

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23850019

研究課題名（和文） 新規 POCT デバイスの創出を目指したマルチプローブ親和電気泳動法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel multi-probe affinity electrophoresis towards POCT use

研究代表者

松野 裕樹 (MATSUNO YU-KI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：40613550

研究成果の概要（和文）：臨床検査では、迅速な診断により治療の早期最適化を可能にする point-of-care testing (POCT) が求められている。本研究では、新しい POCT デバイスの創出を目指し、代表者らが独自に開発した膜電気泳動法である分子マトリクス電気泳動を活用する新しい親和電気泳動法の開発に取り組んだ。泳動膜上にタンパク質プローブを局所固定化する方法を確立した上で、レクチンや抗体など複数のタンパク質を配置した膜を使用する 2 次元マルチプローブ親和電気泳動法を考案し、モデル糖タンパク質を分析試料に用いて実証した。

研究成果の概要（英文）：Point-of-care testing (POCT) is important for early optimization of medical treatments. We studied on the development of a novel affinity electrophoresis which derived from newly developed method, supported molecular matrix electrophoresis (SMME). We first established a procedure for local immobilization of proteins and then designed a novel two-dimensional affinity electrophoresis using lectin and antibody as affinity probes. We demonstrated the method's feasibility by using some glycoproteins as a model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：膜電気泳動・親和電気泳動・検査デバイス

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の医療では、「疾患をどのように治療するか」という対症的な視点よりも、「いかにして迅速に診断し、早期に治療を最適化するか」という予測・先制的な視点が重要であると考えられている。そのような背景から、臨床検査の分野では「患者の傍での即時検査」、point-of-care testing (POCT) が求め

られており、より高性能な次世代 POCT デバイスの創出は重要な課題の 1 つである。POCT デバイスに求められる最低条件は、1) 迅速分析（～30 分）、2) コンパクト性、3) 簡便性、そして 4) 低コストの 4 点である。これらの条件を満たしている代表的な POCT デバイスとしては、妊娠検査薬などに用いられている lateral flow assay を利用した簡易

キットが知られているが、近年ではチップ電気泳動などの microfluidics 技術が、次世代 POCT デバイスとして注目されている

(2) 研究代表者らはこれまで、既存の技術では分析が困難であったムチン型糖タンパク質の簡便な分離解析技術の開発に取り組み、分子マトリクス電気泳動 (Supported Molecular Matrix Electrophoresis, SMME) を開発した。SMME とは、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 等の多孔質の疎水性ポリマー膜を支持体として利用し、その内部に吸着形成させたポリビニルアルコール等の親水性ポリマー分子のマトリクスを分離担体として使用する新しい膜電気泳動法である。

(3) SMME の独創性は、本来電気泳動の支持体としては利用できない疎水性膜を簡便かつマイルドな条件で親水化し、電気泳動に使用した点にある。これにより、疎水性膜にあらかじめ生体成分などを吸着固定した後に親水化することで、簡単に膜タイプの親和電気泳動用分離媒体を作成することができる。また本法では、疎水的相互作用により支持体に吸着させたプローブあるいはリガンドが非動化されている事が特徴であり、これにより、1 枚の膜上の任意の場所に複数の成分を局所的に配置することが可能となる。本技術を上手く活用すれば、SMME を高性能な POCT デバイスへと発展させられる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 将来、POCT デバイスに活用できる新しい分析技術の創出を目指し、SMME をベースとする新しい親和電気泳動法 (affinity-SMME) をマルチプローブ化し、さらに発展させる事を目的とする。

(2) 具体的には、まず、タンパク質等の生体成分を PVDF 膜上に局所的に吸着固定・配置する方法を確立する。その後、2 次元による親和電気泳動をデザインし、複数の疾患マーカー分子を一度の泳動で一斉に検出できる方法を開発する。本研究では分析対象を糖タンパク質に設定し、モデルを用いて技術の実現可能性を示す。糖鎖は癌などの疾患に伴い構造が変化することから、次世代の診断マーカーのシーズとして注目されている。そのような「糖鎖バイオマーカー」の簡便な一斉検出技術を開発し、本法の応用例として示す。

3. 研究の方法

(1) SMME を活用する親和電気泳動用膜作成の原理を図 1 に示す。具体的には、PVDF 膜をメタノールなどの有機溶媒により親水化した後、泳動用緩衝液等で置換し、タンパク質などのアフィニティプローブ (あるいはリガ

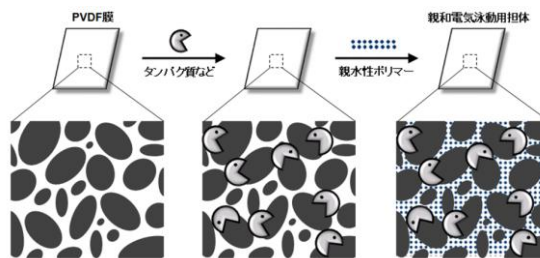


図 1 Affinity-SMME 膜の作成方法

ンド) を疎水的に膜に吸着させる。その後、親水性ポリマーを吸着させることで、容易に親和電気泳動に利用可能な膜担体を作成する事が出来る。

(2) PVDF 膜上の特定領域へのタンパク質の局所固定化は、マイクロピペットにより少量の溶液を複数回に分けて滴下していく方法でも可能であるが、マイクロアレイ分野で使用されているシリコンラバーシートなどにより区分けする方法も考えられる。将来的には、イムノクロマト専用のディスペンサー (判定ラインに配置する抗体等を分注する装置) を利用すれば、より微小な領域に再現性良く高精度にプローブを配置する事ができると考えられる。しかし、電気泳動に使用する事を考慮すると、固定化するタンパク質は膜表面にとどまらず、内部まで十分に浸透して吸着固定化されている事が望ましい。その点に注意し、場合により固定化法を工夫する必要がある。

(3) 2 次元電気泳動によるマルチプローブ親和電気泳動の例を図 2 のようにデザインした。

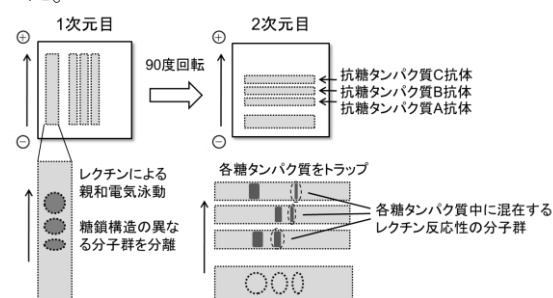


図 2 レクチンと抗体による 2 次元マルチプローブ親和電気泳動

膜支持体での 2 次元電気泳動は、膜の端で 1 次元目の泳動を行った後、膜を 90 度回転させてから 2 次元目の泳動を展開する。1 次元目にレクチン親和電気泳動を行い、糖鎖構造の異なる分子種を分離する。各分子に対する抗体を図のように並べて配置し、2 次元目の泳動により各分子をトラップしていくこと

で、各糖タンパク質中に混在するレクチン反応性分子を一斉に検出できる。本研究では、モデル糖タンパク質の混合物を用いて本法の実証を検討する。

4. 研究成果

(1) レクチン・抗体の局所固定

① マイクロピペットを用いて特定領域にタンパク溶液を滴下する方法

疎水性膜である PVDF 膜は、緩衝液等に浸した状態であっても、表面に滴下した溶液が直ちに拡散していく事はなく、ある程度目的の領域のみにタンパク質を吸着させることが可能である。しかし、この方法では、タンパク質を PVDF 膜の裏側まで浸透させる事ができていない事が、膜の染色結果から判明した。従って、この方法では膜の内部に均一に吸着固定できていない可能性が疑われた。

② バキュームブロッターによる方法

次に市販のバキュームブロッター（スロット型ウェル）を用いて、泳動膜へのタンパク質の局所固定化を試みた。この方法による吸着固定化では、膜の裏側にもタンパク質の染色像が得られた事から、膜の内部まで十分に浸透して吸着固定できている事が判明した。しかしながら、バキュームブロッターを用いた局所固定化は効果的であるが、市販のドットプロット用の装置を使用する場合、配置方法がある程度制限されてしまい、自由に配置をデザインする場合は、局所固定化操作を繰り返す必要がある。当面の予備実験では市販のもので十分であるが、将来的には、適した配置デザインのブロッターを設計・製造し、本技術専用の実験器具として開発していく必要がある。

③ 親水性ポリマー処理による吸着固定タンパク質の剥がれ

非共有結合的に固定したレクチンなどのタンパク質は、後の親水性ポリマーによる親水化処理によって一部が剥がれてしまう事が判明した。この「剥がれ」の程度は、使用するレクチンによって差がある事が分かった。

(2) モデル糖タンパク質による 2 次元マルチプローブ親和電気泳動

① 2 次元親和電気泳動の予備実験

モデル糖タンパク質として、市販のハプトグロビン（ヒト血漿由来）を用いて 2 次元親和電気泳動のデモンストレーションを行った結果を図 3 に示す。1 次元目のレクチンには WFA レクチンを、2 次元目のトラップ用抗体には抗ハプトグロビン抗体をそれぞれ図のように局所固定した（図 3、上の図）。1 次元目の泳動でハプトグロビン中に含まれる WFA レクチン反応性の分子種がレクチンを吸着

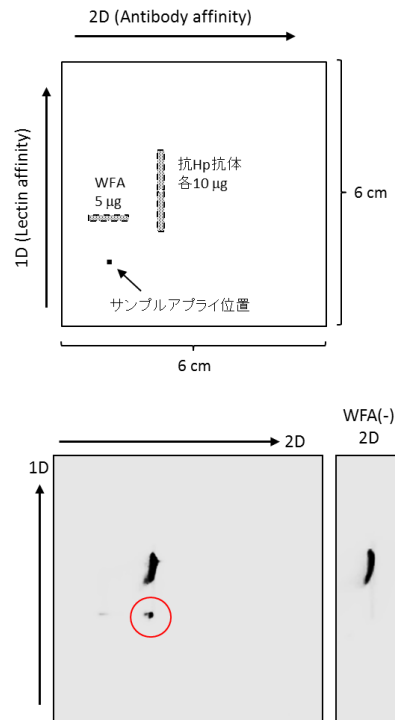


図 3 2 次元 affinity-SMME によるハプトグロビン中の WFA-reactive グライコフォームの検出

固定させた部分に泳動捕捉される。阻害糖となる N-アセチルガラクトサミンを少量滴下することで捕捉されたハプトグロビンを溶出し、その後、2 次元目の泳動を行うことで、抗体を吸着固定させた部分にハプトグロビンが泳動捕捉される。検出は別の抗ハプトグロビン抗体により行った（図 3、下の図）。WFA レクチンを固定化しない場合は、当然レクチン反応性分子のスポット（丸で囲んだ部分）は検出されない（右下の図）。以上のように、2 次元 affinity-SMME が実現可能であることを、糖タンパク質標品をモデルとして実証した。

② 複数の糖タンパク質の一斉検出

さらに、ハプトグロビン、ヘモペキシン、 α 1-アンチトリプシンの混合物を用いて、それぞれに含まれる WFA レクチン反応性分子の検出を試みた。図 2 に示したように、2 次元目の泳動で捕捉する各糖タンパク質に対する抗体を並べて配置する事で、複数の分子を一度の泳動で一斉に検出できる。従って本法では、抗体を配置した位置によって、分子を同定することができる。使用する抗体の種類や固定化量、検出用抗体の濃度、泳動条件等の最適化を行った結果、上記の糖タンパク質混合物を試料に用いた場合でも、良好な結果を得ることができた。よって、複数の糖鎖バイオマーカー検出法としての本法の有用性を実証

する事ができた。

(4) 今後の展望

本研究により、SMME を活用・発展させる事で、マルチプローブによる新しい親和電気泳動法を実現できることが分かった。今後は、この技術を POCT デバイスとして真に活用できるレベルまで、さらに発展させていく。例えば、抗体染色や化学発光を利用する従来のラポレベルの検出方法ではなく、臨床現場で即時に泳動結果が視覚化できるような検出系を考案し、技術開発を重ねていく必要がある。また、マーカー分子の「即時検出」が診断上有効となる疾患とそのマーカー分子の分離検出に電気泳動が必要となる事例を挙げ、具体的な応用例として示すことで、本技術の有用性はより高まっていくと考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①松野裕樹、分子マトリクス電気泳動法の開発と応用展開 (国際交流奨励賞受賞講演)、第 63 回日本電気泳動学会総会、2012 年 8 月 20 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

②松野裕樹、Supported Molecular Matrix Electrophoresis: development of a new concept of membrane electrophoresis and its application to glycosciences、Genomic Sciences Research Complex (GSC) セミナー 2012、2012 年 7 月 6 日、理研横浜研究所 (神奈川県横浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-glyco/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 裕樹 (MATSUNO YU-KI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：40613550