

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24655055

研究課題名(和文)個別化医療センシング技術の構築を目指す免疫細胞型バイオセンサー電極の作製

研究課題名(英文)Preparation of immunocell-type biosensor electrodes aiming to create sensing technology for individual medicine

研究代表者

秋葉 宇一 (AKIBA, Uichi)

秋田大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60184107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗原決定基とTEMPOのアセチレン誘導体をアダマンタン自己組織化単分子膜(Ad-SAM)表面に効率よく化学修飾するために、2種類の異なるクリック反応性官能基、アジド基とチオール基をそれぞれ有するAd-SAM膜物質を合成した。TEMPO-アセチレン誘導体とのアジド-アセチレン結合に基づくクリック反応によってAd-SAM表面上のアジド基は、効率よくしかも簡便にTEMPO誘導体を化学修飾できるので、この修飾法は多様な電極機能界面を形成するために極めて有効であることを明らかにした。さらに、ダブルクリック反応性混合Ad-SAM電極機能界面のプラットフォームが簡便に形成でき得るので本研究に利用できる。

研究成果の概要(英文)：Two types of Ad-SAM materials with different click-reaction functionalities, azide and thiol, were synthesized in order to be efficiently modified on the surface of Ad-SAM with TEMPO-acetylene and antigen determinant derivative, respectively. Ad-SAM with azide group on the surface can be efficiently and conveniently modified with TEMPO derivative, and thus it appeared that this modification technique is extremely effective for forming various functional interfaces on electrodes. Moreover, when such an Ad-SAMs is formed using mixtures of these two types of click reactive Ad-SAM materials, various platforms of functional electrode interfaces could be easily formed on the surfaces with double click reactivity, and therefore could be available to prepare the biosensor electrodes proposed in this study.

研究分野：電気化学、超分子化学、ナノテクノロジー

キーワード：レドックスメディエーター アダマンタン自己組織化単分子膜 クリック反応 電極機能界面

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者は分子機能界面の研究でアダマンタン分子構造に基づく新規な自己組織化単分子膜の形成を見いだしてきた (Geometry for Self-Assembling of Spherical Hydrocarbon Cages with Methane Thiulates on Au(111), Fujii, S., Akiba, U., Fujihira, M., *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2002, 13629-13635.)。アダマンタン自己組織化単分子膜の顕著な特徴は、膜厚が約 1 nm という超薄膜でありながら高度な自己組織化秩序構造をもつ単分子膜が金電極上に自発的に形成される点にある。最近、アダマンタン自己組織化単分子膜上に機能性分子を表面クリック反応によって効率よく表面化学修飾することが可能であることが実証されて、多様な抗原化学修飾表面をもつナノバイオ機能界面のボトムアップ分子構築への足場としての利用を検討している。さらに、生体中での役割が注目されている過酸化水素を効率よく酸化触媒する電気化学的メディエーター化学修飾電極を作製でき得ることが明らかになってきた。本研究は、次世代バイオセンサーの構築のためのこのような要素技術の蓄積が契機となり、過酸化水素を電気化学的検出シグナルとする免疫細胞型バイオセンサー電極の作製の着想に至った。

2. 研究の目的

(1)本研究の目的は、現状の高価で不安定な精製抗体に替わる生体分子認識材料として、抗体産生細胞である免疫 B 細胞表面上の抗原レセプターをそのままの状態で免疫センサーの分子認識機能素子として利用して、免疫細胞型バイオセンサー電極を作製することにある。

(2)本研究では分子認識機能の構造単位として免疫細胞を利用して新しい免疫細胞型バイオセンサー電極を作製する。免疫細胞は高度な自己免疫機能を有し、個人レベルの特異性を発現する個人に固有の機能構造単位とみなすことができる。免疫細胞そのものを免疫細胞型バイオセンサーの認識機能素子として利用して、将来の個別化センシング技術の可能性を実証する点にこれまでに研究事例のない着眼点であると考えられる。申請者らは、これまで剛直な超薄膜構造で規制されたアダマンタン自己組織化単分子膜の作製に関する研究を独自の分子設計のアイデアに基づき実施してきた。本研究では、この表面分子化学修飾技術を免疫細胞機能界面の形成の足場構造(プラットフォーム)として用いることによって、超薄膜なアダマンタン自己組織化単分子膜表面上にセンシング標的抗原決定基の密度と分布を的確に制御・評価しながら化学修飾することが可能になる。このような分子レベルでの精密なボトムアップ表面分子化学修飾技術は、汎用的に用いられている柔軟な炭化水素鎖からなるアルカン自己組織化単分子膜では達成が困難と予

想される。さらに、作製した合成抗原決定基化学修飾電極上に免疫 B 細胞が、自身の膜表面上に提示される抗原レセプターとの抗原-抗体反応を介した多点認識によって特異的に固定化されるという原理に基づき、免疫 B 細胞機能電極を構築する。したがって、本研究は、このような精密な表面分子化学修飾技術の達成を通じて、安価で簡便ではあるが精密なボトムアップ表面超分子構築法によって、個人に固有の免疫細胞型バイオセンサーを作製することを最終目標とする。

(3)本研究で着目するのは、免疫 B 細胞が有する細胞膜機能であり、それは標的抗原決定基と抗原-抗体反応するための抗原レセプターが免疫 B 細胞膜上に提示されるという免疫 B 細胞が有する興味深い生命現象にある。この特徴を本研究のような着眼点で免疫細胞型バイオセンサーの形で個別化医療技術に発展させるという発想に基づく研究事例は他にこれまで全く見当たらない。抗体分子を利用する現行の免疫センサーでは、分子認識機能を担う特異抗体分子が一般に化学的安定性を欠き、仮に、少数でしか需要がないような特殊抗体をオーダーメイドするならば、極めて高額な製造コストを要するという製造技術的ジレンマをかかえている。すなわち、抗体試薬を標的認識素子として利用する現行の免疫バイオアッセイ技術の大きな課題は、個別化医療に対応したオーダーメイド抗体試薬の供給が現実的には困難なこと、及び特殊でかつ化学的に不安定な抗体試薬の高価な製造コストにある。したがって、精製抗体技術に依存した現行の医療センシング方法論では将来の個別化医療センシング技術には発展できないと予想される。個別化医療センシング技術は、個別化医療社会の実現を加速する重要なインフラ基盤技術のひとつであることは明らかである。しかし、このためのセンシング技術は化学・バイオセンサー分野においては現在のところ全く手つかずの研究課題である。したがって、これに代替する新しい戦略的な技術革新が今後不可欠であると予想される。ここ数年で細胞機能そのものを精巧で高感度なセンシングデバイスとみなし、センシング機能素子としてバイオセンサーに利用する研究が活発になってきた。しかし現在、そのような研究のほとんどの着想は感覚器官等で機能するセンサー細胞、あるいは遺伝子組み換え技術を利用して人工的にセンシングに必要な機能を付与した改造細胞にある。本研究のように、個人固有の生命機能単位としての視点から免疫 B 細胞そのものに着目し、次世代の個別化医療センシング技術の構築を目指して免疫細胞型バイオセンサー電極の作製を実施した研究例は報告されていない。本研究で提案する免疫細胞型バイオセンサー電極の作製では、センシング標的とする安定な抗原決定基を化学合成によって確実かつ安価に製造することが原理的に可能である。したがっ

て、その合成抗原決定基を用いて免疫細胞型バイオセンサーを再現性よく簡便に作製する技術基盤をアダマンタン自己組織化単分子膜形成という精密な表面分子化学修飾技術の方法論に求め、安価な電気化学的センシングデバイスの形で実現する。これによって、次世代の個別化医療センシング技術の発展を目指す。

3. 研究の方法

(1) 既存のがん抗原として知られている種々の糖鎖に基づくアセチレン誘導体の合成を行い、このがん抗原を表面にアジド基をもつアダマンタン自己組織化単分子膜(Ad-SAM)にクリック反応で効率よく化学修飾する。そして、免疫B細胞の特異的な固定化を検討する。

(2) 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-N-oxyl (TEMPO)のアセチレン誘導体を過酸化水素に対する電気化学的酸化メディエーターとして選び、そのアセチレン誘導体の合成を検討する。また、アジド基をもつ Ad-SAM 膜物質を合成して、クリック反応によって Ad-SAM 修飾電極上のアジド基とアセチレン誘導体を簡便に化学結合する修飾法を検討する。

(3) 作製した TEMPO を膜表面に有する Ad-SAM 修飾電極の過酸化水素に対する電極触媒能を電気化学計測によって明らかにする。

(4) 別に、2個のチオール基を有する Ad-SAM 膜物質を合成する。そして、アジド基をもつ Ad-SAM 膜物質との混合溶液を用いて、アジド基とチオール基の両クリック反応性官能基を表面に有する混合 Ad-SAM 電極の作製を検討する。

(5) アジド基とチオール基の両クリック反応性官能基からなる混合 Ad-SAM 電極をプラットフォームとして、がん抗原、そしてその次に免疫B細胞を順に特異的に固定化して免疫細胞型バイオセンサー電極の作製を検討する。

(6) このように作製した免疫細胞型バイオセンサー電極に標的がん細胞を特異的に結合させて、がん細胞が大量に分泌する過酸化水素の酸化電流を検出シグナルとしてアンペロメトリック計測して、作製した免疫細胞型バイオ電極センサーの有効性を検討する。

4. 研究成果

(1) 免疫B細胞膜上の抗原レセプターと抗原-抗体反応をするがん抗原決定基として最も単純な分子構造をもつ D-グルコサミンを選び、そのアセチレン誘導体の合成を種々検討したが、本研究期間内にその安定な誘導体の化学合成が完了せず、免疫細胞型バイオセンサー電極の作製まで研究を進展できなかった。

(2) 合成する抗原決定基のアセチレン誘導体を Ad-SAM 電極表面上に効率よく化学修飾

するために、クリック反応性官能基を有する Ad-SAM 膜物質の2種類を合成した。その一つは、アジド基を有する Ad-SAM 膜物質である。金電極上に形成したアジド基を表面にもつクリック反応性 Ad-SAM 電極は、過酸化水素を酸化するレドックスメディエーターとして機能する安定なニトロキシラジカルである TEMPO のアセチレン誘導体とのアジド-アセチレン結合に基づくクリック反応によって、Ad-SAM 電極表面上のアジド基に対して約76%の高い表面修飾率で効率よく、しかも簡便に化学修飾できることを電気化学測定より確認し、本研究の電極作製で有効に活用できる電極機能界面のプラットフォームを形成する要素技術の一つであることを明らかにした(図1)。さらに、作製した TEMPO

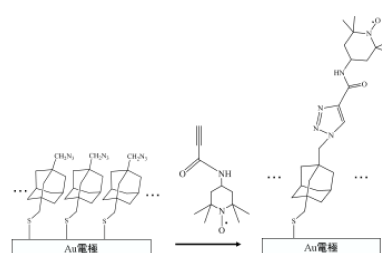


図1. アジド基を表面にもつ Ad-SAM の TEMPO-アセチレン誘導体との表面クリック反応による化学修飾の模式図

を有する Ad-SAM 電極の検出シグナルである過酸化水素に対する酸化メディエーターとしての性能を電気化学計測によって評価した。その結果、種々の酵素センサーの基板材料として広く用いられ、過酸化水素の酸化触媒能を本来有している白金電極と同程度の過酸化水素に対するレドックス酸化触媒能をもつことが明らかになった。

(3) また、もう一つのタイプのクリック反応性官能基としては、チオール基を有する Ad-SAM 膜物質を合成した。アジド基およびチオール基の2種類の Ad-SAM 膜物質を混合した溶液よりダブルクリック反応性混合 Ad-SAM 電極機能界面のプラットフォームを簡便に形成でき得ることから、2種類の異なるクリック反応条件を制御することによって、免疫細胞の特異的な固定化を行うためのがん抗原決定基の化学修飾、そして特異的に接着した標的がん細胞から大量に分泌する過酸化水素を電気化学的に計測するための TEMPO レドックスメディエーターの Ad-SAM 表面上への高効率な化学修飾が順番に可能になる。したがって、本研究で免疫細胞型バイオセンサー電極機能界面のプラットフォームを形成する要素技術が得られた。今後は、この修飾法を用いて適切なクリック官能基を導入した種々のがん抗原決定基誘導体を合成して、免疫細胞型バイオセンサー電極の作製が実現できると期待される。

(3) 本研究で達成した免疫細胞型バイオセンサー電極機能界面のプラットフォームを形

成する要素技術は、電極サイズのナノ化をはかることによって単一細胞レベルでの高感度で特異的な局所計測を可能にする様々なナノ電極センサーの開発へ研究発展できる。また、本研究で構築するセンサーデバイスでも過酸化水素検出用の電極プローブとして役立つことが期待される。そこで、Sutter社 プラ- P-2000 装置によって作ったナノキャピラリーをホルダーとして用いた金ナノ電極の簡便な作製法の検討もあわせて行った。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~synsupra/research.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋葉 宇一 (AKIBA, Uichi)

秋田大学・工学(系)研究科(研究院)准教授

研究者番号: 60184107