



大阪大学産業科学研究所 飯嶋 益巳

バイオセンサー表層におけるセンシング分子のナノレベル精密整列化に関する研究

はじめに

バイオセンサーは、生体分子間相互作用（例：抗原と抗体、リガンドとレセプター、レクチンと糖鎖、標的分子とアプタマー、基質と酵素等）を特異的かつ定量的に検出する測定技術であり、農芸化学分野をはじめ生命科学分野全般において極めて重要な役割を担っている。一般に、センシング分子（例：イムノグロブリン G (IgG)）をセンサー表面に直接固定化すると、その配向性がランダムなため、抗原認識部位周辺の立体障害により、検出感度が低いことが課題となる。そこで近年、バイオセンサーの感度を高めるために、センサー表面のセンシング分子の「クラスター化」と、その配向性をナノレベルで精密に制御して「整列固定化」できる「足場分子」技術が開発されている¹⁾。私が研究を始めた2007年時点では、主にリンカー、ポリマー、自己組織化単分子膜、Protein A等の足場分子が用いられたが、同分子がランダムに固定化されたり、同分子とセンシング分子間の可動性が高かったり、同分子との結合が侵襲的であったりした。そこで私は、バイオセンサー表面でセンシング分子にダメージを与えず、ナノレベルで完全な精密整列化を可能にする足場分子技術の開発に取り組むことにした。

1. 足場分子としてのバイオナノカプセルの開発

バイオナノカプセル (bio-nanocapsule (BNC)) は、B型肝炎ウイルス表面抗原 L タンパク質を酵母で過剰発現することにより、酵母小胞体膜由来リボソームに同タンパク質が約120分子埋め込まれて形成される、直径約30 nm の中空ナノ粒子である²⁾。BNC は、耐酸性、耐アルカリ性、耐熱性、耐界面活性剤性に優れ³⁾、我々により遺伝子及び薬剤の生体内ピンポイント送達用ナノキャリアとして開発されてきた。L タンパク質の N 末端領域の一部を、Protein A 由来 IgG-Fc 結合 Z ドメイン (2 量体) に置換した ZZ-L タンパク質から構成される ZZ-BNC は (図1)、抗原特異的 IgG を表層に提示して、生体内の任意の部位にピンポイント物質送達できる⁴⁾。そこで私は、ZZ-BNC が IgG の抗原結合能を劣化させずに表層へ Fc を繋ぎ止め、Fv を放射状に整列化して提示できる可能性に着目した。まず、ZZ-BNC と各種 IgG との結合能を水晶発振子微量天秤 (quartz crystal microbalance (QCM)) 法により測定した結果、1 粒子あたり約60分子の IgG を提示していた⁵⁾。さらに、高速原子間力顕微鏡を用いた動画解析により、ZZ-BNC 上の IgG は Fc

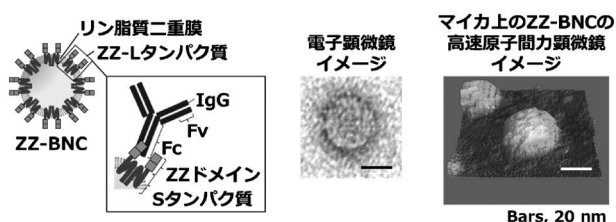


図1. ZZ-BNC 足場分子の構造

を支点とするブラウン回転運動を行い (平均速度0.92 nm/s, 最大角度44°), Fv の抗原へのアクセスを容易にしていた。以上より、ZZ-BNC が全く新しいタイプの IgG 整列化用足場分子であることを世界で初めて実証した⁶⁾。以下に、各種バイオセンシング技術における ZZ-BNC の効果を紹介する。

2. 液相中での IgG のクラスター化とナノレベル精密整列化

2-1. ELISA 法及びウェスタンブロット法

固相上抗原を、一次抗体と酵素標識二次抗体で検出する系において、予め酵素標識二次抗体と ZZ-BNC を混合した複合体 (図2A①) を添加することで、固相抗原の高感度検出を可能にした (対 ZZ-BNC 不使用時: 最大約20倍 (ELISA 法), 約100倍 (ウェスタン法)^{7,8)}。

2-2. 蛍光免疫測定法

固相上抗原を、一次抗体と蛍光標識二次抗体で検出する系において、予め一次抗体と蛍光色素標識 ZZ-BNC を混合した複合体 (図2A①) を添加することで、抗原の高感度検出を可能にした (対 ZZ-BNC 不使用時: 最大約10倍)⁹⁾。特筆すべきは、従来は同一試料に含まれる複数の抗原を同時に検出する場合、各一次抗体の動物種と抗体サブタイプの重複を避け、それぞれに対応する二次抗体を探す必要があったが、予め異なる4種類の抗原に結合する同じ動物種由来の一次抗体と、4種類の蛍光色素で標識した ZZ-BNC をそれぞれ混合した複合体を作製し、4種類の抗原を含むプロットに同時に添加したところ、各抗原の高感度かつ同時検出を可能にした⁹⁾。本技術 (IRODORI法と命名) により、多重同時染色における従来技術の使用抗体制限の課題が解消できた。以上より、ZZ-BNC は、検出用抗体を表層にクラスター化及びナノレベル精密整列化し、抗体1分子あたりの標識酵素及び蛍光色素の分子数を高めることで高感度検出を可能にすることが判明した。

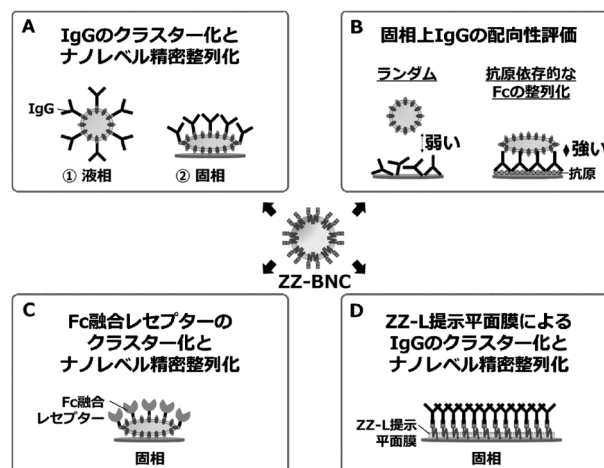


図2. ZZ-BNC 足場分子を用いたバイオセンシング技術への応用

3. バイオセンサー表面における IgG のクラスター化とナノレベル精密整列化

QCM法及び表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance (SPR)) 法のセンサー基板に ZZ-BNC を固定して IgG を整列化提示することで (図2A②), 各種抗原への結合量, 検出感度, 親和性を著しく高め (対 ZZ-BNC 不使用時: 最大約250倍, 130倍, 約3倍) 高感度検出を可能にした⁵⁾. また, QCM法における ZZ-BNC の抗体結合能は, 酸処理による抗体の脱着を20回以上繰り返しても変わらないほど耐久性が高いことを見出した⁵⁾. 以上より, ZZ-BNC はバイオセンサー表面で IgG を劣化させることなくクラスター化及びナノレベル精密整列化して「超高感度化」を達成しつつ, 化学的及び物理的ストレスに対して耐性を示す安定性・保存性の高い足場分子であることが判明した. さらに, ZZ-BNC は高価なセンシング分子の使用量を減らして「低コスト化」を実現すると考えられる.

4. 固相上 IgG の配向性評価

従来高度な分析技術で固相上 IgG の配向性を評価していたが, ZZ-BNC は基板上に抗原依存的に整列固定化された Fc に高い親和性を示すことから, 固相上 IgG の配向性を容易に評価できるプローブであることを示した (図2B)¹⁰⁾. また, 従来は同一エピトープを複数有する抗原を検出するサンドイッチイムノアッセイにおいて, 同じ IgG を固相用及び検出用として同時に使用すると, 二次抗体が両者に結合して抗原依存的な検出が不可能であった. そこで, 二次抗体の代わりに ZZ-BNC を使用すると, ZZ-BNC は抗原と結合した検出用 IgG の Fc とだけ特異的に結合できることから, 簡便かつ高感度検出を可能にしつつ, 従来技術の課題を解消した¹⁰⁾.

5. バイオセンサー表面における Fc 融合レセプターのクラスター化とナノレベル精密整列化

ELISA法, QCM法及び SPR法の固相に ZZ-BNC を固定して, 各種サイトカイン受容体リガンド結合部位を融合したヒト IgG1 Fc を整列提示化することで (図2C), 各種サイトカインの結合量, 検出感度を上昇させ (対 ZZ-BNC 不使用時: 最大約4倍, 46倍) 高感度検出を可能にした¹¹⁾. 以上より, ZZ-BNC 足場分子技術は様々なセンシング分子のクラスター化及び精密整列化に応用展開可能であることを示した.

6. バイオセンサー表面における ZZ-L 提示平面膜による IgG のクラスター化とナノレベル精密整列化

ZZ-BNC は液中においてセンサー基板にドーム状 (約18 nm) に結合して IgG を整列化するが⁶⁾, 基板側の ZZ-BNC を構成する ZZ-L タンパク質が無駄になる. また, 基板表面近傍 (数nm以内) で分子間相互作用を検出する SPR法やエリプソメトリー法等では, ドーム状構造による高さは ZZ-BNC の効果が現れにくいことが課題であった. そこで, ZZ-BNC を破壊して ZZ-L タンパク質を平面膜状に展開する方法を開発し (図2D), 同じ IgG量を使用する ZZ-BNC と比べて約6倍高感度化できることを見出した (投稿準備中). 本平面膜は様々な形状に加工可能であり広範なバイオセンサー技術への応用が期待される.

おわりに

本研究では, 従来, 遺伝子及び薬剤の生体内ピンポイント送達用ナノキャリアとして開発された BNC の構造的特徴に注目して, 画期的なバイオセンシング分子の足場分子を開発した. 今後は, 同足場分子技術を様々なセンシング分子に応用し, バ

イオセンシング全般の飛躍的な機能向上を図ることで, 農芸化学・医療・生命科学分野等の更なる発展に貢献していきたい.

(引用文献)

- 1) M. Iijima & S. Kuroda: Scaffolds for oriented and close-packed immobilization of immunoglobulins. *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 89, p 810-821, (2017).
- 2) S. Kuroda, S. Otaka, T. Miyazaki, M. Nakao & Y. Fujisawa: Hepatitis B virus envelope L protein particles. Synthesis and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, p 1953-1961, (1992).
- 3) T. Yamada, H. Iwabuki, T. Kanno, H. Tanaka, T. Kawai, H. Fukuda, A. Kondo, M. Seno, K. Tanizawa & S. Kuroda: Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1+pre-S2+S) protein. *Vaccine*, Vol. 19, p 3154-3163, (2001).
- 4) H. Matsuo, Y. Yoshimoto, M. Iijima, T. Niimi, J. Jung, S.Y. Jeong, E.K. Choi, T. Sewaki, T. Arakawa & S. Kuroda: Engineered hepatitis B virus surface antigen L protein particles for in vivo active targeting of splenic dendritic cells. *Int. J. Nanomedicine*, Vol. 7, p 3341-3350, (2012).
- 5) M. Iijima, H. Kadoya, S. Hatahira, S. Hiramatsu, G. Jung, A. Martin, J. Quinn, S. Y. Jeong, E. K. Choi, T. Arakawa, F. Hinaiko, M. Kusunoki, N. Yoshimoto, T. Niimi, K. Tanizawa & S. Kuroda: Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein-A for displaying IgGs on immunosensor chips. *Biomaterials*, Vol. 32, p 1455-1464, (2011).
- 6) M. Iijima, M. Somiya, N. Yoshimoto, T. Niimi & S. Kuroda: Nano-visualization of oriented-immobilized IgGs on immunosensors by high-speed atomic force microscopy. *Sci. Rep.*, Vol. 2, p 790, (2012).
- 7) M. Iijima, T. Matsuzaki, H. Kadoya, S. Hatahira, S. Hiramatsu, G. Jung, K. Tanizawa & S. Kuroda: Bionanocapsule-based enzyme-antibody conjugates for enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Biochem.*, Vol. 396, p 257-261, (2010).
- 8) M. Iijima, M. Yamamoto, N. Yoshimoto, T. Niimi & S. Kuroda: Bio-nanocapsules for signal enhancement of alkaline phosphatase-linked immunosorbent assays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 77, p 843-846, (2013).
- 9) M. Iijima, T. Matsuzaki, N. Yoshimoto, T. Niimi, K. Tanizawa & S. Kuroda: Fluorophore-labeled nanocapsules displaying IgG Fc-binding domains for the simultaneous detection of multiple antigens. *Biomaterials*, Vol. 32, p 9011-9020, (2011).
- 10) M. Iijima, N. Yoshimoto, T. Niimi, A. D. Maturana & S. Kuroda: Nanocapsule-based probe for evaluating the orientation of antibodies immobilized on a solid phase. *Analyst*, Vol. 138, p 3470-3477, (2013).
- 11) M. Iijima, N. Yoshimoto, T. Niimi, A. D. Maturana & S. Kuroda: Bio-nanocapsule-based scaffold improves the sensitivity and ligand-binding capacity of mammalian receptors on the sensor chip. *Biotechnol. J.*, Vol. 11, p 805-813, (2016).

謝辞 本研究は, 大阪大学産業科学研究所生体触媒科学研究分野で開始した後, 名古屋大学大学院生命農学研究科産業生命工学研究分野を経て, 大阪大学産業科学研究所生体分子反応科学研究分野において行われたものです. 本研究の機会を与えていただくと共に, 日々ご指導ご鞭撻を賜り, 本賞にご推薦下さいました大阪大学産業科学研究所生体分子反応科学研究分野黒田俊一教授に心より御礼申し上げます. また, 長年にわたりご指導・ご協力下さいました多岐にわたる分野の先生方, 共同研究者, 卒業生, 在学生の方々に深謝致します.