

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289290

研究課題名(和文) 動的ナノ界面を識別するダイナミック抗体の創出：分子が躍動するバイオMEMS

研究課題名(英文) Bio-MEMS with reversible antibody on sensor chip

研究代表者

梅津 光央 (Umetsu, Mitsuo)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70333846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：微小化学分析システムを組み入れたバイオMEMSは、細胞内の連鎖化学反応や蛋白質間相互作用によるシグナル伝達を模倣できる微小実験プラットフォームとして期待できる。しかし、そのためには、細胞内での蛋白質の局在化と移動挙動を模倣するために、複数種の蛋白質をマイクロ流路の適切な位置へ各々配置し、かつ、蛋白質を自在にキャッチ&リリースする仕組みが必要である。そこで本研究では、有機・無機材料に特異的に結合するペプチドや抗体に外的環境変化によって可逆的脱着できる機能を付加することによって、外的環境変化によってバイオ分子を繰り返しキャッチ&リリースできる方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Microelectromechanical system for biology has the potential for reconstituting chain chemical reaction and protein-protein interaction in cell. However, for the construction of cell in MEMS, The ways to immobilize a protein on a specific position on MEMS and to irrepressibly immobilize proteins on MEMS should be studies. In this study, we evaluated material-binding peptide to the peptide with reversible binding to material surfaces. The peptide could be reversibly bound by the change of ionic strength in solution.

研究分野：生体機能化学

キーワード：ペプチド タンパク質 ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

各種精密機器に利用されている微小電気機械システム(MEMS)は、そのプラットフォームに核酸、蛋白質、細胞などのバイオ素材を固定・構造化することによって、外部信号とバイオ素材が双方応答するセンシングデバイスやバイオマシンとなる。膨大な遺伝子情報が蓄積されている現在、遺伝子がコードする蛋白質間の動的相互関連を包括的に理解するシステム生物学が生まれ、微小化学分析システムを組み入れたバイオ MEMS は、細胞内の連鎖化学反応や蛋白質間相互作用によるシグナル伝達を模倣できる微小実験プラットフォームとして期待できる。しかし、そのためには、細胞内での蛋白質の局在化と移動挙動を模倣するために、複数種の蛋白質をマイクロ流路の適切な位置へ各々配置し、かつ、蛋白質を自在にキャッチ&リリースする仕組みが必要である。その中で我々は、これまで有機・無機材料表面を標的とできるペプチド・抗体分子の創出と、混合操作や溶液フロー操作のみでの蛋白質やナノ粒子のナノパターニングに成功してきた。このペプチド・抗体に外部の刺激によって繰り返し接合&脱離ができるダイナミックな接合分子が開発できれば、目的バイオ MEMS を単純な構造で作製できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、抗体の分子認識場を外的環境によって界面環境が変化する有機・無機材料界面まで拡張し、その変化によって親和性が応答するダイナミックなペプチドや抗体の取得を行う。そして、外的環境変化によってバイオ分子を繰り返しキャッチ&リリースできる動的躍動的なバイオ MEMS を提案する。

3. 研究の方法

(1) 材料表面へ結合するペプチドの取得  
ペプチドファージライブラリーを用いて、標的材料へ対して結合するペプチドを取得する。

(2) 外的環境によって可逆的に脱着できるペプチドの同定

(1)で選択した候補分子の中から外的環境を変化させることによって、可逆的に脱着できる分子の同定を行う。

(3) 混合操作やフロー操作による接合分子の可逆的脱着

(1)もしくはこれまで作製してきた材料結合性分子を用いて外的環境の変化で可逆できる接合分子を設計する。

4. 研究成果

(1) 材料表面へ結合するペプチドの取得

まず初めに、有機薄膜へ結合するペプチドの取得を目指して、パリレンとセルロースを標的として実施した。ペプチド取得の方法は、アミノ酸残基数 12 個のペプチドを骨格として、10 の 9 乗程度の規模を持つペプチドファージライブラリーを用いた工選択操作(ファージ提示法)で行った。

ファージ提示法では、緩衝液中でペプチドファージライブラリーと標的材料を混合・洗浄後に溶出操作を行い、標的材料へ結合したペプチドを提示しているファージを取得する。パリレンに対するペプチド選択では、溶出操作として pH 変化とイオン強度変化を用いて行ったところ、数種類のペプチド候補が見つかった。そこで、ファージが融合していないペプチドを別途調製し、パリレンに対する結合活性を評価したところ、解離定数が数 mM 程度のペプチドを同定することができたが、外的環境変化によって明確な結合活性の変化は見られなかった。

一方、結晶セルロース Avicel を標的とした場合、溶出操作としてイオン強度変化によるファージの解離と酵素によるセルロース分解の操作を試みた。その結果、イオン強度変化による溶出において、3,4 回目の選択操作後における残存ファージの配列解析から特定の配列(AviBPn1~4)を提示する 4 種のクローンが濃縮されているのを確認した(表 1)。そこで、これらのペプチドをファージが融合していない形で別途調製し、Avicel に対する結合活性を評価した。その結果、AviBPn4 は、解離定数が数 μM 程度の親和性で結合することが分かった。

表 1. 結晶セルロースへ結合陽性なペプチド

溶出液	ラウンド数	ペプチド名	ペプチド配列	濃縮率
2 M NaCl (塩溶出)	4	AviBP <sub>1</sub>	D S Q F N K Y S I A T V	7/64
		AviBP <sub>2</sub>	D W S S W V Y R D P Q T	1/64
		AviBP <sub>3</sub>	A Y P Q K F N N F M S	48/64
		ペプチド非提示		4/64
	3	非特異吸着ペプチド		1/64
		解読不能		3/64
		AviBP <sub>3</sub>	A Y P Q K F N N F M S	14/64
		AviBP <sub>4</sub>	H S D A T V R F A H R E	36/64
		その他ペプチド		11/64
		解読不能		3/64

(2) 外的環境によって可逆的に脱着できるペプチドの同定

次に、結晶セルロースへ結合陽性なペプチドの外的環境による結合親和性の変化を測定するために、溶液のイオン強度を様々に変化させ溶液によって測定したところ、AviBPn4 の結合はイオン強度の変化に鋭敏に反応した。その結果、AviBPn4 は酢酸を含む緩衝水溶液でのみ結合性を示すことが分かり、緩衝溶液の濃度変化で可逆的に脱着できる接合分子を設計できることが示唆された。過去の研究で、酸化亜鉛に吸着するペプチドは、リン酸濃度が増加することが示唆されて

いた。しかし、今回の結果はイオン強度の減少がペプチドの親和性を低下させることを示しており、イオン強度の増加が必ずしもペプチドの親和性を低下させる方向だけに働くと言えないことが分かった。

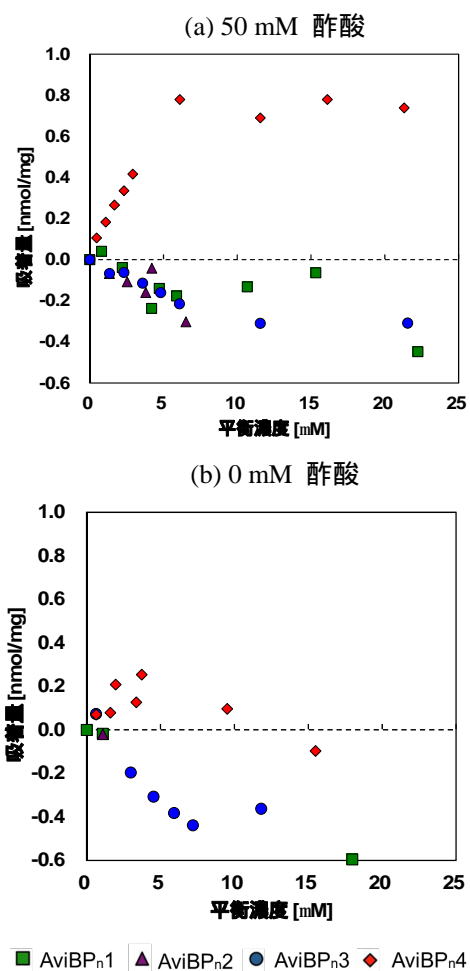
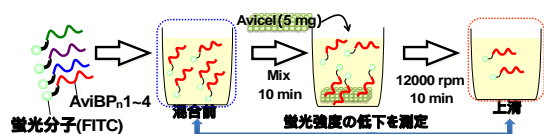


図 2. 結晶セルロースに対する吸着等温線

### (3) 混合操作やフロー操作による接合分子の可逆的脱着

固相へ結合する機能をもつペプチド・タンパク質及びそのペプチドから作製した抗体を核として、単純な混合操作やフロー操作により蛍光タンパク質や抗体分子を固定化することを試みた。その結果、有機材料と無機材料の両材料面において目的抗体分子を材料表面に活性を保持したまま固定化することに成功した。

次に、溶液の組成変化によって固相へ結合しているペプチド・タンパク質の可逆的な固定化と脱離を試みた。その結果、pH の変化では、固相結合ペプチド・タンパク質の可逆的

脱着をさせることはできたが、固相結合ペプチド・タンパク質を介して結合させたタンパク質の機能が失活する時があることが分かった。そこで、pH はあまり変化させず溶液のイオン強度を変化させることによって、固相結合ペプチド・タンパク質の可逆的脱着を試みたところ、系に用いているすべてのタンパク質の機能を不可逆的な失活をさせずに固相結合ペプチド・タンパク質の脱着をさせることができた。また、タンパク質の固定化量の可逆性も評価した結果、可逆的操作による脱着を繰り返してもタンパク質の固定化量は変化しないことも分かった。

## 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 9 件)

1. Teppei Niide, Kyohei Ozawa, Hikaru Nakazawa, Oliveira Daniel, Hitoshi Kasai, Mari Onodera, Ryutarō Asano, Izumi Kumagai, and Mitsuo Umetsu, Organic crystal-binding peptide: Morphology control and one-pot formation of protein-displaying organic crystals, *Nanoscale*, 7, 20155-20163 (2015). 査読有  
DOI: 10.1039/c5nr06471f
2. Aurélien Sikora, Filippo Federici Canova, Kyongwan Kim, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, Tadafumi Adschiri, Wonmuk Hwang, and Winfried Teizer, Behavior of Kinesin Driven Quantum Dots Trapped in a Microtubule Loop, *ACS Nano*, 9, 11003-11013 (2015). 査読有  
DOI: 10.1021/acsnano.5b04348
3. Aurélien Sikora, Javier Ramón-Azcón, Mustafa Sen, Kyongwan Kim, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, and Winfried Teizer, Microtubule guiding in a multi-walled carbon nanotube circuit, *Biomedical Microdevices*, 17, 78 (1-6) (2015). 査読有  
DOI: 10.1007/s10544-015-9978-1
4. Aurélien Sikora, Javier Ramón-Azcón, Kyongwan Kim, Kelley Reaves, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, Tadafumi Adschiri, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Wonmuk Hwang, and Winfried Teizer, Molecular Motor-Powered Shuttles along Multi-walled Carbon Nanotube Tracks, *Nano Letters*, 14, 876-881 (2014). 査読有  
DOI: 10.1021/nl4042388
5. Kyongwan Kim, Aurélien Sikora, Koji S. Nakayama, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, Wonmuk Hwang, and Winfried Teizer, Functional localization of kinesin/microtubule-based motility system

- along metallic glass microwires, Applied Physics Letters, 105, 143701 (2014). 査読有  
DOI: 10.1063/1.4896964
6. Keiko Tawa, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, Takamitsu Hattori, and Izumi Kumagai, Application of 300x enhanced-fluorescence on a plasmonic chip modified with bispecific antibody to a sensitive immunosensor, ACS Applied Materials & Interfaces, 5, 8628-8632 (2013). 査読有  
DOI: 10.1021/am402173y
  7. Hikaru Nakazawa, Do-Myoung Kim, Takeshi Matsuyama, Nobuhiro Ishida, Akinori Ikeuchi, Yuri Ishigaki, Izumi Kumagai, and Mitsuo Umetsu, Hybrid nanocellulosome design from cellulase modules on nanoparticles: Synergistic effect of catalytically divergent cellulase modules on cellulose degradation activity, ACS Catalysis, 3, 1342-1348 (2013). 査読有  
DOI: 10.1021/cs400012v
  8. Hikaru Nakazawa, Akinori Ikeuchi, Do-Myoung Kim, Yuri Ishigaki, Hidetaka Asano, Katsunori Kouda, Izumi Kumagai, and Mitsuo Umetsu, Biomass-binding peptides designed by molecular evolution for efficient degradation of cellulose in biomass by cellulase, Green Chemistry, 15, 365-369 (2013). 査読有  
DOI: 10.1039/c2gc36914a
  9. Hikaru Nakazawa, Rui Todokoro, Yuri Ishigaki, Izumi Kumagai, and Mitsuo Umetsu, In-one-pot-at-a-time ligation for high-throughput construction of a protein expression vector library, Chemistry letters, 42, 424-426 (2013). 査読有  
DOI: 10.1246/cl.2013.424

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Takuma Sujino, Hikaru Nakazawa, Keiko Tawa, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu, Recombinant small antibody design for plasmonic biosensor using camel antibody with affinity for target inorganic material, Pacifichem2015, 2016 年 12 月 18 日, Honolulu, U.S.A.
2. Mitsuo Umetsu, Plasmonic and nanoporous membrane formation by material-binding bispecific antibodies, 2st France-Japan Symposium on Green-Materials and Advanced Characterization (GMAC2015), 2015 年 8 月 31 日, University of Tsukuba, Tsukuba
3. Mitsuo Umetsu, Biotechnology meets inorganic nanomaterials, Tohoku University's chemistry Summer School 2015, 2015 年 8 月 28 日, Tohoku University, Sendai
4. 梅津 光央, タンパク質工学とナノ材料工学の相補完によるボトムアップ素子設計,

- ナノ学会第 13 回大会, 2015 年 5 月 11 日, 東北大学, 仙台
5. 梅津 光央, スマートバイオデザイン: ガラパゴスなバイオ分子を使いこなす, 山形大学理学部セミナー, 2015 年 2 月 10 日, 山形大学, 山形
  6. 梅津 光央, ペプチドから抗体そしてインターフェイス分子への階層設計: ナノ世界の糊として, 第 37 回分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜, 横浜
  7. 筋野 拓馬, 笹川 知里, 中澤 光, 田和 圭子, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 梅津 光央, Smart interface antibody design for biosensor, 第 52 回日本生物物理学会年会, 2014 年 9 月 26 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌
  8. Takuma Sujino, Hikaru Nakazawa, Keiko Tawa, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu, Convenient antibody design for plasmonic biosensor using camel antibody with affinity for inorganic material, 248th ACS National Meeting & Exposition Submission Confirmation, 2014 年 8 月 12 日, San Francisco, U.S.A.
  9. 筋野 拓馬, 笹川 知里, 中澤 光, 田和 圭子, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 梅津 光央, 無機基板を抗原としたラクダ抗体から発想するバイオセンサー指向二重特異性抗体の設計, 生体機能関連化学部会若手の会 第 26 回サマースクール, 2014 年 7 月 25 日, ラフォーレ蔵王, 刈田郡蔵王町
  10. 筋野 拓馬, 中澤 光, 田和 圭子, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 梅津 光央, 無機基板を抗原としたラクダ抗体から発想するバイオセンサー指向インターフェイス設計, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 27 日, 横浜産貿ホールマリネリア, 横浜
  11. 藤井 滉人, 筋野 拓馬, 中澤 光, 真鍋 法義, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 梅津 光央, 一本鎖抗体の自発的二量体化から発想するラクダ可変領域シングルドメインを利用した多重特異性多価抗体, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 27 日, 名古屋大学, 名古屋
  12. 梅津 光央, 抗体フォールドを用いたインターフェイスデザイン: ナノ世界の糊として, 未来化学創造センター ナノバイオアセンブリワークショップ, 2013 年 11 月 15 日, 福岡市産学連携交流センター, 福岡
  13. 梅津 光央, 藤井 滉人, 筋野 拓馬, 真鍋 法義, 中澤 光, 田中 良和, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 一本鎖抗体の自己会合特性を活かした多価・多重特異性抗体設計, 化学工学会第 79 年会, 2014 年 3 月 20 日, 岐阜大学, 岐阜
  14. Mitsuo Umetsu, Smart bio-design for interface molecules between nanomaterials, International of Symposium for the 70th

Anniversary of the Tohoku Branch of the  
Chemical Society of Japan, 2013年9月28  
日, Tohoku University, Sendai

15. 梅津 光央, ナノを意識した蛋白質スマートデザイン, 生体機能関連化学部会 第28回若手フォーラム, 2013年9月26日, 名古屋大学, 名古屋
16. 梅津 光央, 田和 圭子, 中澤 光, 筋野 拓馬, 服部 峰充, 材料標的抗体を錨としたバイオセンサー指向インターフェイス設計, 化学工学会 第45回秋季大会, 2013年9月16日, 岡山大学, 岡山

〔図書〕(計 1 件)

1. 梅津 光央, 中澤 光, 服部 峰充, エヌ・ティイー・エス社, 『進化分子工学』第1章 構造情報と進化工学的アプローチがもたらした建設的タンパク質設計, 2014, 27-37.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~prn/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅津 光央 (UMETSU, MITSUO)  
東北大学大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 70333846

### (2) 研究分担者

松井 淳 (MATSUI, JUN)  
山形大学理学部・准教授  
研究者番号: 50361184

長峯 邦明 (NAGAMINE, KUNIAKI)  
東北大学大学院工学研究科・助教  
研究者番号: 00551540

### (3) 連携研究者

西澤 松彦 (NISHIZAWA, MASAHIKO)  
東北大学大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 20273592