玄 (YAMAUCHI, Yukinori)
松山大学・薬学部・准教授
研究者番号: 10461378

葛谷昌之 (KUZUYA, Masayuki)
中部学院大学・人間福祉学部・教授
研究者番号: 10082984