

博士論文

タンパク質と反応性高分子からなる機能性ハイドロゲルの
創製及びマイクロアレイへの応用

平成 20 年度

田中 裕之

略号一覧

AFM (Atomic Force Microscopy)
AIBN (azobisisobutyronitrile)
Au (Gold)
BSA (Bovine Serum Albumin)
CMD (Carboxy Methyl Dextran)
DMF (*N, N'*-Dimethylformamide)
EDC (*N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)
ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
FL (Fluorescence)
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)
HRP (Horse Radish Peroxidase)
IgG (Immuno Globulin G)
MW (Molecular Weight)
MWCO (Molecular Weight Cut Off)
NAM (*N*-acryloylmorpholine)
NAS (*N*-acryloxysuccinimide)
NHS (*N*-hydroxysuccinimide)
NMR (Nucleic Magnetic Resonance)
PAA (Poly Acrylic Acid)
PBS (Phosphate-Buffered Saline)
PBST (Phosphate-Buffered Saline Tween 20)
QOL (Quality of Life)
RT (Room Temperature)
SA (Streptavidin)
SAM (Self Assembled Monolayer)
SEC (Size Exclusion Chromatography)

SEM (Scanning Electron Microscope)

SPR (Surface Plasmon Resonance)

TEM (Transmission Electron Microscope)

2D (2 Dimensional)

3D NPH (3 Dimensional Nano-structured Protein-based Hydrogel)

目次

| | |
|--|----|
| 第 1 章 緒言----- | 1 |
| 1-1 背景 | 1 |
| 1-2 従来技術と問題点 | 3 |
| 1-3 本研究の目的 | 7 |
| 1-4 引用文献 | 9 |
| 第 2 章----- | 11 |
| ハイドロゲルによる新規タンパク質の 3 次元固定化法の創製及び性能評価 | |
| 2-1 序論 | 12 |
| 2-2 実験方法 | 13 |
| 2-2-1 材料 | 13 |
| 2-2-2 Poly(NAM-co-NAS)の重合及びキャラクタリゼーション | 13 |
| 2-2-3 基板上における 3D NPH の構築 | 14 |
| 2-2-4 3D NPH のキャラクタリゼーション | 14 |
| 2-2-5 Streptavidin の固定化及び Cy3-Biotin-BSA の検出実験 | 15 |
| 2-2-6 Mouse IgG の固定化及び Cy3 蛍光標識 Anti-Mouse IgG F(ab') ₂ の検出 | 16 |
| 2-2-7 Anti-Biotin IgG を用いた場合の 3D NPH | 16 |
| 2-2-8 ポリアクリルアミドハイドロゲルとの比較 | 16 |
| 2-3 結果と考察 | 18 |
| 2-3-1 Poly(NAM-co-NAS)の作製及びキャラクタリゼーション | 18 |
| 2-3-2-1 3D NPH 法によるタンパク質の固定化 | 19 |
| 2-3-2-2 Streptavidin をリガンドタンパク質として固定化 | 21 |
| 2-3-2-3 Mouse IgG をリガンドタンパク質として固定化 | 24 |
| 2-3-3 固定化量の検討 | 24 |
| 2-3-4 特異性の検討 | 26 |

| | | |
|---------------------------------|--------------------------------------|----|
| 2-3-5 | Anti Bitoin 抗体をリガンドタンパク質として固定化 | 28 |
| 2-3-6 | ポリアクリルアミド水ゲルとの比較 | 29 |
| 2-4 | 結論 | 31 |
| 2-5 | 引用文献 | 31 |
| 第3章----- | | 33 |
| タンパク質と反応性ポリマーより形成された水ゲルの構造解析 | | |
| 3-1 | 序論 | 34 |
| 3-2 | 実験方法 | 35 |
| 3-2-1 | 材料 | 35 |
| 3-2-2 | 作製方法 | 35 |
| 3-2-3 | TEMによる断面構造解析 | 35 |
| 3-2-4 | SEMによる断面構造解析 | 35 |
| 3-2-5 | DLSによる Poly(NAM-co-NAS)の流体力学的半径 | 35 |
| 3-2-6 | AFMによる表面観察 | 36 |
| 3-3 | 結果と考察 | 37 |
| 3-3-1 | アナライト分子が作用した 3D NPH の断面構造の TEM による解析 | 37 |
| 3-3-2 | 3D NPH の断面構造の SEM による解析 | 40 |
| 3-3-3 | 3D NPH の表面形状の AFM による解析 | 43 |
| 3-4 | 結論 | 47 |
| 3-5 | 引用文献 | 47 |
| 第4章----- | | 49 |
| 新規固定化法の改良及び微小スポットによるマイクロアレイへの応用 | | |
| 4-1 | 序論 | 50 |
| 4-2 | 実験方法 | 53 |
| 4-2-1 | 材料 | 53 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4-2-2 | 反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)の作製とキャラクタリゼーション | 53 |
| 4-2-3 | Thin 3D NPH-Mouse IgG の作製 | 53 |
| 4-2-4 | SPR によるタンパク質間相互作用の解析 | 53 |
| 4-2-5 | Thin 3D NPH-Mouse IgG の構造解析 | 53 |
| 4-3 | 結果と考察 | 56 |
| 4-3-1 | Thin 3D NPH-Mouse IgG の作製と構造解析 | 56 |
| 4-3-2 | 固定化された Thin 3D NPH-Mouse IgG の解析 | 57 |
| 4-3-3 | AFM による Thin 3D NPH-Mouse IgG の解析 | 59 |
| 4-3-4 | Thin 3D NPH-Mouse IgG を用いたタンパク質アッセイ | 60 |
| 4-3-5 | Thin 3D NPH-Mouse IgG への非特異吸着に関する検討 | 62 |
| 4-3-6 | 3D NPH 断面 TEM 像の比較 | 62 |
| 4-3-7 | 2D、CMD、3D NPH の比較 | 64 |
| 4-4 | 結論 | 65 |
| 4-5 | 引用文献 | 65 |
| 第5章 | 総括----- | 69 |

第 1 章

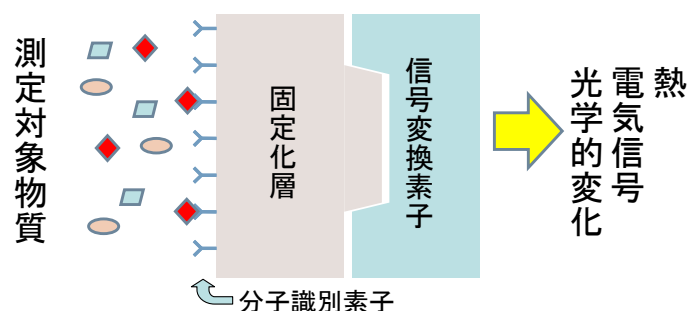
緒言

1-1 背景

現在の日本の医療現場においては、数多くの問題が山積しており、話題が絶えない^[1]。例えば、高齢化社会の到来による患者数の増加、それに伴う医師数の不足が呼ばれている。特に地方においてこの問題は深刻である。また、生活水準の欧米化に伴う肥満者の増加、糖尿病に代表される成人病の増加、発症者の若年齢化、メタボリックシンドロームの蔓延。温暖化等に起因するといわれる感染症の拡大のおそれなど私たちを取り巻く環境の変化の影響も大きい。加えて、世界においても各国それぞれが同様の、またはその国独自の問題を抱えている。そのような状況の中で、早期に疾病を発見し未然に疾病の進行を防ぎ、治療をする予防医療の発展が、それらの問題解決のために現在必要である。そのためには、患者一人一人に適切な診療を行う個別化医療を実現しなければならない。その中には、同時多項目検査、サンプル少量化、低コスト化による患者負担の低減や検査システムの小型化や迅速化による早期診断も含まれる。

そのような中で、バイオセンサーは、医療の様々な分野に大きく貢献している。バイオセンサーとは、生体由来の分子認識機構を利用した化学センサーの総称である^[2]。すなわち、酵素やイオンチャネルなどにより、基質特異的な物質の変化移動に伴う、光学的な変化、熱あるいは化学ポテンシャルを信号変換器で電気信号に変換する装置である(**Figure 1-1**)。一般的に、バイオセンサーの場合、分子認識素子として、生体由来の分子認識能を有する **DNA** やタンパク質をセンサー表面（認識素子固定化層）に固定化することが多い。例えば、**DNA** を固定化することで、相補的に結合する遺伝子を調べることにより、今後どのような病気に罹りやすいかを予測することが可能となる。また、タンパク質を固定化する場合、そのタンパク質と特異的に結合する血液由来のタンパク質を検査することで、血液由来のタンパク質がその時々生体の状況を如実に反映するため、患っている疾患の有無及びその状況、または健康状態を知ることができる。

バイオセンサーの性能が向上することで、検査診断方法の精度をより高めることが可能となる。バイオセンサーに関して、感度、すなわちシグナルとノイズの比率(**S/N 比**)を向上させることはその性能の点で重要な課題である。感度を向上させるには、二つの方法があり、その一つは、シグナルを増加させることで、もう一つは、ノイズを低減させること



- ・分離操作や試薬の前処理が不要
- ・操作が簡単
- ・装置が小型・軽量
- ・時間・費用の節約
- ・結合の強さを測定
- ・微量物質の検出

Figure 1-1 The mechanism of Biosensor

である。その課題を解決することで、S/N比が向上し、感度が上昇する。加えて、バイオセンサーの課題として、特異性がある。特異性とは、血液のような多数の夾雑物を含む検体から目的とする対象のみを検出する性状のことを指す。感度と特異性が向上すれば、バイオセンサーの性能はよりよいものとなる。

さらに、生体内における反応はその多様性から多岐にわたるため、微量の検体から複数の因子を同時に解析するマイクロアレイの技術が必要不可欠であるといわれている^[3-7]。マイクロアレイとは、バイオセンサーの一つである。スライドガラスサイズ(75mm×25mm)の固定化層の上に数多くのバイオサンプルが微小のスポット状(スポット径<250μm)に規則的に配置される。その固定化層上で微量の検体を反応させることで同時に多項目を測定することができる検出系の総称がマイクロアレイである。従来のマイクロプレートを用いた酵素標識免疫測定法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)に代表されるような従来の臨床検査診断法に比べ、マイクロアレイは多くの利点を有する^[4-6](Figure1-2)。例えば、固定化したサンプルのスポット径が微小化されることで、その数、すなわちスポットの集積度は顕著に増加する。そのため、1回の実験から得られる結果の数が飛躍的に向上する。多数の項目を同時測定することで、その検査精度が向上するとされる。さらに、こ

の高集積化する傾向はひとつのスポットあたりに固定化されるサンプル量を低減させる。また、スポットが微小化することで、測定装置を小型化することが可能となる。そのため、Point of Care Testing(POCT)への適用が可能となり、在宅医療への貢献することで利用範囲が広がる。

1-2 従来技術と問題点

近年、DNAを固定化したDNAマイクロアレイは、ヒトのゲノム情報を利用し臨床応用される段階にまで至っている。しかしながら、タンパク質を固定化したプロテインマイクロアレイは、バイオリジカルな相互作用の同時多項目解析にとって欠かすことのできない重要なツールであるにも関わらず、DNAマイクロアレイに比べ克服すべき課題は多いため実用化までは至っていない。タンパク質には、DNAと異なり、固定化によりその活性が低下するという問題がある。さらに、DNAの場合、PCR法などの増幅反応によりシグナルを増幅することが可能であるが、タンパク質の場合は増幅反応がないため、シグナルを向上させることが比較的困難である。また、マイクロアレイの場合、集積度と感度のトレードオフが生じる。単位面積あたりの固定化容量が制限されるため、分子認識素子としてDNAやタンパク質を平面上に固定化する場合、結合容量が低下してしまう。一般的にアレイの集積度が高まるほど、マイクロアレイの感度は低減する結果を引き起こしてきた。加えて、マイクロアレイには、光学的な変化を検出するものが多い。そのため、センサー表面に対して高さ方向の検出範囲に制限を有する場合がある。このような点を克服するために、表面処理の観点からタンパク質の固定化を行った報告について調査したところ、以下のことが判明した。

単位面積あたりの認識素子固定化量を増加させ、反応性を向上させるために、固定化層表面に認識素子であるリガンドタンパク質を3次元的に固定する例があり、2次元でリガンドタンパク質を固定化する方法に比べ、固定量や反応性の点で優れていることが数多く報告されている¹⁴⁾(Table 1)。その中に、具体的な例として固定化層表面に高分子層を形成し、リガンドタンパク質を固定化する試みがある。例えば、CMデキストラン¹⁵⁾、ポリアクリルアミド^{16,17)}、アガロース薄膜¹⁸⁾、ポリアクリル酸ブラシ¹⁹⁾等¹³⁻¹⁷⁾が用いて、固定化層に高分子を塗布し、高分子層を形成させるGrafting ontoや固定化層表面から高分子をグラフトさせるGrafting from法のような表面改質法(Figure 1-3)により高分子層を固定化層表面に形成させ、リガンドタンパク質の固定化が行われてきた。これらの表面処理により、リガンドタンパク質の固定化量を増加させることができ、さらに、高分子層の排除体積効果の影響で表面へのタンパク質の非特異吸着を抑制することが可能となった。

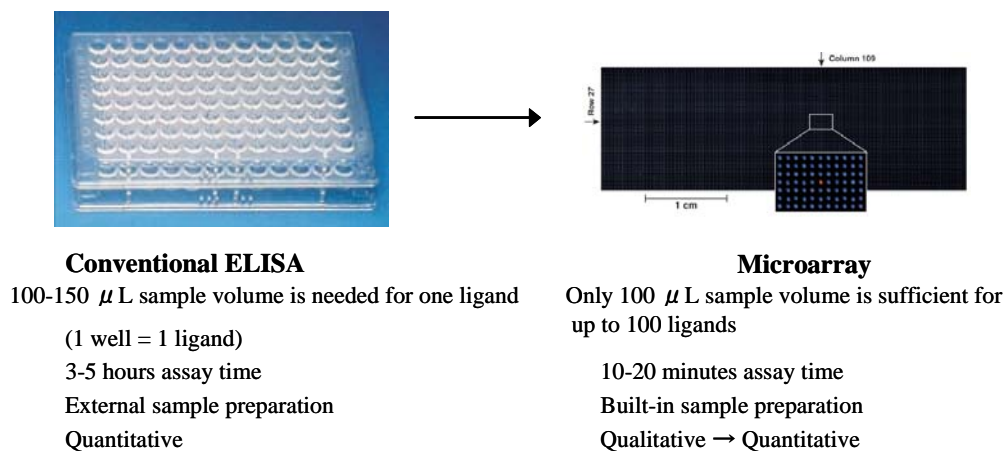


Figure 1-2 The comparison of Multiplexed Immunoassays


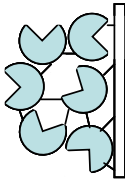
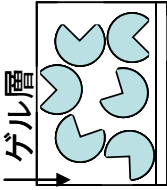
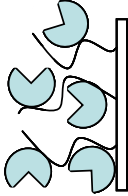
その他の方法のひとつに、ハイドロゲルを用いたタンパク質の固定化方法がある^[18]。すなわち、タンパク質は、超分子ハイドロゲルの 3 次元マトリックス中に固定化される^[19]。プロテインマイクロアレイでハイドロゲルを適用する利点としては、リガンドタンパク質の固定量の増加、他のタンパク質の非特異的な吸着の抑制、タンパク質の活性保持などが挙げられる。ハイドロゲルを利用した場合は、固定化層に直接タンパク質を固定化した場合と比較して数倍程度の検出感度の向上が報告されているが、さらなる検出感度の向上が必要である。

また一方で、様々な実用面において、作製過程が簡便であり、大量生産が可能であることが求められる。例えば、最近、機能性分岐型ポリマーとタンパク質からなるハイドロゲルが 1 工程で作製できることが報告されている^[20]。

しかしながら、リガンドタンパク質の固定化量の増加がリガンドタンパク質と反応するアナライトタンパク質の反応量を向上させるには必ずしも至らなかった。これらの結果は、マストランスファーリミテーションとアナライトタンパク質のハイドロゲルへの接近性の低減により説明されてきた^[4]。マストランスリミテーションとは、3 次元的にタンパク質を固定化した場合、拡散の影響により、高さ方向において反応性に濃度勾配、つまり斑が生じることをいう。加えて、表面改質により、固定化層表面に親水性の高分子層を導入しマイクロアレイに適用した場合、スポットしたサンプルの接触角が低下することでスポットの直径が広がり、アレイの集積度が低減するという問題があった。

以上のことから、これまでのタンパク質の固定化に関連する表面改質には、タンパク質の活性を保持させながらタンパク質の固定化を行い、バイオセンサー、特にプロテイン

Table 1 The comparison of several methods of protein immobilization

| | 平面上での 固定化 | 架橋による 固定化 | ゲルへの 吸着 | 高分子層への 共有結合 |
|---------------|---|---|---|---|
| |  |  |  |  |
| 結合様式 | 物理吸着 共有結合 | 共有結合 | 吸着 | 共有結合 |
| 固定化したタンパク質の状態 | 2次元 | 2, 3次元 | 3次元 | 3次元 |
| 巨大分子の アクセス | 可 | 不可 | 不可 | 困難 |
| 固定化したタンパク質の密度 | 低い | とても高い | 高い | 高い |

マイクロアレイの感度を十分に向上させる例が極めて少ないことが判明した。**Grafting onto** や **Grafting from** 法により、リガンドタンパク質の固定化量を 3 次元的に増加させて感度を向上させることは、拡散の現象から困難であることがわかった。加えて、3 次元固定化した際のタンパク質固定化層の内部断面の構造解析を行った例がないことも判明した。

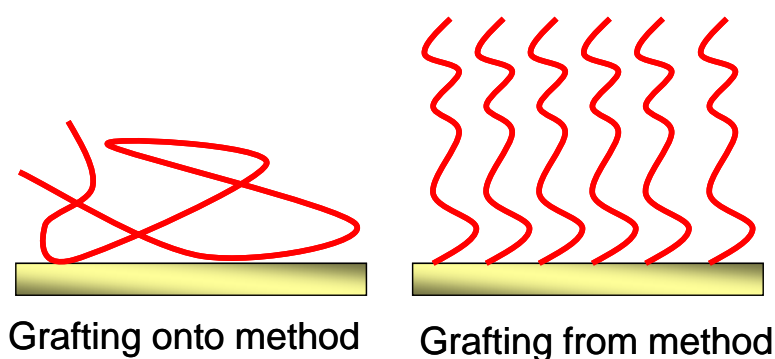


Figure 1-3 The surface modification using grafting methods

1-3 本研究の目的

そこで、本研究では、単位面積あたりのタンパク質を 3 次元的に固定化することで、その固定化量を増加させ、タンパク質間相互作用を精度よく高感度に検出するためのプロテインマイクロアレイ構築を目的とした。そのようなことから、固定化したリガンドタンパク質の活性を保持しながら、固定化量を増加させ、高感度化を目指す必要がある。さらに、固定化したリガンドタンパク質固定化層の構造解析を行い、リガンドタンパク質の固定化状態を明らかにする。加えて、高集積度のプロテインマイクロアレイに適用化を検討する。

これまで解決されていない問題を解決するために、高分子層を導入することで表面処理した固相にタンパク質を固定化するのでなく、ゲル化状態でタンパク質を 3 次元的に固定化する方法を考案した。その方法を適用し、ゲルの構造を制御することでタンパク質の活性を保持し、高反応性が期待できるものと考えた。具体的には、タンパク質溶液に架橋剤を混合した溶液を滴下し、タンパク質の固定化を行った。その方法には、表面処理とタンパク質の固定化を同時に行う利点がある。さらに、タンパク質が失活ないように架橋剤に工夫を加え、かつ構造の制御を行った。加えて、滴下するサンプル量を微量化することで、プロテインマイクロアレイの集積化を検討した。

以下に、タンパク質を主体とするハイドロゲル、すなわち **3D NPH (3 Dimensional Nanostructure Protein Hydrogel)** を作製するために考案した方法について報告する。**3D NPH**

は、タンパク質と反応性ポリマーの混合液を基板上に滴下することによって簡便に作製できた。その 3D NPH の生物学的機能や物性について詳細に検討した。さらに、3D NPH を微小のサンプルスポットが要求されるプロテインマイクロアレイに展開し、その特性について検討した。その結果、固定化したタンパク質は、反応性ポリマーと緩く結合し、ハイブリッドナノ粒子を形成し、基板上に 3 次元的に固定化された。それをを用いることで、従来法に比べ顕著に反応性が向上することが明らかとなった。ピン型サンプルスポット装置を導入し、サンプルの少量化を行い、プロテインマイクロアレイの集積化を達成した。

以下に、各章で詳細に検討した要点を示す。

第 2 章では、基板上にタンパク質と反応性ポリマーの混合液を滴下することによって簡便にタンパク質を固定化することができ、タンパク質間相互作用を検出する場合に検出シグナルが顕著に向上することについて詳述する。さらに、そのシグナルの向上がタンパク質の固定化量の増加によることを検証する。

第 3 章では、作製した水素ゲルは、タンパク質と反応性ポリマーから形成されるナノ粒子の凝集体から構築される。その水素ゲルは、ナノ粒子が会合し形成された凝集体によって作製される。アナライトタンパク質は、凝集体間にある空隙に溶媒が浸透し、膨潤した水素ゲル中に容易に浸透することができることについて詳述する。

第 4 章では、これまでに、我々はチップ表面にタンパク質と反応性高分子の混合溶液をスポットすることで簡便に作製できるタンパク質多孔性複合ゲル(3D NPH)による高感度タンパク質固定化法を構築することができた。しかしながら、構造解析の結果によると、水素ゲル内には、反応に寄与せず固定化されタンパク質が存在することが予測された。本研究では、より効率的なタンパク質の固定化を実現するために、タンパク質チップの検出法のひとつである表面プラズモン共鳴法(SPR 法)に着目した。チップ表面よりおよそ 200nm 以下が検出範囲とされる SPR 法において、3D NPH の膜厚を制御し SPR 検出シグナルの効率的な向上が可能となった(Figure 1-4)。本章では、それらの結果について詳述する。

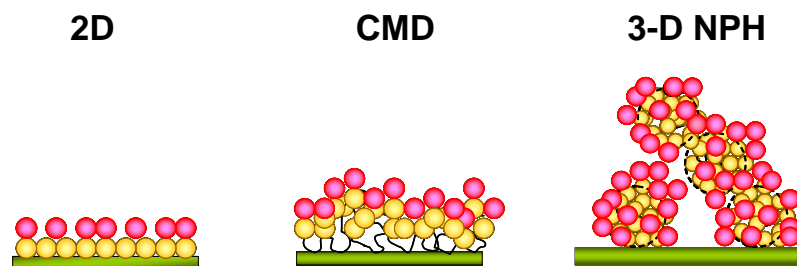


Figure 1-4 The comparison of protein immobilization methods between immobilized ligands and reacted analyte proteins.

1-4 引用文献

- [1] 平成 19 年版 厚生労働白書 厚生労働省
- [2] 高分子先端材料 One Point 9 バイオチップとバイオセンサー 堀池靖浩 宮原裕二 共立出版 2006 年
- [3] Yoshihiro Ito et al. *Bioindustry* 23 5 (2006) 5-53
- [4] D. Kambhampati, *Protein Microarray Technology*, Wiley-VCH (2003) p23
- [5] F. Falciani, *Microarray Technology Through Applications*, Taylor & Francis (2007) p22
- [6] H. J. Muller, T. Roder, *Microarrays*, Academic Press (2005) p54
- [7] M. Schena, *Protein Microarrays*, Jones and Bartlett, MA, (2004) Chapter 5
- [8] S. Lofas, B. Johnsson, A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands, *J Chem Soc Chem Commun*, 21 (1990) 1526-1528.
- [9] P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmell, S. Voloschchuk, V. Chupeeva, A. Mirzabekov, Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions, *Anal. Biochem*, 278 (2000) 123-131.
- [10] P. Angenendt, J. Glokler, D. Murphy, H. Lehrach, D. J. Cahill, Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials, *Anal. Biochem*, 309 (2002) 253-260.
- [11] A. Y. Rubina, E. I. Dementieva, A. A. stomakhin, E. L. Darii, S. V. Pan'kov, E. V. Konovalova, A. D. Mirzabekov, Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications, *BioTechniques*, 34 (2003) 1008-1014.

-
- [12] P. T. Charles, C. R. Taitt, E. R. Goldman, J. G. Rangasammy, D. A. Stenger, Immobilization Strategy and Characterization of Hydrogel-Based Thin Films for Interrogation of Ligand Binding with Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) in a Protein Microarray Format, *Langmuir*, 20 (2004) 270-272.
- [13] S. B. Brueggemeier, D. Wu, S. J. Kron, S. P. Palecek, Protein-Acrylamide Copolymer Hydrogels for Array-Based Detection of Tyrosine Kinase Activity from Cell Lysates, *Biomacro.*, 6 (2005) 2765-2775.
- [14] V. Afanassiev, V. Hanemann, S. Wolf, A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library, *Nucleic Acids Res.*, 26 (1998) 5007-5008.
- [15] I. Caelen, H. Gao, H. Sigrist, Protein Density Gradients on Surfaces, *Langmuir*, 18 (2002) 2463-2467.
- [16] M. S. Lord, M. H. Stenzel, A. Simmons, B. K. Milthorpe, Lysozyme interaction with poly(HEMA)-based hydrogel, *Biomaterials*, 27 (2006) 1341-1345.
- [17] Y Ito, M. Nogawa, M. Takeda, T. Shibuya, Photo-reactive polyvinylalcohol for photo-immobilized microarray, *Biomaterials* 26 (2005) 211-216.
- [18] 高分子先端材料 One Point 3 バイオマテリアル 岩田博夫 共立出版 2005 年
- [19] S. Kiyonaka, K. Sada, I. Yoshimura, S. Shinkai, N. Kato, I. Hamachi, Semi-wet peptide/protein array using supramolecular hydrogel, *Nat. Mater.*, 3 (2004) 58-64.
- [20] M. M. Dominguez, M. Wathier, M. W. Grinstaff, S. E. Schaus, Immobilized Hydrogels for Screening of Molecular Interactions, *Anal. Chem.*, 79, 3, (2007) 1064-1066.

第 2 章

第 2 章

ハイドロゲルによる新規タンパク質の 3 次元固定化法の創製及び性能評価

2-1 序論

新規のタンパク質 3 次元固定化法を考案し、評価を行った。従来のタンパク質 3 次元固定化法は、表面改質を行った後に、タンパク質を固定化することが一般的であったが、反応性の点等で多くの問題を抱えていた。そのため、本法は従来技術と大きく異なる方法を用いることにした。表面処理した固相にタンパク質を固定化するのではなく、タンパク質溶液に架橋剤を混合した溶液を滴下することで、表面処理とタンパク質の固定化を同時に行う。但し、タンパク質が失活しないように架橋剤を工夫することにした。

酵素の固定化用が開発された Poly(NAM-co-NAS)は、考案したタンパク質固定化法に即した架橋剤として、以下の 3 つの条件を満たすことから選択された。第一に、ポリマーは、反応性の観点から、タンパク質表面のリジン残基の ϵ アミノ基と共有結合するための反応部位を持つ必要がある。第二に、ポリマーは、タンパク質と反応する際は、水系で溶解し、重合の際は、有機溶媒系で溶解するために、両親媒性である必要がある。第三に、ポリマーは、静電的な吸着によるタンパク質の非特異吸着を抑制するために、非電荷の部位を持つことが要求される。それゆえ、Poly(NAM-co-NAS)は、ランダムコポリマーで、両親媒性の部位としてモルフォリン残基と、反応性部位として活性エステルのスクシンイミド基の側鎖を有する(Figure 2-1)。この方法は、表面処理とタンパク質の固定化を同時に行うことができることから、作製過程が容易となる利点がある。タンパク質と反応性ポリマーの混合溶液を滴下し固定化を行うことで、タンパク質の固定化状態が従来と異なるもの、すなわち従来よりも高感度を有するタンパク質固定物が構築できるものと想定し、検討を行った。

第一に、Poly(NAM-co-NAS)の合成を行い、その分子量とモノマー比について検討した。次に、作製した Poly(NAM-co-NAS)を用いて、タンパク質(Sterptavidin, Mouse IgG)の固定化を行い、タンパク質間相互作用のシグナルが最大となるための最適条件の検討を行った。また、固定化された Sterptavidin, Mouse IgG と Poly(NAM-co-NAS)の固定化量をアミノ酸分析法により定量した。さらに、複数のタンパク質(Streptavidin, Mouse IgG, Protein A, SSA-Lectin)を固定化し、その特異性と非特異吸着の有無について検討した。最後に固定化層に高分子鎖を導入した 3 次元固定化法の比較として、ポリアクリルアミドゲルを用いた場合と比較した。

2-2 実験方法

2-2-1 材料

N-Acryloylmorpholine (NAM, Sigma-Aldrich (MO, U.S.A.)), *N*-Acryloxysuccinimide (NAS, Acros Organics (NJ, U.S.A.))を反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)重合用のモノマーとして使用した。Azobisisobutyronitrile (AIBN, Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan))を重合開始剤として用いた。有機溶媒として、Dimethylformamide (DMF), Diethylether, Anhydrous dioxane (Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan))を用いた。16-mercaptohexadecanoic acid は、SAM 化試薬として Sigma-Aldrich (MO, U.S.A.)より購入した。Bovine Serum Albumin (BSA), Ethanolamine-HCl は、ブロッキング用試薬として Sigma-Aldrich (MO, U.S.A.)より購入した。*N*-Ethyl-*N*-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide (EDC, Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan))と *N*-hydroxysuccinimide (NHS, Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan))をカルボキシル基活性化試薬として使用した。Mouse IgG は、リガンドタンパク質として、LAMPIRE Laboratory (PA, USA)より購入した。Streptavidin は、リガンドタンパク質として Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)から入手した。Protein A は、リガンドタンパク質として PIERCE (USA)より入手した。Anti-Mouse IgG F(ab')₂ (Sigma-Aldrich (MO, U.S.A.))は、アナライトタンパク質として使用した。Sulfo-NHS-Biotin は、Biotin 化試薬として PIERCE (USA)より入手した。Cy3 monofunctional dye は、蛍光標識剤として GE Healthcare (USA)より購入した。PBS Tablet, Tween 20 (Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan))は、洗浄用緩衝液として使用した。

2-2-2 Poly(NAM-co-NAS)の重合及びキャラクタリゼーション

Poly(NAM-co-NAS)は、Figure 2-1 に示す化学構造を有するランダムコポリマーである。F. M. Veronese らの報告¹⁾を参考とし、無水ジオキサン中において *N*-アクリロイルモルフォリン(NAM)と *N*-アクリロキシスクシンイミド(NAS)をモル比 80:20 で、フリーラジカル重合を行い Poly(NAM-co-NAS)を作製した。50 mL の四つ口フラスコに無水ジオキサンを注ぎ入れ、次いで、モノマーを溶解させた。総モノマー濃度は、0.5 mol/L とした。室温で 30 分間窒素にて脱気を行

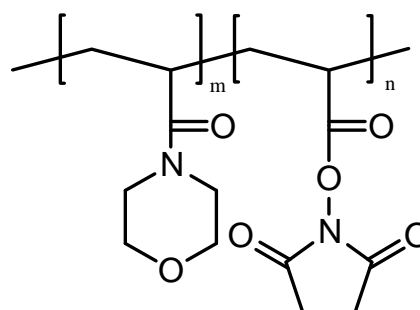


Figure 2-1 Chemical Structure of poly(NAM-co-NAS)

った。アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を重合開始剤とした。その濃度は、モノマーに対して 1 mol%とした。このモノマー溶液をオイルバスにて 60 °Cに昇温し、重合開始剤アゾビスイソブチロニトリルをモノマーに対して 1 mol%となるように溶解させ、重合を開始させた。重合反応は窒素雰囲気下、8 時間行った。重合後、ポリマーが生成した溶液は、0.5 L のジエチルエーテルに滴下することにより再沈殿させた後、溶媒を除去することにより粉末化し、Poly(NAM-co-NAS)を得た。分子量は、サイズ排除クロマトグラフィー分析(HLC-8220GPC(L)、TSK Gel GMPW×1 カラム TOSOH, Japan)によって決定した。溶離は、流速 0.5 mL/min で、50 mM LiBr 含有 DMF を用いて行った。

共重合体の組成比は、C. Pichot らの報告^[2]に従い、共重合体の ¹H NMR スペクトルより決定した。外径 5 mm の NMR 試料管に試料 15~16 mg をはかりとり、重クロロホルム(CDCl₃) 0.5 mL、TMS を加え約 6 時間放置した。水のシグナル位置をずらすために、すべての試料にトリフルオロ酢酸-dl(TFA-dl)をパスツールピペットで 1 滴加えて十分に攪拌した。装置は JEOL 製 EX270 分光計を使用し、積算回数 16 回、室温で ¹H NMR スペクトルを測定した。化学シフトの基準は TMS を 0 ppm、とした。

2-2-3 基板上における 3D NPHの構築

基板表面にカルボキシル基を導入するために、金被覆樹脂製基板を 10 mM mercaptohexadecanoic acid エタノール溶液中に 12 時間浸漬した。金表面に導入されたカルボキシル基は、0.1 M EDC (*N*-ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) , 0.4 M NHS (*N*-hydroxysuccinimide)を用いてスクシンイミドエステルを形成させるために活性化された。活性化反応後、スクシンイミド基が導入された基板に、1 μL のタンパク質 / Poly(NAM-co-NAS)の混合溶液をピペットにて滴下した。タンパク質:Poly(NAM-co-NAS)の混合比率は 10:1(w:w)とした。そして結果的に、乾燥工程によって混合溶液は濃縮されながら反応が進行した。およそ 1 時間反応後、1 M エタノールアミン溶液 pH 8.5 を用いて未反応のスクシンイミド基を水酸基に変換し、PBS 0.05 % Tween 20 (PBST)を用いて 5 回洗浄を行った。

2-2-4 3D NPHのキャラクタリゼーション

3D NPH-Mouse IgG の組成は、アミノ酸分析とガスクロマトグラフィーマスマスペクトルによって決定された。分析のために、100 μL の 3D NPH-Mouse IgG([Mouse IgG]:[Poly(NAM-co-NAS)]= 10:1(w:w), [Mouse IgG]=1.0 wt.%)を 6 N HCl によってアミノ酸に分解し、PAA(ポリアクリル酸)を校正物質として使用し決定した。

基板にタンパク質-ポリマー混合溶液を 1 μL ずつ 40 スポットし、ハイドロゲルを構築した。ハイドロゲルを構築した基板を 6 N HCl、150°C、1 時間で加水分解した。その後、塩酸を減圧乾燥し、加水分解物を 1 %アンモニア水に溶かし、遠心分離(10000 rpm, 3 分)で不溶分を除いた。この加水分解液を減圧濃縮後、0.1 % アンモニア水 1 mL に溶かし、100 μL をアミノ酸分析、400 μL を PAA 分析に用いた。その中で、使用した試料は、加水分解試料 10 μL であった。装置は、日立高速アミノ酸分析計 L-8500 を使用した。その加水分解液 100 μL を減圧乾燥し、0.02 N 塩酸 500 μL に溶かした。これを遠心式限外ろ過(MWCO:10kDa、マイクロコン YM-10)し、ろ液 10 μL をアミノ酸分析した。生じたアミノ酸量から IgG 量を定量した。さらに、加水分解中のポリアクリル酸量から、Poly(NAM-co-NAS)を定量した。生体アミノ酸分離条件は、ニンヒドリン発色法(570 nm, 440 nm)で行った。定量計算は、プロリンが、440 nm、その他のアミノ酸は、570 nm のピーク面積から 1 点外部標準法にてアミノ酸含有量を算出した。標準品は、和光純薬製標準アミノ酸混合液(各アミノ酸 200 μM 含有)を使用した。上記加水分解液 400 μL を遠心式限外ろ過(MWCO:10kDa)で濃縮し、1 %アンモニア水 400 μL で希釈した。この限外ろ過による希釈-濃縮操作を 6 回繰り返して低分子成分を除いた。高分子成分を 1 %アンモニア水で回収し、減圧乾燥してから PAA 分析を行った。装置は、Agilent 社製 HP5973MSD を使用した。分析条件として、熱分解温度 550°C、カラム:DB-1 60 m \times 0.25 μm ϕ (膜厚 1 μm)、50°C(1 min)-10°C/min.-260°C(10 min.)、試料:10 μL とした。検出は、MS (SIM, m/z=129, 85, 75)で行った。標準品は、PAA 2000 33 $\mu\text{g/mL}$ \times 10 μL を使用した。定量計算は、m/z=129 のピーク面積から 1 点外部標準法にて PAA 含有量を算出した。

2-2-5 Streptavidin(SA)の固定化及びCy3-Biotin-BSAの検出実験

蛍光標識物質は、アナライザーの測定波長及び安定性の関係から、Cy3 monofunctional dye (GE Healthcare MW 767.0) を用いた。Biotin 化試薬は、Sulfo-NHS-Biotin (PIERCE MW 556.6)を用いた。標識するタンパク質として、BSA(SIGMA MW 66 kDa) を用いた。標識化反応は、1.3 μmol Cy3 試薬 1.0 mg, 1.3 μmol Sulfo-NHS-Biotin 0.73 mg, 33 nmol BSA 2 mg を pH 7.4、室温、30 min で行い、PD-10 カラムにより、目的物を分画し、アナライトタンパク質 Biotin-BSA-Cy3 を得た。リガンドタンパク質として、Streptavidin(SA)(WAKO MW 60kDa) を、1 μL スポットにて固定化を実施した。10 $\mu\text{g/mL}$ Biotin-BSA-Cy3 5 mL に基板を浸漬させ、pH 7.4、室温、30 min で反応を行った。Genepix 4000B (Axon Instrument) を用いて、PMT voltage 320 にて反応が終了した基板の蛍光シグナルを測定した。

2-2-6 Mouse IgGの固定化及びCy3 蛍光標識 Anti-Mouse IgG F(ab')₂の検出

4 通りの 3D NPH(SA, MW 60 kDa; Protein A, MW 60 kDa; Mouse IgG, MW 150kDa; SSA-Lectin, MW 160kDa)をそれぞれ上述した方法で作製した。SA は、ビオチンと特異的に結合する部位を持つ 4 量体からなるタンパク質である。Protein A は、抗体の Fc 領域に特異的に結合するタンパク質であり、その結合部位はリコンビナント体で 5 つある。Mouse IgG は、マウスの血清より分離されたポリクローナル抗体で、今回の系では、抗原として取り扱った。SSA-Lectin は、糖を特異的に認識するレクチンの 1 種であり、4 量体からなる。1 μ L 滴下する混合溶液の作製条件は、[protein]:[Poly(NAM-co-NAS)]= 10:1(w:w), [protein]=1.0 wt%とした。2D 表面の場合は、基板上に直接タンパク質を固定化した。固定化後、3 % BSA 溶液を用いて、室温 30 分間でブロッキング工程を行った。

次に、10 μ g/mL の Cy3 蛍光標識 Anti-Mouse IgG F(ab')₂ 溶液にて、室温下、30 分間反応を行った。3D NPH 及び 2D いずれも PBST にて 5 回洗浄を行った。Genepix 4000B を用いて蛍光強度の検出を行った。

2-2-7 Anti-Biotin IgG抗体を用いた場合の 3D NPH

3D NPH に固定化されたタンパク質が活性を保っているか検証するために、Anti-Biotin IgG 抗体を用いて 3D NPH を作製した。尚、タンパク質:ポリマーの混合比率は、10:1 とし、タンパク質濃度を 1.0 wt%とした。そして、アナライトタンパク質として Cy3-Biotin-HRP を捕捉できるか検討した。1 μ L 滴下する混合溶液の作製条件は、[Anti-Biotin IgG]:[Poly(NAM-co-NAS)]= 10:1(w:w), [Anti-Biotin IgG]=1.0 wt%とした。2D 表面の場合は、基板上に直接タンパク質を固定化した。固定化後、3 % BSA 溶液を用いて、室温 30 分間でブロッキング工程を行った。次に、10 μ g/mL の Cy3 蛍光標識 Biotin-HRP 溶液にて、室温下、30 分間反応を行った。なお、Cy3-Biotin-HRP は、Biotin-HRP と Cy3 dye reagent を用いて作製した。3D NPH 及び 2D いずれも PBST にて 5 回洗浄を行った。Genepix 4000B を用いて蛍光強度の検出を行った。

2-2-8 アクリルアミド水ゲルとの比較

アクリルアミド水ゲルスライドガラスを用いてリガンドを固定し、蛍光で評価を行い、3D NPH との反応性の比較を行った。尚、その水ゲルは、膜厚が乾燥状態で 5 μ m、膨潤状態で 20 μ m のアクリルアミドゲルである。その評価系として、リガンドを Mouse IgG、アナライトを Cy3-anti-Mouse IgG F(ab')₂ を用いて検討した。アクリルアミド水ゲルへの固定化は Mouse IgG を 1.0 wt%、1 μ L スポットし室温にて 60 分作用さ

せた。その後、脱塩水にて洗浄し、5 % BSA 溶液にて 30 分間ブロッキングを行った。尚、対象となる 3D NPH は Mouse IgG と Poly(NAM-co-NAS)の混合比 10:1(w:w)にて作製したものをを用いた。但し、固定した部材はスライドガラスを用いたため固相とは物理吸着により 3D NPH を構築した。作製した各スライドガラスを 10 μ g/mL Cy3-anti-Mouse IgG F(ab')₂ 溶液にて室温、30 分間反応させた。その後脱塩水にて洗浄、N₂にて乾燥した。最後に BioRAD FXPRO にて蛍光測定を行った。

2-3 結果と考察

2-3-1 Poly(NAM-co-NAS)の作製及びキャラクタリゼーション

反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)は、ナノ粒子を形成するためのタンパク質分子の会合に寄与する。ナノ粒子は会合して凝集体を形成し、凝集体同士も会合していく。

標準ポリスチレンで校正された SEC(Size Exclusion Chromatography) 測定を行ったところ、Figure2-2 の結果を得た。これより、反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)の重量平均分子量が 86000 であることがわかった。加えて、同様の条件で、反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)の作製をもう一度行い、ほぼ同様 SEC のチャートを得ることができた。そのことから、良好な再現性が得られることがわかった。

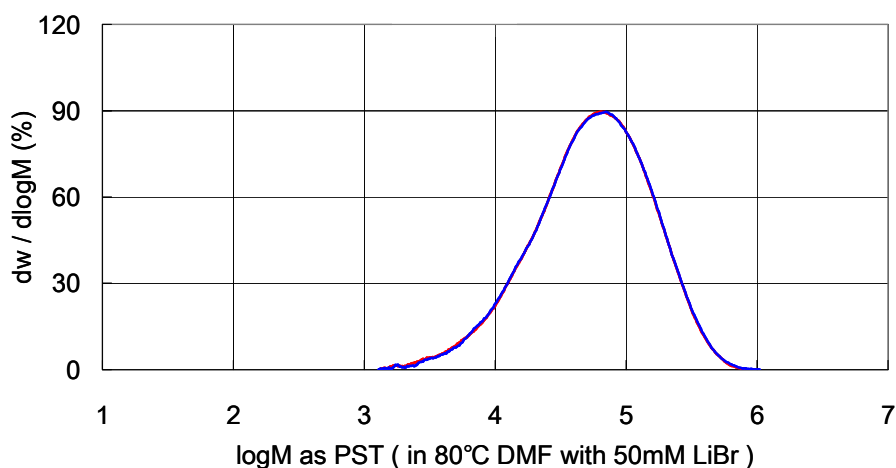


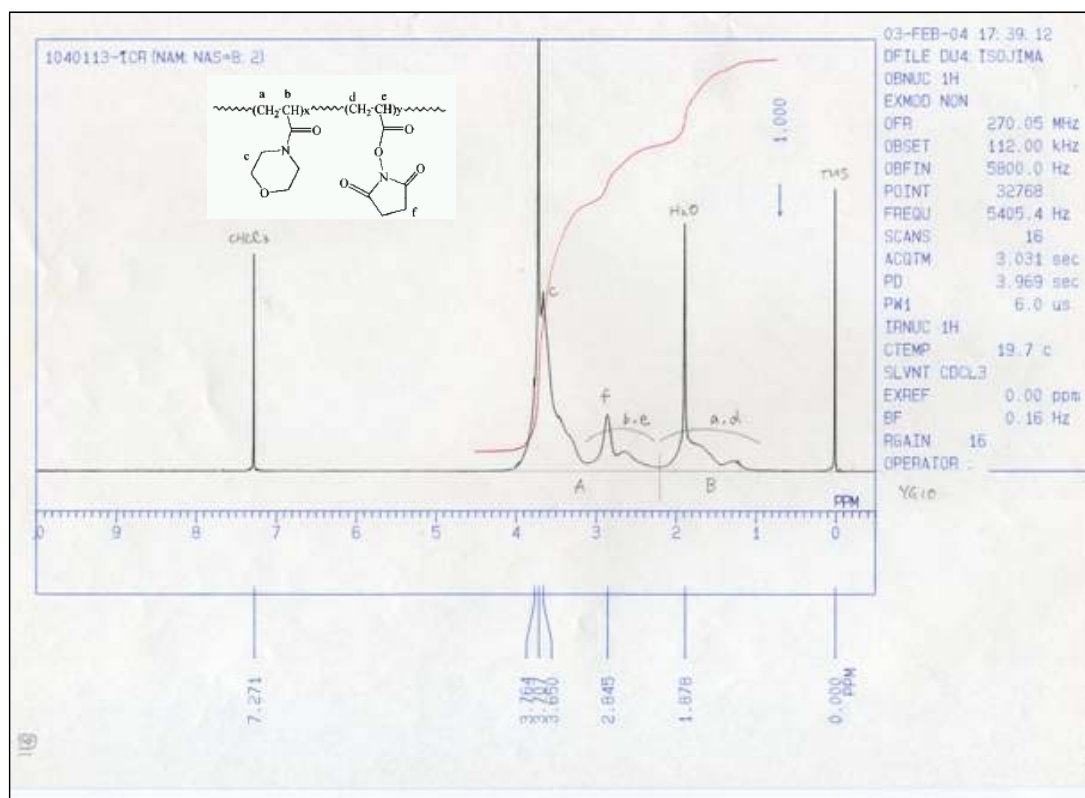
Figure 2-2 SEC chart of poly(NAM-co-NAS)

次に、反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)の組成比は、C. Pichot らの報告^[2]に従い、反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)の ^1H NMR スペクトルより決定した。Figure2-3 より、B の領域は、主鎖のメチレン基のプロトンに帰属され、A の領域は、その他すべてのプロトンに帰属される。それぞれは、以下の式より成り立つ。 H_{PNAM} と H_{PNAS} は、反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)のそれぞれの比率を示している。A, B の値は、 ^1H NMR スペクトルのそれぞれのエリア面積より得られる。

$$A=9H_{\text{PNAM}}+5H_{\text{PNAS}}$$

$$B=2H_{\text{PNAM}}+2H_{\text{PNAS}}$$

その結果、得られた反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)の組成比は、NAM:NAS=65:35 (mol:mol) であることが判明した(Figure 2-3)。

Figure 2-3 ^1H NMR Spectra of poly(NAM-co-NAS)

2-3-2-1 3D NPH法によるタンパク質の固定化

3D NPH の作製工程は Figure 2-4 に示されているとおりである。スクシンイミド基が導入された基板の上にタンパク質と Poly(NAM-co-NAS)の混合液 $1\ \mu\text{L}$ を滴下した。混合溶液が乾燥過程を通して濃縮される間に、タンパク質のアミノ基は、Poly(NAM-co-NAS)のスクシンイミド基と、もしくは基板と反応する。1時間反応後、未反応のスクシンイミド基は、1 M エタノールアミン溶液(pH 8.5)でマスキングを行った。次に、未反応のタンパク質とポリマーを取り除くために、PBST を用いて 5 回洗浄を行った。この作製方法は、タンパク質と反応性ポリマーの混合溶液の濃縮を経る基板上でのゲル化工程を含む。ハイドロゲルは、この方法によって基板上の限定された領域、すなわちスポットされた領域のみに作製することが可能である。親水性のハイドロゲルによって基板全体を被覆した場合、各スポット間でのクロスコンタミネーションやオーバーフローが起こることが指摘されている。この 3D NPH 法を用いることによって、我々は、隣接するスポット間でのクロスコンタミネーションやオーバーフローを生じることなしに高集積度のプロテインチップを作製することに成功した。評価は、タンパク質固定化後、蛍光標識アナライトタンパク質を用いて検討を行った(Figure.2-4)。

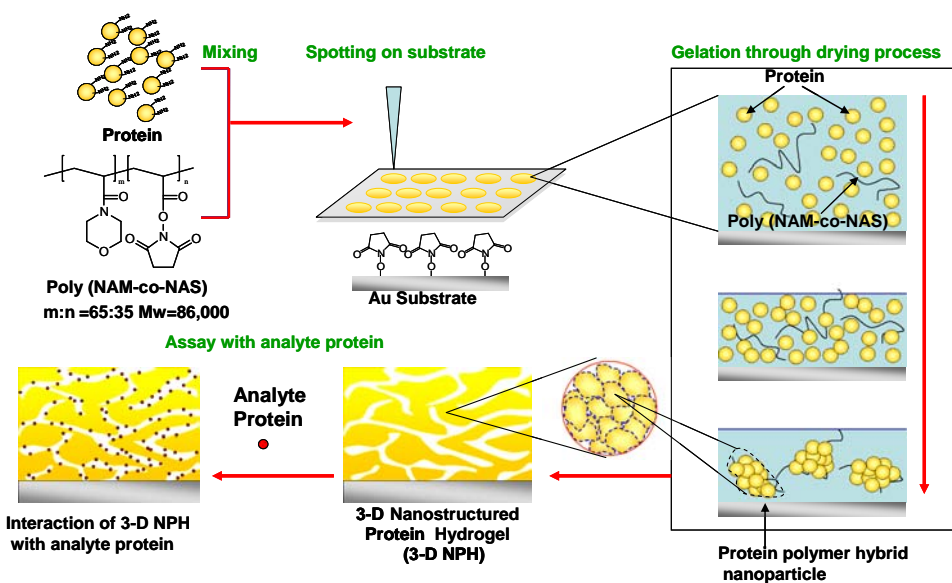


Figure 2-4 Schematic representation of 3-D Nano-structured Protein Hydrogels (3-D NPH) preparation process and analyte interaction with 3-D NPH. The mixtures of proteins and polymers are deposited on the Au substrate coated with self assembled monolayer (SAM) having succinimide groups. The mixtures on the substrate are concentrated through a liquid evaporation and nanoparticles composed of protein/polymer conjugates are formed. Simultaneously, 3-D NPH is constructed through gathering and cross-linking of the nanoparticles on the substrate.

2-3-2-2 SAをリガンドタンパク質として固定化

SA の固定化条件(固形分濃度、混合比、pH)とアナライトの反応性に対して蛍光シグナルの測定を行い、それぞれに関してアナライトタンパク質の反応の最適条件を検討した。

アナライトタンパク質である Cy3-Biotin-BSA と反応する 3D NPH-SA の反応容量を調べるために、異なるタンパク質・ポリマー濃度で 3D NPH-SA を作製した。加えて、アナライトタンパク質との結合能を比較するために、スクシンイミド基が導入された金基板に直接 SA 分子を固定化した。尚、これを 2D 表面とした。

3D NPH-SA の場合の蛍光強度は、SA と Poly(NAM-co-NAS)の混合溶液の濃度の増加に伴い、0.50 wt%程度までほぼ直線的に向上した。一方、それ以降は、飽和に達することがわかった(Figure 2-5)。この結果は、3D NPH の結合能がタンパク質/ポリマー混合溶液の濃度によって再現よく制御できることを示している。

次に、SA をリガンドタンパク質と用いた場合のタンパク質/ポリマーの混合比について検討した。各混合比で 3D NPH を作製し、蛍光標識アナライトタンパク質との相互作用を行い、蛍光シグナルの強度を比較した。アナライトタンパク質との結合能を比較するために、スクシンイミド基が導入された金基板に直接 SA 分子を固定化した。尚、これを 2D 表面とした。

作製条件に関しては、金基板上にてリガンド蛋白質として、SA を用い、pH 9.0、5 μ L Spot、SA 濃度 1.0 wt% とし、Poly(NAM-co-NAS)を 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 2.0 wt% と濃度を変えて作製した。作製したスポットとアナライトタンパク質 Biotin-BSA-Cy3 10 μ g/mL との反応を蛍光の系にて評価した。その結果、Poly(NAM-co-NAS)濃度が 0.10 wt% の場合、つまり蛍光シグナルが最大となる混合比が[SA]: [Poly(NAM-co-NAS)]=10:1(w:w)であることがわかった。これらの結果より、最適な混合比があることがわかった(Figure 2-6)。

さらに、SA/ Poly(NAM-co-NAS)混合液の pH について検討した。各 pH で 3D NPH を作製し、蛍光標識アナライトタンパク質との相互作用において蛍光検出を行い、その蛍光シグナルの強度を比較した。アナライトタンパク質との結合能を比較するために、スクシンイミド基が導入された金基板に直接 SA 分子を固定化した。尚、これを 2D 表面とした。その結果、pH が 9.5 付近で蛍光シグナルが最大となることから、最適な pH が存在することが示唆された(Figure 2-7)。

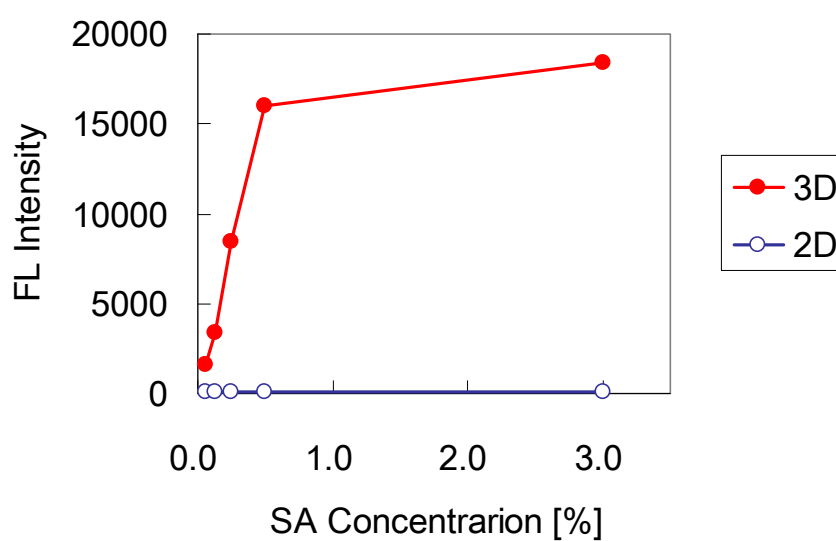


Figure 2-5 Fluorescence intensity of 3-D NPH-SA reacted with Cy3-Biotin-BSA in case of making 3-D NPH on several concentration of ligand protein

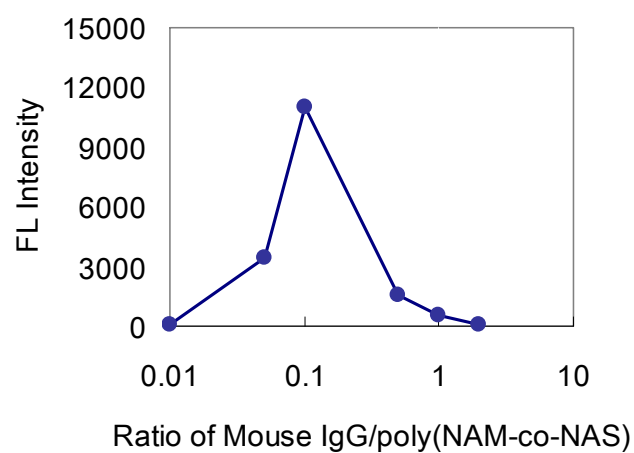


Figure 2-6 Fluorescence intensity of 3-D NPH-SA reacted with Cy3-Biotin-BSA in case of making 3-D NPH on several ratio of mixture of ligand protein and reactive polymer

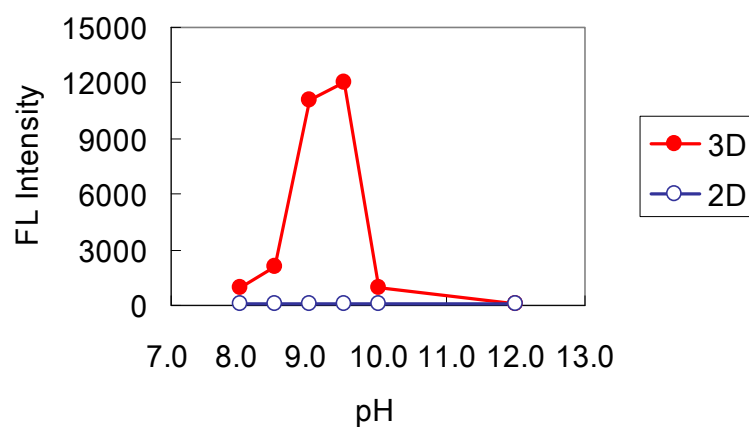


Figure 2-7 Fluorescence intensity of 3-D NPH-SA reacted With Cy3-Biotin-BSA in case of making 3-D NPH on several pH

2-3-2-3 Mouse IgGをリガンドタンパク質として固定化

リガンドタンパク質 Mouse IgG とアナライトタンパク質 Cy3-anti-Mouse IgG F(ab')₂ とのタンパク質間相互作用の反応性と、リガンドタンパク質 Mouse IgG 固定化濃度との相関をみるために、[protein]/[polymer]=10/1, [protein]=0.13, 0.25, 0.50 wt% で、3D NPH-Mouse IgG を作製した。加えて、アナライトタンパク質との結合能を比較するために、スクシンイミド基が導入された金基板に直接 Mouse IgG 分子を固定化した。尚、これを 2D 表面とした。2D-Mouse IgG の場合の蛍光強度は、0.25 wt% 付近で飽和した。しかしながら、3D NPH-Mouse IgG の場合の蛍光強度は、Mouse IgG と Poly(NAM-co-NAS) の混合溶液の濃度の増加に伴い、測定した範囲内においてほぼ直線的に蛍光強度が向上した。この結果は、3D NPH の結合能がタンパク質/Poly(NAM-co-NAS) 混合溶液の濃度によって制御できることを示している。さらに、%cv 値がいずれの場合においても、10% 以下となったことから再現性に関しても良好な結果を得ることができた。

0.50 wt% における 3D NPH-Mouse IgG の蛍光強度は、2D 表面に固定化された Mouse IgG の場合に比べおよそ 50 倍の蛍光シグナルとなった(Figure 2-8)。

2-3-3 固定化量の検討

タンパク質として Mouse IgG、反応性ポリマーとして Poly(NAM-co-NAS) を混合比 10:1 (w:w) で 3D NPH を作製した。アミノ酸分析と熱分解ガスクロマトグラフィーマスマスペクトルによって、そのハイドロゲルの組成について定量的に解析した結果、Mouse IgG は、390 µg 固定化されたことがわかった。この値は、滴下したタンパク質量の約 80 % が固定化されたことが見出された。さらに、Poly(NAM-co-NAS) は、16.9 µg 検出され、ハイドロゲル中に含まれるタンパク質の比率(タンパク質の重量/乾燥ハイドロゲルの重量)が 0.958 となり、3D NPH の組成は、タンパク質:ポリマー構成比が、96:4(w:w) となることがわかった。すなわち、ハイドロゲルに含まれるタンパク質の重量比率が極めて高いことが示された。作製された 3D NPH は、タンパク質を主体とするハイドロゲルであることが判明した。

単位面積あたりの固定化量を算出すると、3D NPH-IgG の表面固定化濃度は、26 µg/cm² であることがわかった。IgG の単層吸着濃度は、end-on で 1.85 µg/cm²、side-on で 0.27 µg/cm² であることが報告されている³⁾。3D NPH-IgG の表面固定化量は、IgG 単層の 14-93 層分に匹敵することが判明した。それゆえ、3D NPH-IgG は、多層、すなわち 3 次元的にタンパク質が固定化されたことが明らかになった。さらに、この結果から、仕込み比と組成比がほぼ合致することがわかった。これよりその後の実験における仕込み比は 10:1(w:w) に固定した。

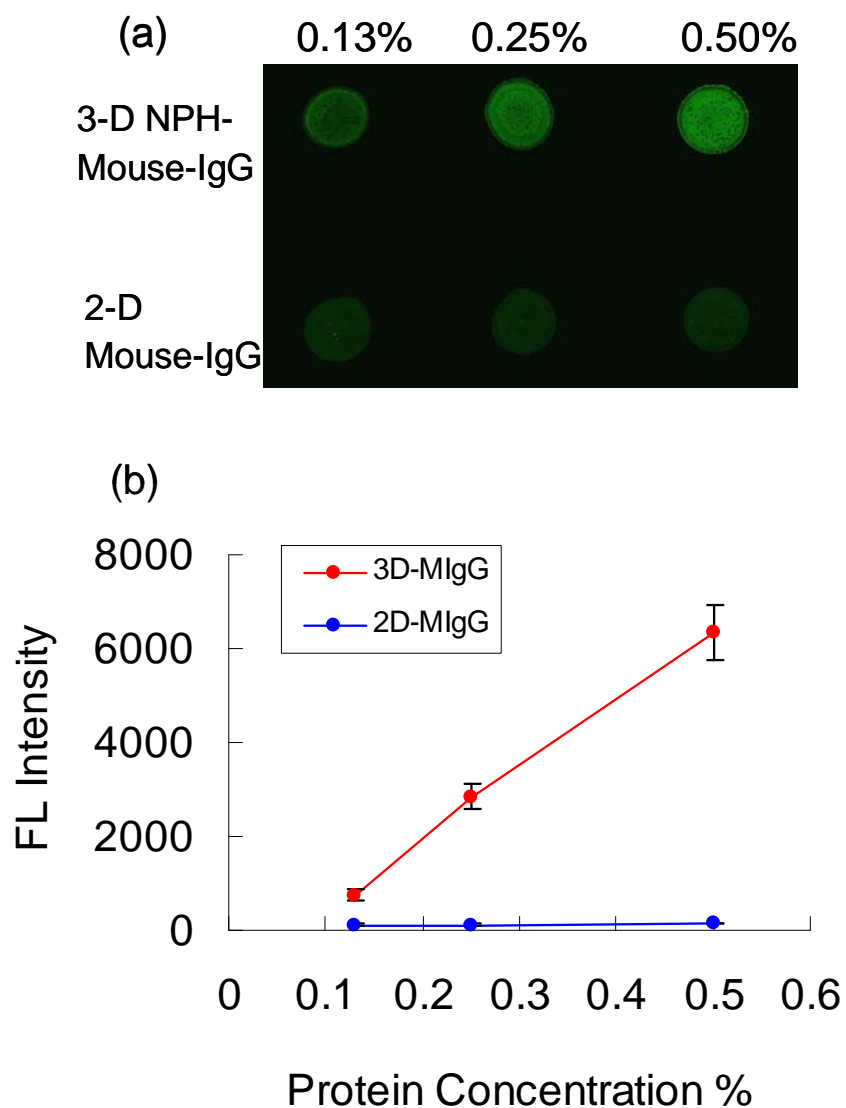


Figure 2-8 (a) Fluorescent image of the 3-D NPH-mouse IgG ($[\text{IgG}]/[\text{polymer}]=10:1$, $[\text{IgG}]=0.13, 0.25, \text{ and } 0.50\%$) in feed and on the 2-D surface ($[\text{IgG}]=0.13, 0.25, \text{ and } 0.50\%$) in feed) after probing with Cy3 - anti-mouse IgG F(ab')_2
(b) Line plot of fluorescent intensity vs mouse IgG concentrations in feed.

金基板上にてリガンドタンパク質として、Streptavidin を用い、pH 9.0、5 μ L Spot、固形分濃度 0.25, 0.50, 1.00 wt% にて行った。その結果、固形分濃度に応じて固定量が増加することが判明した(Figure 2-9)。これより、アナライトタンパク質の反応性向上の要因がリガンドタンパク質の単位面積あたりの固定化量の増加にあることが見出された。

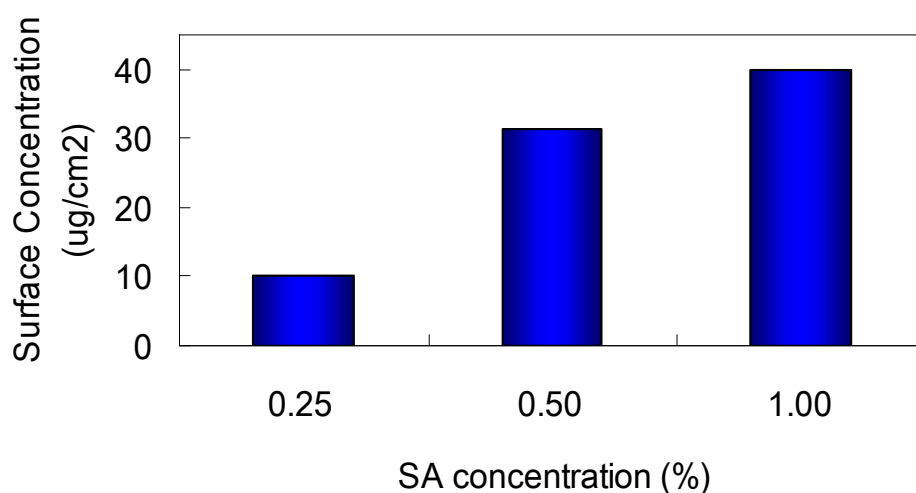


Figure 2-9 The amount of immobilized protein (SA) in case of making 3D NPH at various SA concentrations in SA/polymer mixture (%)

2-3-4 特異性の検討

Streptavidin、Protein A、Mouse IgG、SSA-Lectin の 4 種類のタンパク質について固定化方法の検討を行った。

これまでの検討より、単位面積あたりに 3 次元的に多量のリガンドタンパク質を固定することができ、さらにアナライトタンパク質の反応性が 3D 化することで顕著に向上することが示されたので、3D NPH を異なるリガンドタンパク質を用いて同一の基板上に固定化し、特異的なタンパク質間相互作用の高感度検出が可能になるものと予想される。はじめに、3D NPH に対する特異反応及び非特異反応を調べるために、複数のタンパク質(SA, Protein A, Mouse IgG, SSA-Lectin)を同一基板上に作製した。

アナライトタンパク質として 10 μ g/mL Cy3-anti-Mouse IgG F(ab')₂ と反応させたところ

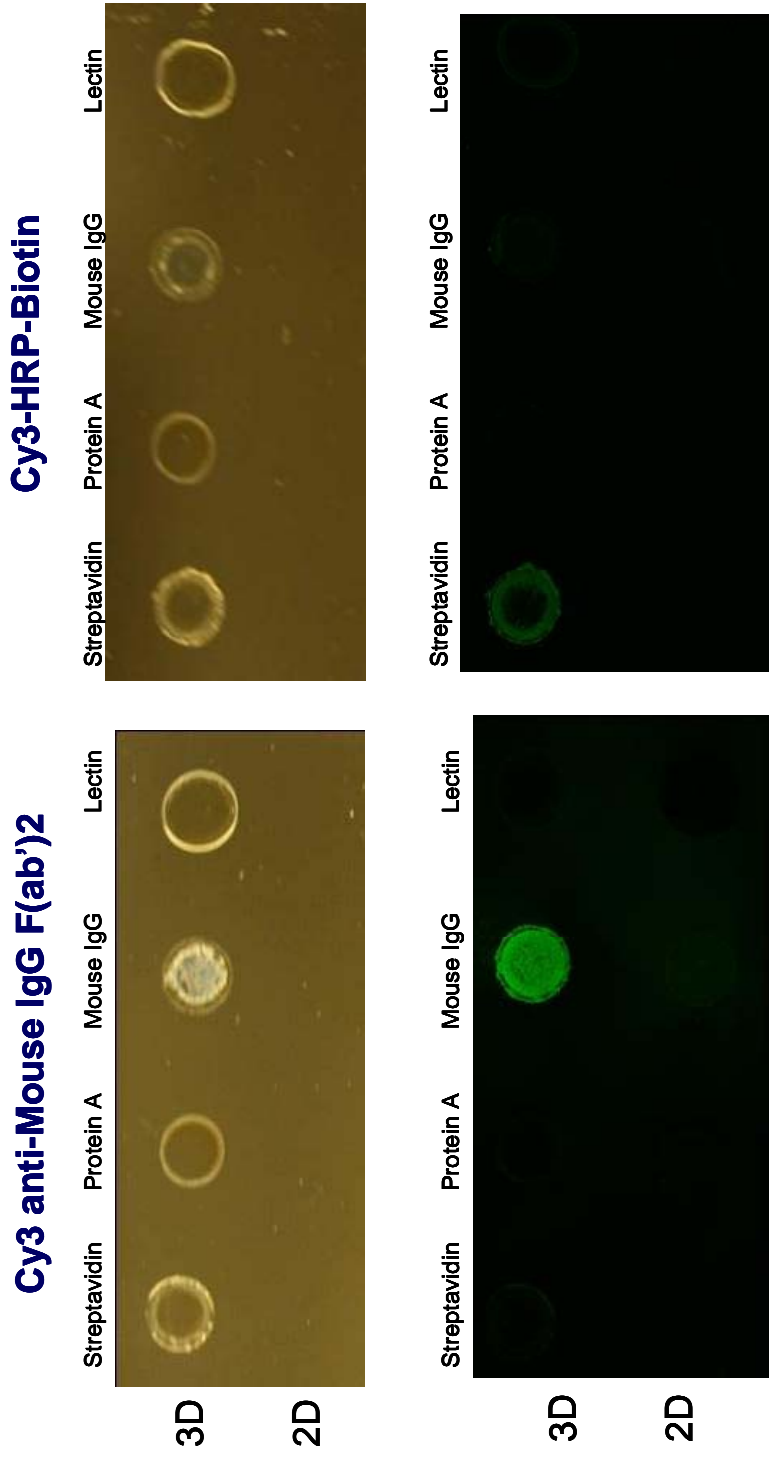


Figure 2-10 Fluorescent image of four kinds of 3-D NPH after probing with Cy3 - anti-mouse IgG F(ab')₂ (Proteins: streptavidin, protein A, mouse IgG and lectin). The concentration of Cy3 - anti-mouse IgG F(ab')₂ applied to the 3-D NPH-mouse IgG and 2-D surface was 10 μ g/mL.

る、Cy3-anti-Mouse IgG F(ab')₂ による蛍光シグナルが 3D NPH-Mouse IgG の場合にのみ確認された。一方で、2D においては、いずれのリガンドタンパク質の場合も蛍光シグナルが検出されなかった(Figure 2-10)。これは、タンパク質間相互作用が特異的に進行し、そのアナライトタンパク質が 3D NPH-SA、3D NPH-Protein A、3D NPH-SSA-Lectin に非特異的に反応しないことが示された。加えて、10 μg/mL Cy3-anti-Mouse IgG F(ab')₂ との反応においては、2D では検出範囲以下であることを示している。さらに、アナライトタンパク質として、Cy3-HRP-Biotin と反応させたところ、Cy3-HRP-Biotin による蛍光シグナルが 3D NPH-SA の場合にのみ確認された。一方で、2D においては、いずれのリガンドタンパク質の場合も蛍光シグナルが検出されなかった。したがって、3D NPH は、特異的な反応が可能な高感度なタンパク質固定化法であることが判明した。

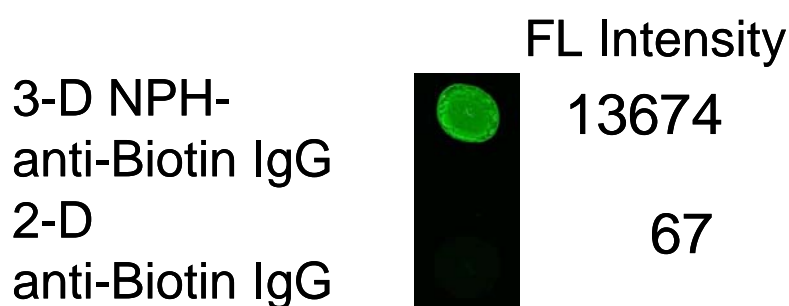


Figure 2-11 Fluorescent image of 3-D NPH-anti Biotin IgG after probing with Cy3 -Biotin-HRP. The concentration of Cy3 -Biotin-HRP applied to the 3-D NPH-anti Biotin IgG and 2-D surface was 10 μg/mL.

2-3-5 Anti-Biotin抗体をリガンドタンパク質として固定化

リガンドタンパク質として、3D NPH 法にて固定化された抗体が活性を保っているか検証するために、Anti-Biotin IgG 抗体を用いて 3D NPH を作製した。作製条件として、[Anti-Biotin IgG]:[Poly(NAM-co-NAS)]= 10:1(w:w), [Anti-Biotin IgG]=1.0 wt%とした。アナライトタンパク質として Cy3-Biotin-HRP を用い、そのタンパク質間相互作用について検討した。その結果、3D NPH 法で固定化されたタンパク質は、アナライトタンパク質との活性を保持していることが確認された(Figure 2-11)。2D と比べた場合、200 倍程度のアナライト

タンパク質を捕捉できることがわかった。リガンドタンパク質として、3D NPH 法にて固定化された抗体の活性が保持されていることが見出された。このことから、3D NPH 法はタンパク質の活性の保持にも効果があることが示唆された。

生体は、遺伝子、タンパク質、糖質、脂質等から構成されており、細胞をひとつの構造単位として集積した構造体である。見方を変えれば、主として水分と有機化合物から形成される構造体である。つまりは、ハイドロゲルである。生体成分はもともとゲル状態で生体中において維持される。このことから、3D NPH によりハイドロゲルとして固定化されたリガンドタンパク質は立体構造等が安定化し、その結果、活性が保持されたものと考えられる。

2-3-6 アクリルアミドハイドロゲルとの比較

ポリアクリルアミドは、タンパク質の解析法のひとつである電気泳動用のゲルとして用いられている。このハイドロゲルを用い、3 次元的にタンパク質を固定化したプロテインマイクロアレイの報告^[4,5]がこれまでなされているため、3D NPH との比較を行うことにした。固定化したリガンドタンパク質 Mouse IgG とアナライトタンパク質 Cy3-anti-Mouse IgG F(ab')₂を反応させ、ポリアクリルアミドハイドロゲルと 3D NPH-Mouse IgG の反応性を蛍光強度で比較したところ、ポリアクリルアミドハイドロゲルハ蛍光強度 1659 であるのに対し、3D NPH では、その蛍光強度が 8462 となった。3D NPH-Mouse IgG がおよそ 5 倍の反応性を示すことが見出された。次に N=3 での%cv 値を比較したところポリアクリルアミドハイドロゲルは 11%となり、3D NPH で 3%となった。このことから、今回の条件範囲においては蛍光強度のばらつきはポリアクリルアミドハイドロゲルより 3D NPH-Mouse IgG が良好であることが見出された(Figure 2-12)。一般的に担持量が多いとされるポリアクリルアミドハイドロゲルチップよりも蛍光シグナルが向上することが見出された。これは、固定化量の増加だけにあるのではないことを示していると考えられる。

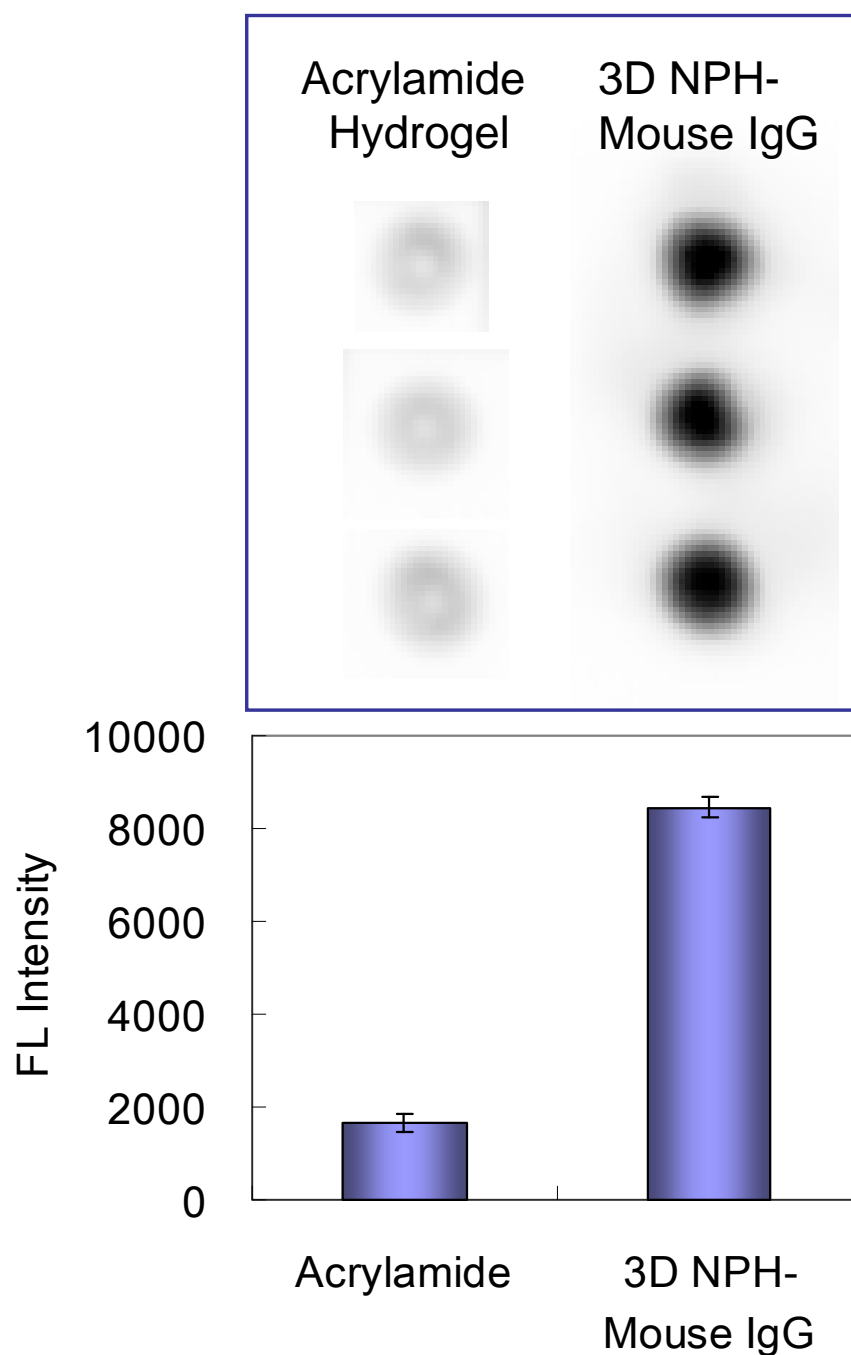


Figure 2-12 The comparison of protein immobilization methods in terms of reacted analyte proteins. Acrylamide hydrogel is the left part of the graph, and 3-D NPH method is right part of the graph.

2-4 結論

タンパク質と反応性ポリマーの混合液を滴下・濃縮することで高い反応性を有するハイドロゲルを構築することができた。

条件検討の結果から、タンパク質／反応性ポリマーの混合比、pH、タンパク質濃度の各種条件において、最適な固定化条件を見出した。タンパク質／反応性ポリマーの混合比においては、タンパク質／反応性ポリマーの混合比が、10/1(w/w)の場合に反応性が最も高いことが判明した。pH においては、pH 9.5 付近で反応性が最も高くなることがわかった。タンパク質濃度においては、タンパク質濃度の増加に応じて、反応性が向上することが判明した。

リガンドタンパク質の固定化量の検討から、この方法を用いることで、タンパク質を 3 次元的に固定化できることがわかった。作製条件により、固定化量を制御することができ、それにより反応シグナルを制御できることがわかった。さらに、従来法と比べ反応性が高いことがわかった。そのうえ、単位面積あたりの固定化量の増加が、アナライトタンパク質の反応性向上に寄与していることを見出した。

3D NPH の蛍光強度の大幅な向上は、タンパク質分子の固定化量の増大だけでなく、3D NPH の構造によるものでもであると推測される。次章で、3D NPH の構造解析を行い、反応性向上と構造の相関について詳細に検討した。

2-5 引用文献

- [1] F. M. Veronese, R. Largajolli, C. Visco, P. Ferruti, A. Miucci, Surface Modification of Proteins by Covalent Binding of Acrylic Polymers, *Appl Biochem Biotechnol*, 11 (1985) 269-277.
- [2] F. D'Agosto, M. T. Charreyre, F. Melis, B. Mandrand, C. Pichot, High Molecular Weight Hydrophilic Functional Copolymers by Free-Radical Copolymerization of Acrylamide and of *N*-Acryloylmorpholine with *N*-Acryloxysuccinimide: Application to the Synthesis of a Graft Copolymer, *J Appl Polym Sci* 88 (2003) 1808-1816.
- [3] A. Baszkin, D. J. Lyman, The interaction of plasma proteins with polymers. I.

Relationship between polymer surface energy and protein adsorption/desorption, *J. Biomed. Mat. Res.*, 14 (1980) 393-403

[4] D. Kambhampati, *Protein Microarray Technology*, Wiley-VCH (2003) p22

[5] P. Angenendt, J. Glokler, D. Murphy, H. Lehrach, D. J. Cahill, Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials, *Anal. Biochem.*, 309 (2002) 253-260.

第 3 章

第 3 章

タンパク質と反応性ポリマーより形成されたハイドロゲルの構造解析

3-1 序論

タンパク質と反応性高分子の混合液を基板上に滴下することで、タンパク質を 3 次元的に固定化し、単位面積あたりの固定化量を増加させることができた。さらに、固定化したタンパク質と特異的に反応するアナライト分子とのタンパク質間相互作用を検出したところ、2D に比べアナライトの反応量が顕著に向上することが判明した。3D NPH の蛍光シグナルの大幅な向上は、タンパク質分子の固定化量の増加が大きく寄与したことは間違いないと考えられるが、アナライト分子のサイズ（直径 数 nm 程度）とハイドロゲルへの拡散を考えると 3D NPH の構造にその特性があるものと推察される。また、これまで検討されてきたタンパク質の 3 次元固定化に関する報告の中で、その構造に関して解析した例はあるが、タンパク質間相互作用後、反応したアナライト分子がどのような状態にあるのかを検討した例はなかった^[1,2]。そのため、反応後の 3D NPH とアナライト分子の状態を明らかにする意義は大きい。本章では、アナライト分子が反応した後の 3D NPH の断面構造の解析、加えて、そのハイドロゲル内部構造と表面形状について 3D NPH の構造解析を行い、反応性向上と構造の相関について検討した結果と考察を詳述した。

3-2 実験方法

3-2-1 材料

Pig Serum Albumin (PSA)と Ethanolamine-HCl は、Sigma-Aldrich (MO, U.S.A.)より購入した。N-hydroxysuccinimide (NHS), PBS Tablet, Tween 20 と Streptavidin は、Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)から入手した。N-Ethyl-N-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide (EDC)は、Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)から購入した。Mouse IgG は、LAMPIRE Laboratory (PA, USA)より購入した。Glutaraldehyde は、TCI (Tokyo, Japan)より入手した。Protein A - Au colloid particles は、Aurion Immuno Gold Reagents & Accessories (Wageningen, The Netherlands)より入手した。

3-2-2 作製方法と組成解析

3D NPH は、固定化するタンパク質と反応性ポリマーの混合溶液を、基板の所望の場所に滴下・濃縮することで作製できる。反応性高分子として、Poly(NAM-co-NAS)を使用した。タンパク質/ポリマー混合溶液をスクシンイミド基が導入された基板上に滴下・濃縮し、60分間反応させた。その後、1M エタノールアミン HCl にて未反応のスクシンイミド基をブロッキングした後、蒸留水にて洗浄し 3D NPH を作製した。

3-2-3 TEMによる断面構造解析

Protein A - Au colloid particles と反応した 3D NPH-Mouse IgG の断面構造を観察するために、JEOL LEM 1200EX を用いて TEM 測定を行った。そのサンプルに、室温下、2 時間で 0.1 M cacodylate バッファー(pH 7.4)中 2 wt.%グルタルアルデヒドを用いて固定化処理を行った。次に、室温、30 分でエタノールに浸漬し、脱水処理を行った。そして、60°C、48 時間で Epon 812 epoxy resin を用い包埋処理を行った。最後に、ウルトラマイクロトームを用いてサンプルを切断し、断面を得た。

3-2-4 SEMによる断面構造解析

3D NPH の断面 SEM 観察は、JEOL JSM-6320F を用いて行った。3D NPH-Mouse IgG は、4 酸化オスニウム蒸気中、室温、2 時間染色を行い、Epon812 epoxy resin を用いて、60°C、48 時間で包埋処理を行った。400 V のグロー放電によってサンプルを切断した。

3-2-5 DLSによるPoly(NAM-co-NAS)の流体力学的半径

Poly(NAM-co-NAS)の流体力学的半径を得るために、Poly(NAM-co-NAS)を蒸留水にて 0.2 %、0.4 %、0.6 %の濃度に調製し、光子相関計 ALV5000(ALV 社製)により、測定角 30 度、40 度、50 度、及び 60 度にて、動的光散乱法で測定した。

3-2-6 AFMによる表面観察

AFM 観察は、 $5\ \mu\text{m}\times 5\ \mu\text{m}$ の視野の範囲で、室温下、乾燥状態と湿潤状態において行われた。装置は、Digital Instruments 社製 Multi mode AFM を用い、タッピングモードで行った。Nanoscope III ソフトウェアを用いて、得られた生データを解析した。

乾燥状態における AFM 測定では、SSS-NCH SUPERSHARP SILICON (Nanoworld, $L=128\ \mu\text{m}$, $R<5\ \text{nm}$)をプローブとして使用した。その際のパネ定数は、 $25\ \text{N/m}^{-1}$ で、振動数は、263 kHz であった。

湿潤状態における AFM 測定では、OMCL-TR400PSA (OLYMPUS, $L=200\ \mu\text{m}$)をプローブとして使用した。その際のパネ定数は、 $0.02\ \text{N/m}^{-1}$ で、振動数は、7.62 kHz であった。

3-3 結果と考察

透過型電子顕微鏡(TEM)、走査型電子顕微鏡(SEM)、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、3D NPH の構造を解析した。

3-3-1 アナライト分子が作用した 3D NPHの断面構造のTEMによる解析

3D NPH 内にアナライト分子が拡散するかを明らかにするために、アナライトタンパク質標識金コロイドを 3D NPH に作用させ、その内部状況を断面 TEM により観察した。リガンドタンパク質として Mouse IgG を、反応性ポリマーとして Poly(NAM-co-NAS)を、アナライトタンパク質標識金コロイドとして Protein A - Au colloid particles(粒径 10nm)を用いた。金被覆樹脂基板上に、タンパク質/ポリマー比 10/1、タンパク質濃度 1.0 wt% PBS 溶液で 3D NPH を作製し、Protein A - Au colloid particles を用いて、室温 10 時間にて染色し、3D NPH-IgG の断面を TEM により観察した。観察対象中に金コロイドが存在する場合、TEM 観察を行うと金コロイドの箇所のみ照射光が透過せず、陰影が生じる。リガンドタンパク質とアナライトタンパク質が反応することで金コロイドがハイドロゲル層内に取り込まれた場合、ハイドロゲル中における反応場の位置情報が黒いコントラストとして得られることが予想される。用いた Protein A - Au colloid particle の粒径が 10 nm 程度のもので使用したことから TEM の分解能において十分 1 分子が観察できる。尚、Protein A - Au colloid particles は IgG の Fc 領域に特異的に反応する Protein A をコンジュゲートとした金コロイドのアナライト分子である。

Figure 3-1 に TEM 観察結果を示す。Figure は、3D NPH-Mouse IgG の断面を示しており、下段が基板との結合部位で、上層が 3D NPH-Mouse IgG の最上層である。このことから、3D NPH-Mouse IgG の膜厚がおおよそ 5 μm 程度であることが確認された。次に、3D NPH-Mouse IgG 断面にはうろこ状の黒い線が観察された。TEM 画像の陰影は、金コロイドによるものと考えられることから、黒い線がリガンドタンパク質 Mouse IgG と反応した Protein A - Au colloid particles であり、Protein A - Au colloid particles がゲル内に浸透していることがわかった。加えて、3D NPH-Mouse IgG の最下部にまで Protein A - Au colloid particles による黒い線が網目状に観察された。一方で、黒い線が確認されない領域は、Protein A - Au colloid particles が浸透しないことも判明した。

したがって、Protein A - Au colloid particles は、ハイドロゲル内に浸透し固定されたタンパク質 Mouse IgG と特異的に反応できる、つまり、アナライトタンパク質のような比較的大きな分子が浸透する十分な空間が 3D NPH-Mouse IgG 中に存在することが示

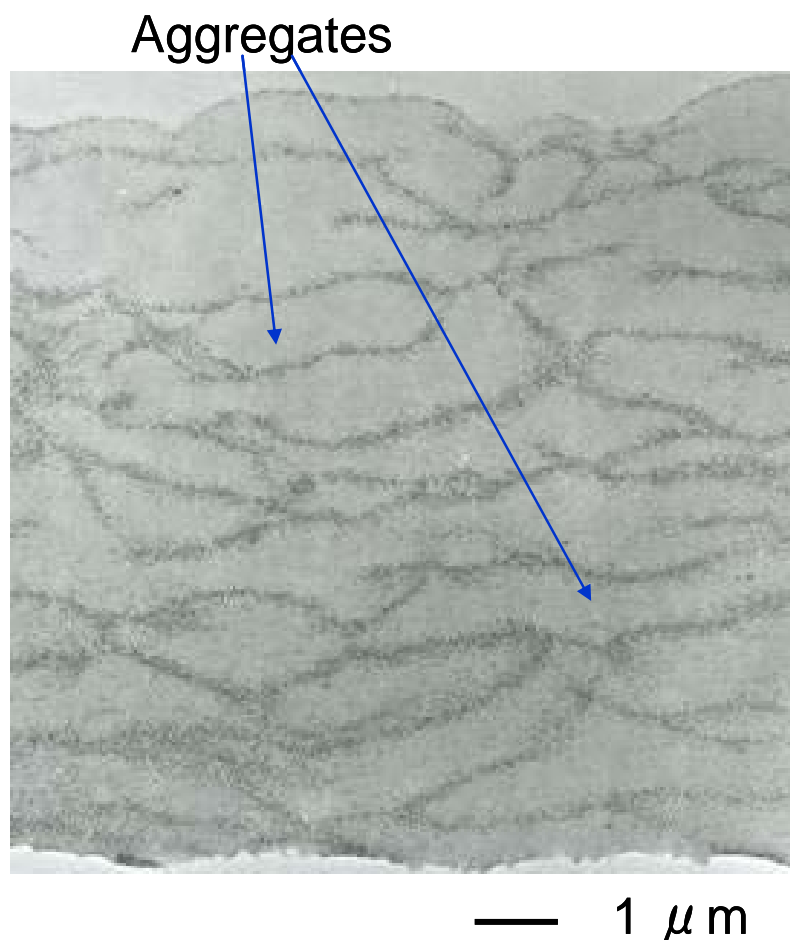


Figure 3-1 Structure analysis of the 3-D NPH.
TEM image of a cross-section of 3-NPH-IgG
reacted with protein A Au colloid particles.

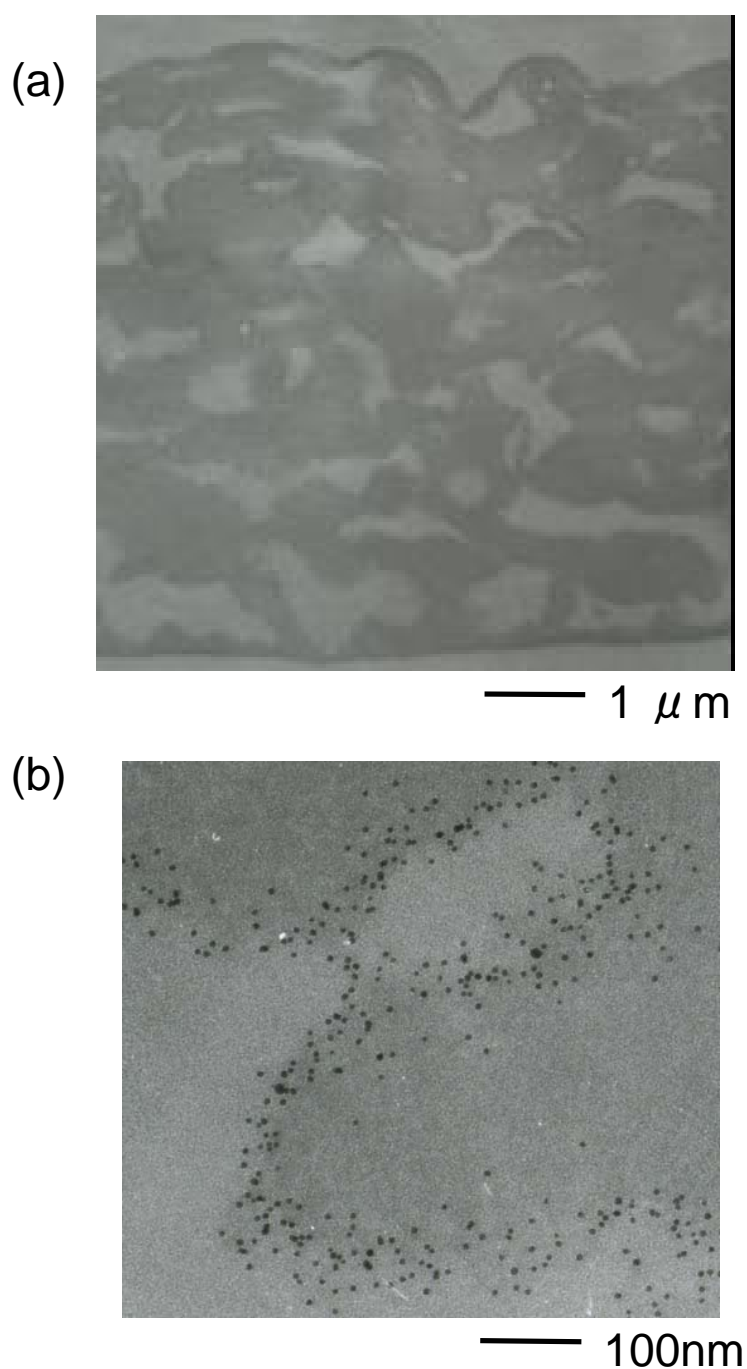


Figure 3-2 Structure analysis of the 3-D NPH.
(a) TEM image of a cross-section of 3-NPH-IgG reacted with protein A Au colloid particles.
(b) The zoomed image of (a).

唆された。さらに詳細に観察するために、包埋条件を調整し 3D NPH-Mouse IgG の断面構造を観察したところ、Figure 3-2(a)の TEM 像を得ることができた。TEM 像の明暗のうち、暗い箇所が 3D NPH-Mouse IgG である。さらに、解像度を上げ 3D NPH-Mouse IgG を観察すると、Protein A - Au colloid particle の 1 つの粒子を確認することができ、それらが、3D NPH-Mouse IgG 内のハイドロゲル表面近傍に吸着するが、それらの中には浸透しないことがわかった。このことから、タンパク質とポリマーより構成されたハイドロゲルにはアナライトが浸透可能な空隙が存在していることが判明した。(Figure 3-2(b))。なぜなら、架橋度が高い領域においては空隙が狭まり Protein A - Au colloid particles が浸透することが困難になる。一方で、凝集体間の架橋はほぼないために凝集体間の空隙を通して Protein A - Au colloid particles が 3D NPH-Mouse IgG 中に浸透することが考えられるからである。

3-3-2 3D NPHの断面構造のSEMによる解析

3D NPH の断面形状を観察するために、SEM 観察を行った。リガンドタンパク質として Mouse IgG を、反応性ポリマーとして Poly(NAM-co-NAS)を、アナライトタンパク質標識金コロイドとして Protein A - Au colloid particles(粒径 10nm)を用いた。Figure 3-3 は、[Mouse IgG]:[Poly(NAM-co-NAS)]= 10:1(w:w), [Mouse IgG]=1.0 wt.%, 1 μ L で金被覆樹脂基板上に作製した場合の断面 SEM 像である。作製したサンプルは、エポキシ樹脂で包埋し、グロー放電により切断し、断面を得た。作製された 3D NPH-Mouse IgG の断面の SEM 画像を撮影した。

その結果、TEM 観察結果と同様に、3D NPH-Mouse IgG の膜厚がおおよそ 5 μ m 程度であることがわかった。高倍率の SEM 画像からハイドロゲルが粒子状の構造をしていることが判明し、さらに、そのハイドロゲル粒子が積層し構造が形成されたことが見出された。そのハイドロゲル粒子の粒径は、おおよそ直径 100 nm 程度の粒子であった。動的光散乱法より Poly(NAM-co-NAS)の平均の流体力学的半径は、6.8 nm と見積もられた。Mouse IgG の粒径は、10nm 以下と考えられることから、100 nm 程度のハイドロゲル粒子は、Mouse IgG と Poly(NAM-co-NAS)の複合体が、100nm 程度にまで成長したものであると考えられた。加えて、そのナノ粒子は、高さ方向、横方向いずれの領域においてもほぼ同等の直径 100 nm 程度の粒子であった。アミノ酸分析等の結果から、3D NPH の組成が、96%タンパク質より構成されていたことから、この直径 100 nm 程度のハイドロゲル粒子においても 96%程度がタンパク質より個性されているものと考えられた。

低倍率の SEM 像より、その粒子同士がさらに大きな粒子状塊のユニットを確認された。その塊と塊の間には空隙が確認され、TEM 観察結果より金コロイドが取り巻くユニットの

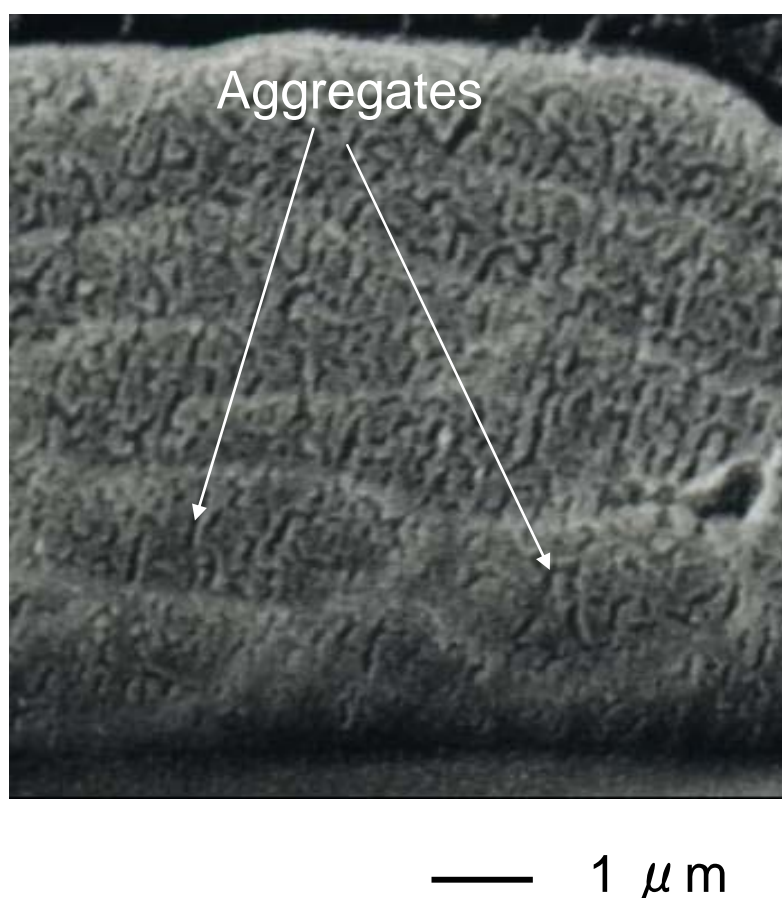


Figure 3-3 Structure analysis of the 3-D NPH. SEM image of a cross-section of 3-NPH-IgG reacted with protein A Au colloid particles.

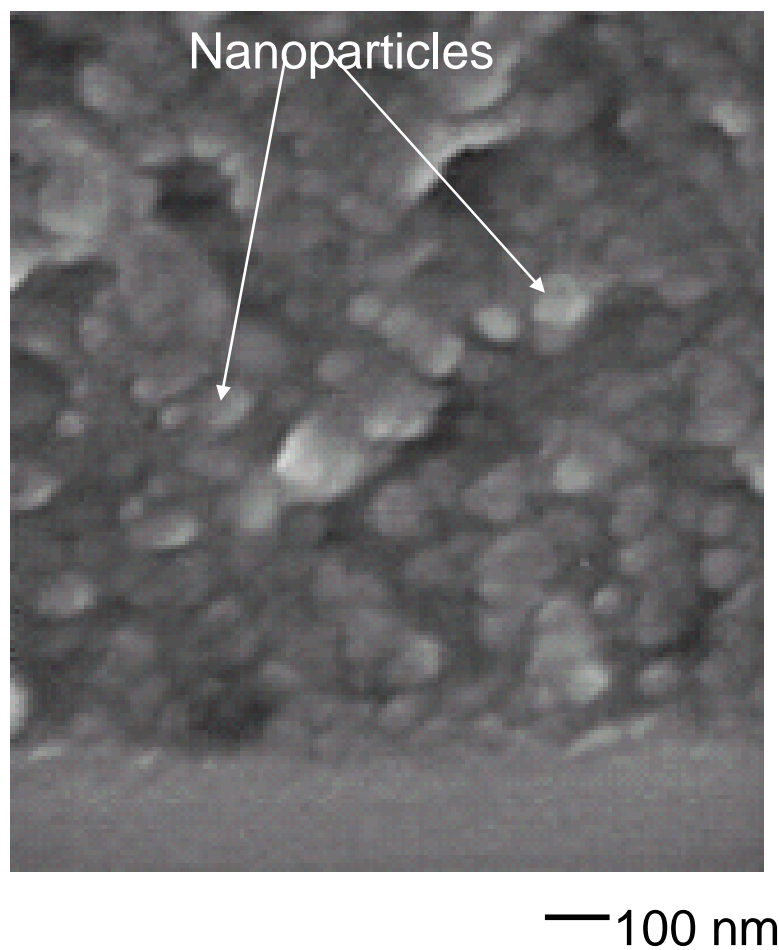


Figure 3-4 Structure analysis of the 3-D NPH. SEM zoomed image of a cross-section of 3-D NPH-IgG on the solid substrate.

サイズとほぼ同等であることからアナライト分子が浸透する領域であることが示唆された。基板表面に形成された 3D NPH は、100 nm 程度の粒子が積層された構造を有し、構成成分がタンパク質と反応性高分子のみにより形成され、さらにそれがユニークな構造を有する多孔性複合ハイドロゲルであることが判明した(Figure 3-4)。

3-3-3 3D NPHの表面形状のAFMによる解析

3D NPH の断面構造の観察結果から 3D NPH 内には、アナライト分子が浸透するために十分な空隙があることが判明した。次に、3D NPH の表面形状を調べるために、タンパク質を固定化した際の表面形状を観察する方法のひとつである^[3]AFM により観察した。AFM 観察用のサンプルは、反応性ポリマーとして、Poly(NAM-co-NAS)をタンパク質/ポリマー比 10/1、タンパク質濃度 1.0 wt% PBS 溶液で金被覆樹脂基板上に作製した。

3D NPH-Mouse IgG 表面の低倍率の AFM 像を、Figure 3-5(a), Figure 3-5(c)に示した。Figure 3-5(a)は、乾燥状態で観察したものであり、Figure 3-5(c)は、液中で観察したものである。凝集体と空隙はすべての 3D NPH-Mouse IgG 表面で観察された。凝集体は、およそミクロンサイズであり、その凝集体の周囲に空隙が観察された。その凝集体のサイズは、Figure 3-4 の断面にみられた凝集体のサイズに合致した。そして、それら凝集体の表面にナノ粒子が存在することが確認された(Figure 3-5(b))。水中においては 3D NPH-Mouse IgG は、膨潤したが、凝集体のサイズはほぼ同様であった。これらのことから、3D NPH-Mouse IgG は、凝集体間の広がり度で主に膨潤すると考えられる。この不均一な膨潤挙動は、凝集体中の架橋度が、凝集体間に比べ密であることが要因と考えられる。

3D NPH の表面形状を観察するため、Streptavidin(SA)及び Albumin を用いて 3D NPH を作製し、AFM にて測定を行った(Figure 3-6)。その結果、3D NPH の表層には、SEM の観察結果と同様に 100 nm 程度の粒子状塊が観察され、その塊と塊の間には空隙があることがわかった。SA と Albumin の表面形状の違いについては、いずれの分子量も 60kDa 程度であることから、特にタンパク質表面のアミノ基の数の違いによるところが大きいと考えられる。タンパク質表面のアミノ基には、Poly(NAM-co-NAS)のスクシンイミド基と共有結合する役割とタンパク質の表面電荷に影響する。そのため、アミノ基の数が異なれば、Poly(NAM-co-NAS)との反応に影響し、結果として構造が変わるものと考えられる。Albumin は、100 程度のアミノ基を有し、60kDa 程度の分子量のタンパク質の中では比較的アミノ基が多い。したがって、Albumin の場合 Poly(NAM-co-NAS)との反応がより進行し、SA に比べ構造がより大きく成長したものと考えられる。

低分子架橋剤であるグルタルアルデヒドを用いてタンパク質を固定化する例がある^[4,5]。

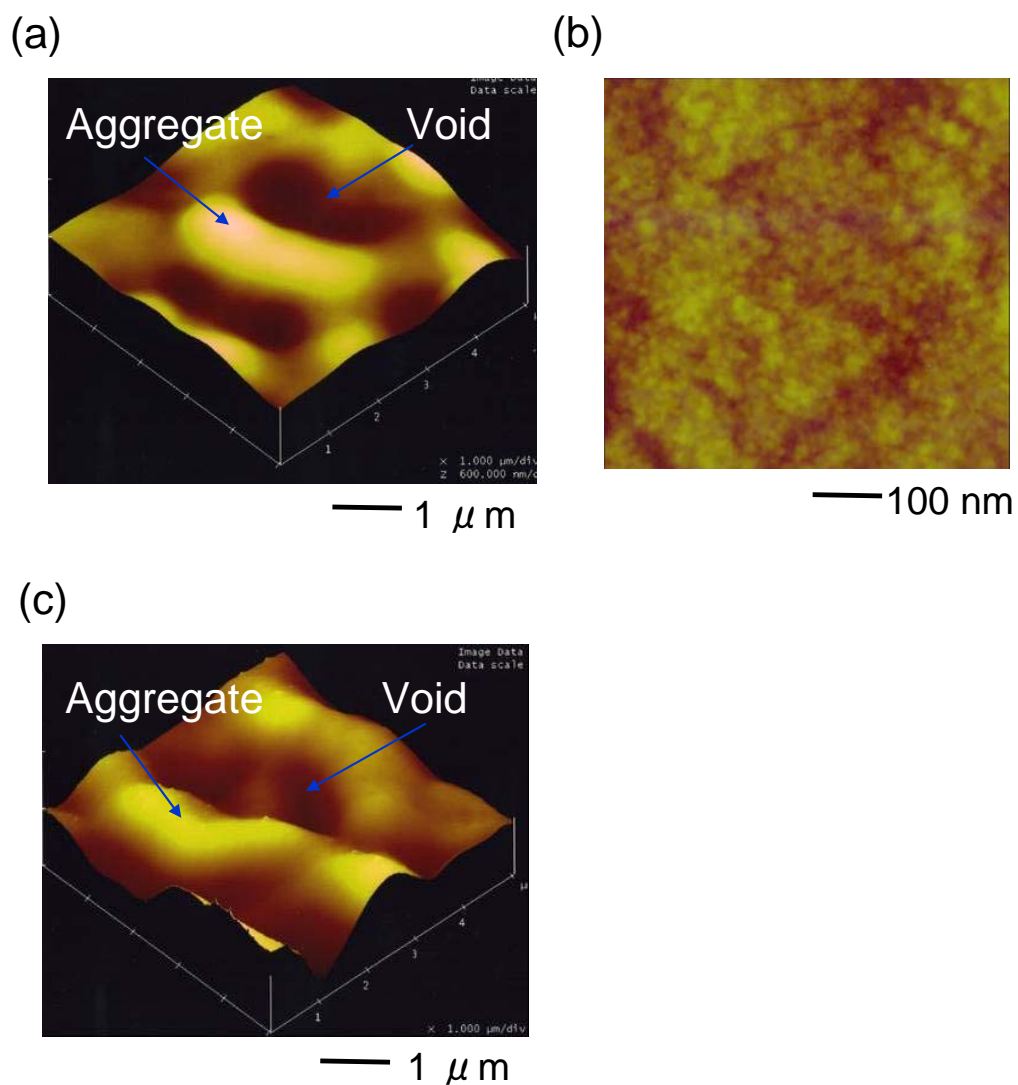


Figure 3-5 Structure analysis of the 3-D NPH.

(a) AFM image of a surface of 3-D NPH-IgG in dry condition.

(b) The zoomed image of (a).

(c) AFM image of a surface of 3-D NPH-IgG in wet condition.

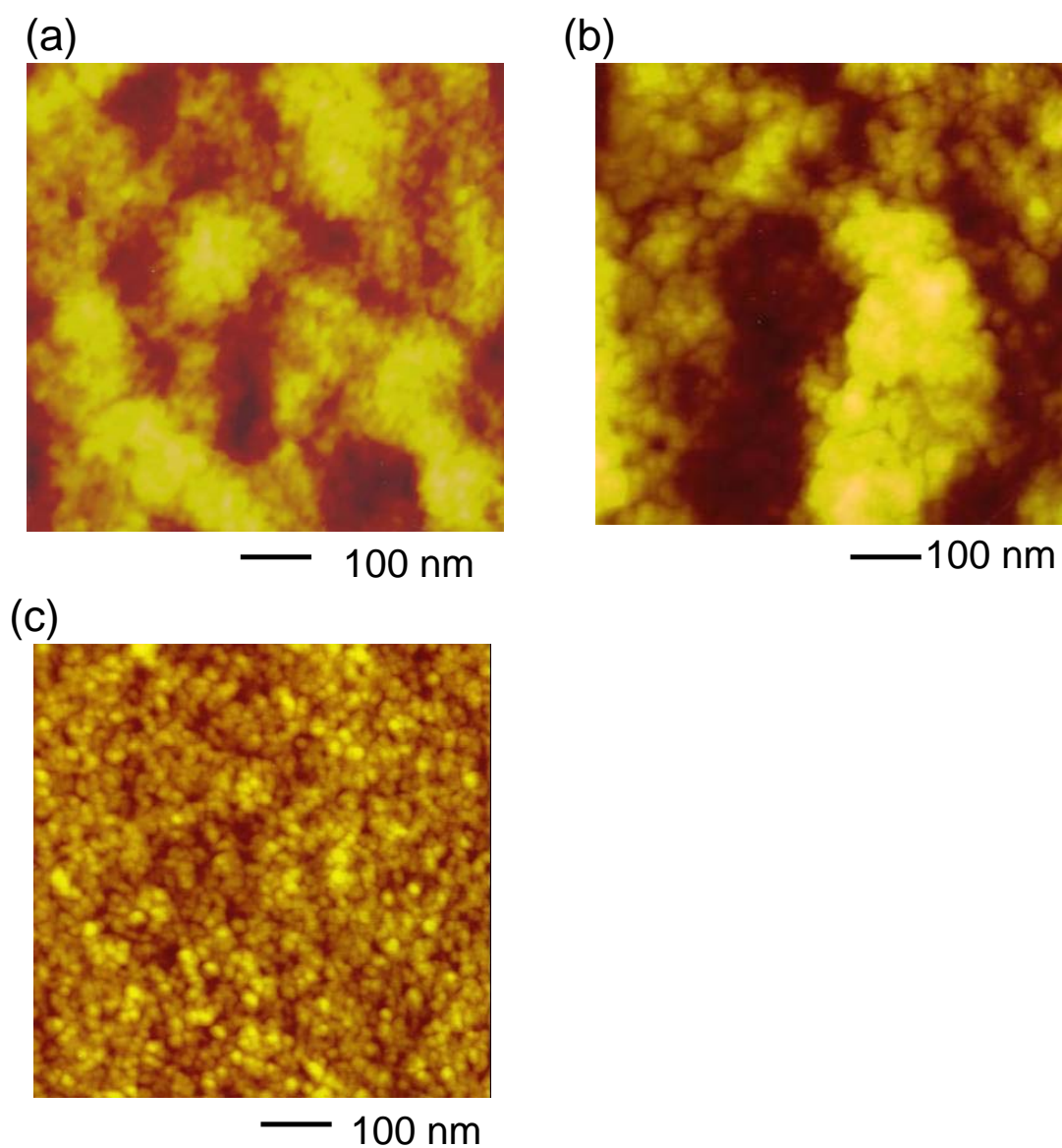


Figure 3-6 Structure analysis of the 3-D NPH. AFM image of a surface of 3-D NPH-streptavidin, (a) and -BSA (b). (c) AFM image of a surface of BSA hydrogel immobilized with glutaraldehyde.

3D NPH と比較するために、グルタルアルデヒドを用いて Albumin を固定したサンプルの表層を AFM にて観察したところ、グルタルアルデヒドを用いて作製したハイドロゲル表面には、3D NPH でみられた特徴的な構造は見出せなかった。すなわち、3D NPH と異なり粒子状塊はなく、比較的平坦な表面であることがわかった。これより、3D NPH 表面で観察された比較的凹凸の粗い表面を形成させるには、グルタルアルデヒドのような 2 価の低分子架橋剤ではタンパク質同士が密に結合してしまうため困難であることが判明した。

本研究の系では、3D NPH が親水性を有するマトリックスであるために、水溶液中において膨潤し、その結果、高い細孔性を有するものと考えられる。さらに、アナライトタンパク質は容易に細孔に浸透し、ハイドロゲルの構成成分として 3 次元的に固定化されたりガンドタンパク質との反応が可能となった。3D NPH 法が感度という観点において従来の 3 次元化法に比べ優位になったものと考えられる。

3-4 結論

3D NPH は、タンパク質と反応性ポリマーから形成されるナノ粒子の凝集体から構築される。基板上にタンパク質と反応性ポリマーの混合液を滴下することによって簡便に作製することができ、その水ゲルは、ナノ粒子が会合し形成された凝集体によって作製される。アナライトタンパク質は、膨潤した水ゲル中に容易に浸透できることが観察された。このことから、アナライトタンパク質のような比較的サイズの大きな分子が浸透する十分な空間が 3D NPH 中に存在することが示唆された。3D NPH は、直径 100 nm 程度のナノ粒子が結合し、粒子状塊を構築していることが見出された。さらに、その粒子状塊が積層し構造が形成されたことが見出された。3D NPH は、100 nm 程度の粒子が積層されたユニークな構造を有する水ゲルであることが判明した。3D NPH の表面状態は、低分子架橋剤を用いた場合に比べ凹凸の程度が顕著になり、その表面に存在する空隙からアナライト分子は水ゲル内に浸透し、反応性向上に大きく寄与したものと考えられる。

アナライトが水ゲル内に浸透することが構造解析の結果から明らかになった一方で、架橋度の不均一性のため、アナライト分子が浸透できない領域があることも確認された。この点を改良できればより反応効率の高い水ゲルを構築できると考えられる。そこで、次章では、より反応効率が高く、かつ応用面を重視した水ゲルを構築するために、固定化条件を中心に検討することにした。

3-5 引用文献

[1] I. Y. Galaev, M. B. Dainiak, F. Plieva, B. Mattiasson, Effect of Matrix Elasticity on Affinity Binding and Release of Bioparticles. Elution of Bound Cells by Temperature-Induced Shrinkage of the Smart Macroporous Hydrogel, *Langmuir* 2007, 23, 35-40

[2] X.-D. Xu, X.-Z. Zhang, J. Y., S.-X. C., R.-X. Zhuo, Y.-Q. Huang, Strategy to Introduce a Pendant Micellar Structure into Poly(*N*-isopropylacrylamide) Hydrogels, *Langmuir*, 23, 8, (2007), 4231-4236

[3] B. D. Martin, B. P. Gaber, C. H. Patterson, D. C. Turner, Direct Protein Microarray Fabrication Using a Hydrogel "Stamper", *Langmuir*, 14, 15, (1998) 3971-3975

[4] V.N. Morozov, T. Y. Morozova, Mechanical detection of interaction of small specific ligands with proteins and DNA in cross-linked samples, *Anal. Biochem.*, 201,1 (1992) 68-79.

[5] S. Kumaran, H. Meier, A. M. Danna, T. M. Canh, Immobilization of thin enzyme membranes to construct glass enzyme electrodes, *Anal. Chem.*, 63,18 (1991) 1914–1918

第 4 章

第4章

新規固定化法の改良及び微小スポットによるマイクロアレイへの応用

4-1 序論

近年、プロテインマイクロアレイは、タンパク質の機能や、その相互作用に関する情報を得るためのプロテオミクスや臨床検査の有効な方法として着目されている^[1-6]。マイクロアレイは、1枚のスライド上の高集積化されたサンプル密度により同時多項目検出が可能となる固相に固定された微小のスポットの集合体であると定義される。蛍光や化学発光のような様々なシグナル検出法が、プロテインマイクロアレイに利用されている。特に、SPRは、速度論的解析や非標識検出が可能であるという点からプロテインマイクロアレイの有効な検出法である^[7]。SPR法のようなバイオセンサーに関して、シグナルとノイズの比率、すなわち感度を向上させることは重要な課題である。感度を向上させるには、二つの方法があり、その一つは、ノイズを低減することで、もう一つは、シグナルを増加させることである^[8]。

一般的に、ノイズは、センサー検出表面へのタンパク質の非特異吸着により生じる。PEGにより被覆された表面は、その親水的な特性、動的挙動、ポリマー密度によりタンパク質の非特異吸着を抑制する。一方で、3次元の支持層を用いることでタンパク質の固定化容量を増大させ、さらにタンパク質の拡散・浸透が可能となり、シグナルが増加するということが示されている。例えば、カルボキシメチルデキストラン(CMD)を用いたハイドロゲル層は、薄膜のポリマーマトリクスを形成し、その厚さは、約100 nmとなる^[9, 10]。親水性タンパク質と適合するハイドロゲル層は、単層でタンパク質を固定化した層と比較してタンパク質の固定化量を増大させる。

しかしながら、たとえタンパク質の固定化量が増大したとしても、必ずしもアナライトタンパク質のシグナルが向上するわけではなかった。そのような現象は、マストランスファーリミテーションや、タンパク質のハイドロゲルへの接近しやすさの低下によって説明できた^[10, 11]。加えて、もし基板表面がCMDのような親水性ハイドロゲルによって完全に覆われている場合、滴下したサンプル間でクロスコンタミネーションやオーバーフローが生じてしまうおそれがある^[12]。

第2章において、タンパク質を主体とするハイドロゲル、すなわち3D NPHの特性について詳述した。3D NPHは、基板上にタンパク質と反応性ポリマーの混合液を滴下することによって簡便に作製することができる。このハイドロゲルをタンパク質間相互作用の検

出に用いることでタンパク質を単層で基板上に固定化する場合に比べ、シグナルが顕著に向上することを示した。

さらに、第3章において、**3D NPH** は、タンパク質と反応性ポリマーから形成されるナノ粒子の凝集体から構築されることを構造解析の結果から明らかにした。そのハイドロゲルは、ナノ粒子が会合し形成された凝集体によって作製される。水系の溶媒が凝集体間にある空隙に浸透し膨潤する。アナライトタンパク質が、膨潤したハイドロゲル中に容易に浸透することができることを示した。

しかしながら、このハイドロゲルは、3つの改良すべき点があった。一つ目は、アナライトが浸透することができない領域がハイドロゲル内にあることである。もし、その有効でない領域が利用できるようなになれば、リガンドとアナライトの反応効率が改善されるだろう。二つ目は、ハイドロゲルの厚みである。ハイドロゲル層が μ メートルの厚みがある場合、ハイドロゲル内へのアナライトの拡散が問題となる。加えて、**SPR** 法などのようなセンサー表面からの高さ方向に制限のある検出系には使用できない。三つ目は、スポットの直径が**3mm**程度と比較的大きいため、アレイの集積度が低くなってしまい、つまり、1枚の基板上に固定化できるサンプル数が減少するため、同時に多数の項目を検出することが困難となる。例えば、**10mm×10mm**の基板の場合、最大で、**9**つの項目のみの検出になってしまう。

本章において、**SPR** プロテインマイクロアレイの感度を向上させるために、そのセンサー表面の表面改質に着目した。そして、マイクロアレイ用に微小で、薄膜のハイドロゲルスポットを構築することによって、**3D NPH** 技術の改良を行った。ハイドロゲルの膜厚は、タンパク質混合溶液の濃度と容量により調製した。その結果、ハイドロゲルスポットは、ナノメートルオーダーの膜厚となり、スポットの直径はミクロンオーダーにすることができた。さらに、**SPR** プロテインマイクロアレイの系において、リガンドタンパク質に対するアナライトタンパク質の反応効率がそのスポンジ状の構造により顕著に向上することを見出した。

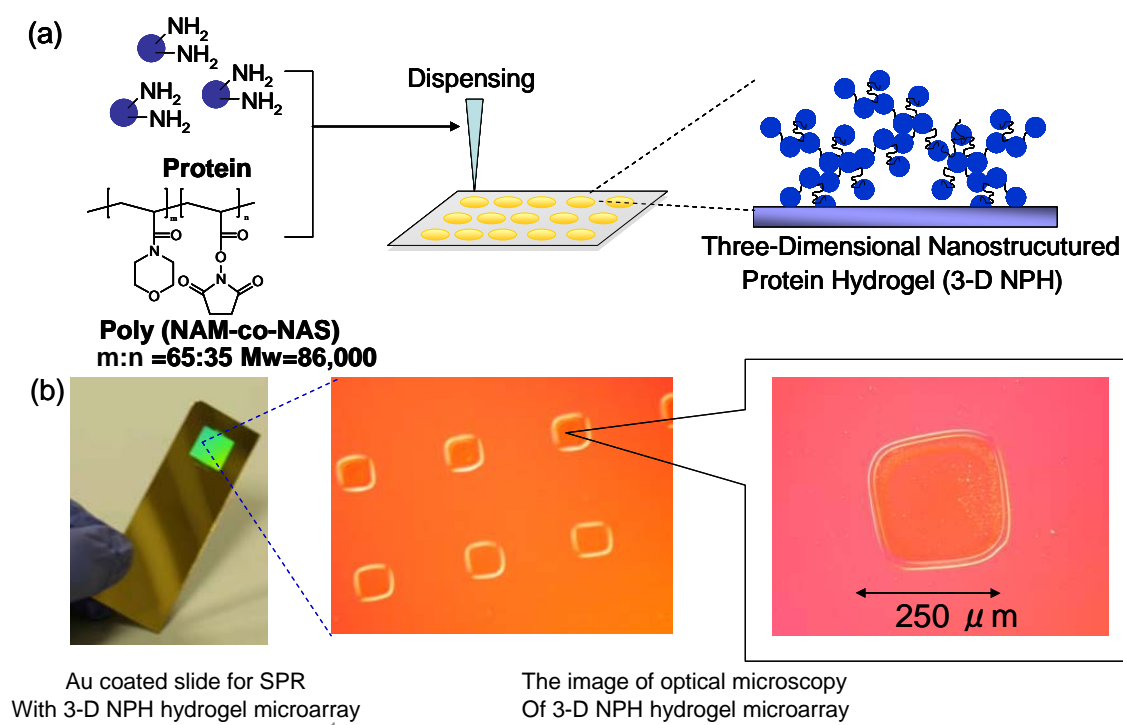


Figure 4-1 Schematic representation of 3-D Nano-structured Protein Hydrogels (3-D NPH) preparation process using ligand protein and polymer mixtures (a). The ratio of protein : polymer was 10 : 1. Optical images of 3-D NPH on Au chip surface (b). The spots on 3-D hydrogel microarray were ca. 250 μ m \times 250 μ m and almost uniform.

4-2 実験方法

4-2-1 材料

N-Acryloylmorpholine (NAM), Bovine Serum Albumin (BSA), Ethanolamine-HCl そして 16-mercaptohexadecanoic acid は、Sigma-Aldrich (MO, U.S.A.)より購入した。Mouse IgG は、LAMPIRE Laboratory (PA, USA)より購入した。*N*-Acryloxysuccinimide (NAS)は、Acros Organics (NJ, U.S.A.)より入手した。*N*-Ethyl-*N*-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide (EDC)は、Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)から購入した。Protein A - Au colloid particles は、Aurion Immuno Gold Reagents & Accessories (Wageningen, The Netherlands)より入手した。Anhydrous dioxane, dimethylformamide, *N*-hydroxysuccinimide (NHS), DMF, azobisisobutyronitrile (AIBN) , PBS Tablet, Tween 20, diethylether は、Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)から入手した。

4-2-2 反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)の作製とキャラクタリゼーション

Poly(NAM-co-NAS)は、既報^[14]に従い、無水ジオキサン中、NAM:NAS 比 80:20 のモル比においてフリーラジカル重合により作製した。総モノマー濃度は、0.5 M とした。その共重合は、60°C、4 時間で AIBN を使用した。Poly(NAM-co-NAS)は、大量のエチルエーテルを用いて再沈澱し、減圧濾過により回収した。分子量は、HLC-8220GPC(L)と TSK gel GMPWx1 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより決定された。展開液は、50 mM LiBr を含有の DMF を用いた。また、流速は、0.5 mLmin⁻¹ とした。Poly(NAM-co-NAS)の組成は、既報^[15]に従い、Poly(NAM-co-NAS)の ¹H-NMR により決定した。

4-2-3 Thin 3D NPH-Mouse IgGの作製

金基板表面にカルボキシル基を導入するために、10 mM 16 mercaptohexadecanoic acid エタノール溶液に室温下、12 時間で金被覆樹脂製基板を浸漬した。活性エステル基を導入するために、金表面上のカルボキシル基に EDC (0.2 M) / NHS (0.05 M)水溶液を用いて、室温下、15 分で活性化反応を行った。リガンドタンパク質として、Mouse IgG 抗体 (MW. 150 kDa, LAMPIRE Laboratory, PA, U.S.A)を使用した。接触型ピン方式スポットター(Omni Grid Accent, Genomic Solutions, U.S.A.)を用いて、乾燥工程を経てリガンドタンパク質 Mouse IgG のアミノ基と反応するスクシンイミド基が導入された SAM 化金基板表面に、PBS 緩衝液中に溶解させた Mouse IgG と Poly(NAM-co-NAS)の混合溶液([Mouse IgG]:[Poly(NAM-co-NAS)]=10:1 (w:w))を 3 nL 滴下した。滴下後、室温、1 時間でチップ基

板をインキュベートした。

Mouse IgG と Poly(NAM-co-NAS)を 3D NPH 法にて固定化した後、サンプルを滴下していない Au 基板表面の領域をブロッキングし、さらに未反応のスクシンイミド基をマスキングするために、3 % BSA 含有 1 M エタノールアミン水溶液(pH 8.5)を用いてチップ基板を室温、30 分間浸漬した。PBS 0.05 % Tween 20 (PBST)を用いて 5 回チップの洗浄を行い、次にミリ Q 水にて 5 回チップを洗浄した。その後、窒素ガスを用いてチップ基板上の水分を除去した。作製された 3D NPH を以降、Thin 3D NPH-Mouse IgG とする。

Thin 3D NPH-Mouse IgG の測定の対照を作製するために、Poly (NAM-co-NAS)を含まない Mouse IgG 溶液を同様の条件でチップ表面に滴下した。その後の工程は、3D NPH 作製の際と同様に行い、作製されたチップを 2D とした。3 次元固定化法の対照として CMD 表面を作製するために、既報の論文に従って金チップ表面に CMD を導入した。EDC (0.2 M) / NHS (0.05 M)の水溶液を用いてチップ基板も室温下、20 分間で活性化処理を行った。スポッターを用いて基板表面に 3 nL のタンパク質溶液を滴下した。滴下後、室温下、1 時間でチップをインキュベートした。サンプルを滴下していない Au 基板表面の領域をブロッキングし、さらに未反応のスクシンイミド基をマスキングするために、3 % BSA 含有 1 M エタノールアミン水溶液(pH 8.5)を用いてチップ基板を室温、30 分間浸漬した。PBS 0.05 % Tween 20 (PBST)を用いて 5 回チップの洗浄を行い、次にミリ Q 水にて 5 回チップを洗浄した。その後、窒素ガスを用いてチップ基板上の水分を除去した。

4-2-4 SPRによるタンパク質間相互作用の検出

SPR の検出には、HTS Biosystems 社製アレイ型 SPR 装置 Flexchip を用いた^[7, 16, 17]。サンプルの送液は、2mL であり、その流速は、0.5mL/min で室温下にて測定を行った。検出範囲は、スポット中央の直径約 100 μ m で行った。ランニングバッファーは、PBS(pH 7.4)を用いた。固定化したサンプル量は、バックグラウンドとの共鳴角のシフト量から算出した。換算式は、0.1 deg. = 1ng/mm²で行った。アナライトタンパク質の反応量は、反応が飽和した共鳴角からベースラインの共鳴角の差分を取ることで求められた。

4-2-5 Thin 3-D NPH の構造解析

Thin 3D NPH-Mouse IgG の表面状態を光学顕微鏡により観察した。

Thin 3D NPH-Mouse IgG の膜厚は、以下のように計測した。はじめに、LA Tencor P-15 Stylus Profilometer を用いて、乾燥条件下、スポットが形成された基板表面の領域を計測し、スポット中央の高さからスポットのない領域を底辺としてその差分から膜厚を算出した。

AFM 観察は、 $1\ \mu\text{m}\times 1\ \mu\text{m}$ の視野の範囲で、室温下、乾燥状態と湿潤状態において行われた。装置は、Digital Instruments 社製 Multi mode AFM を用い、タッピングモードで行った。Nanoscope III ソフトウェアを用いて、得られた生データを解析した。乾燥状態における AFM 測定では、SSS-NCH SUPERSHARP SILICON (Nanoworld, $L=128\ \mu\text{m}$, $R<5\ \text{nm}$) をプローブとして使用した。その際のバネ定数は、 $25\ \text{N/m}^{-1}$ で、振動数は、 $263\ \text{kHz}$ であった。湿潤状態における AFM 測定では、OMCL-TR400PSA (OLYMPUS, $L=200\ \mu\text{m}$) をプローブとして使用した。その際のバネ定数は、 $0.02\ \text{N/m}^{-1}$ で、振動数は、 $7.62\ \text{kHz}$ であった。

Protein A - Au colloid particles と反応した 3D NPH-Mouse IgG の断面構造を観察するために、JEOL LEM 1200EX を用いて TEM 測定を行った。そのサンプルに、室温下、2 時間で $0.1\ \text{M cacodylate}$ バッファー ($\text{pH}\ 7.4$) 中 $2\ \text{wt.}\%$ グルタルアルデヒドを用いて固定化処理を行った。次に、室温、30 分でエタノールに浸漬し、脱水処理を行った。そして、 60°C 、48 時間で Epon 812 epoxy resin を用い包埋処理を行った。最後に、ウルトラマイクロトームを用いてサンプルを切断し、断面を得た。

4-3 結果と考察

反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)は、タンパク質が会合し、凝集体を形成する。そして、凝集体同士が結合し、細孔を有するハイドロゲルが構築される。3D NPH の作製過程を、Figure 4-1 に示した。

酵素の固定化用を開発された Poly(NAM-co-NAS)^[15]は、以下の 3 つの条件を満たすように選択された。第一に、ポリマーは、タンパク質表面のアミノ酸残基と共有結合するための反応部位を持つ必要がある。第二に、ポリマーは、タンパク質と反応する際は、水系で溶解し、重合の際は、有機溶媒系で溶解するために、両親媒性である必要がある。第三に、ポリマーは、静電的な吸着によるタンパク質の非特異吸着を抑制するために、非電荷の部位を持つことが要求される。それゆえ、Poly(NAM-co-NAS)は、ランダムコポリマーで、両親媒性の部位と反応性部位より構成される。

NAM/NAS 比率は、¹HNMR により、65/35 (mol/mol)であり、分子量は、SEC により 86000 でありことが同定された。作製されたポリマーは、水溶液に可溶であることが確認された。NAS 比率が高まると NAS 側鎖の疎水性により、水溶液に溶解しなくなることも確認された。

4-3-1 Thin 3D NPH-Mouse IgGの作製と構造解析

基板上に滴下するサンプル量を低減することで、SPR プロテインマイクロアレイに 3D NPH 法を適用させることを試みた。リガンドタンパク質 Mouse IgG と反応性ポリマー Poly(NAM-co-NAS)の混合液により 3D NPH が作製された（以降、Thin 3D NPH-Mouse IgG とする）。Figure 4-1 (a)にあるように、それは、接触型ピン方式スポッター装置を用いて基板上にリガンドタンパク質 Mouse IgG と反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)の混合溶液を滴下することによって作製された。混合溶液の 1 回あたりのサンプル量は、これまでの系の場合 1 μ L であったのに対し、接触型ピン方式スポッターを用いることでおよそ 3 nL に少量化することができた。サンプル量の大幅な少量化により、乾燥時間の短縮と、結果的に Mouse IgG と Poly(NAM-co-NAS)の結合反応時間を短縮することになった。乾燥には、従来 30 分以上の時間を必要としたが、サンプル量を 3 nL とした場合は 1 分程度であった。

Figure 4-1(b)に示されているのは、光学顕微鏡で捉えた Thin 3D NPH-Mouse IgG のスポット像である。Thin 3D NPH-Mouse IgG の SPR マイクロアレイ金基板上的スポットは、直径がおよそ 250 μ m で、各スポットはほぼ均等に作製されていた。金基板上的 10 mm 角内に 3D NPH のスポットを 96 点作製することがした。また、Thin 3D NPH-Mouse IgG は、

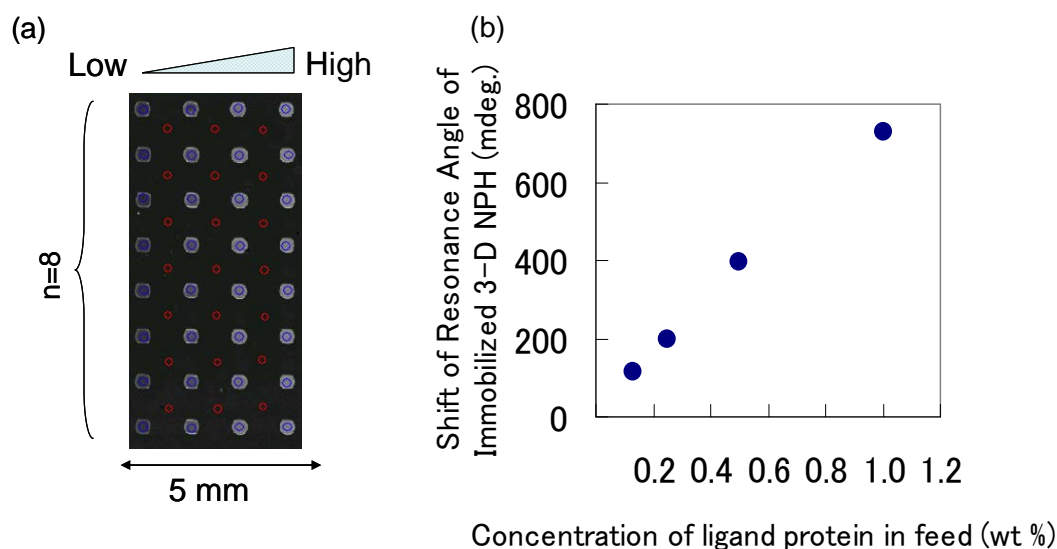


Figure 4-2 (a) SPR images of spots on the chip surface. White spots in SPR image illustrate immobilized ligand proteins. The amounts of immobilized 3-D NPH were changed by ligand protein concentrations in feed. The concentrations are increased from spots of left side. (b) The relationship between the shifts of the resonance angle of immobilized 3-D NPH and (c) the concentrations of ligand protein in feed.

ひとつの基板上で固定したい箇所にもみサンプルをスポットティングし作製することができるため、個々のリガンドタンパク質 Mouse IgG が固定化された Thin 3D NPH-Mouse IgG スポットが高度に集積化したプロテインマイクロアレイを隣接するスポットとクロスコンタミネーションすることなく、またオーバーフローもなしに作製することができる。

4-3-2 固定化されたThin 3D NPH-Mouse IgGの解析

混合液中のタンパク質濃度とチップ上に固定化された Thin 3D NPH-Mouse IgG の量の相関をみるために、リガンドタンパク質として Mouse IgG を用いてそのタンパク質濃度を変えて検討を行った。

Figure 4-2(a)は、金基板上に固定化したスポットの SPR 像である。白いスポットは、固定化された 3D NPH を示している。Thin 3D NPH-Mouse IgG の固定化量は、SPR を用いて測定された。スポットごとに固定化された Thin 3D NPH-Mouse IgG は、スポット中央の直径 150 μm 内の SPR 角度変化量より算出された。スポット端の部分は、Coffee Stain 効果と呼ばれるリング状の形状をしていた。この効果は、溶液中の対流減少により生じることが報告されている[18, 19]。本研究においては、スポット端には触れず、スポット中央部の

領域において詳細に検討を行った。

SPR センサー表面に固定化された Thin 3D NPH-Mouse IgG の量は、リガンドタンパク質 Mouse IgG 濃度に従って 727 mdeg. までほぼ直線的に増加することがわかった。SPR レスポンスは、固定化されたリガンドタンパク質 Mouse IgG 表面固定化濃度において 727 mdeg. まで少なくとも直線的に増加することがわかっている^[20]。

Figure 4-3 は、Thin 3D NPH-Mouse IgG の膜厚とリガンドタンパク質 Mouse IgG の濃度の相関関係を示している。Thin 3D NPH-Mouse IgG の膜厚は、スポットの中央から $\pm 50 \mu\text{m}$ の直径の平均膜厚によって得られた。Thin 3D NPH-Mouse IgG の膜厚は、KLA Tenkor P-15 Stylus Profilometer で測定され、リガンドタンパク質 Mouse IgG の濃度によって 5-50 nm の範囲で制御することができることが示された。膜厚は、1.0 wt% までリガンドタンパク質 Mouse IgG の濃度に伴いほぼ直線的に増加した。リガンドタンパク質 Mouse IgG 濃度 1.0 wt% において、その膜厚は、50 nm にまで達した。

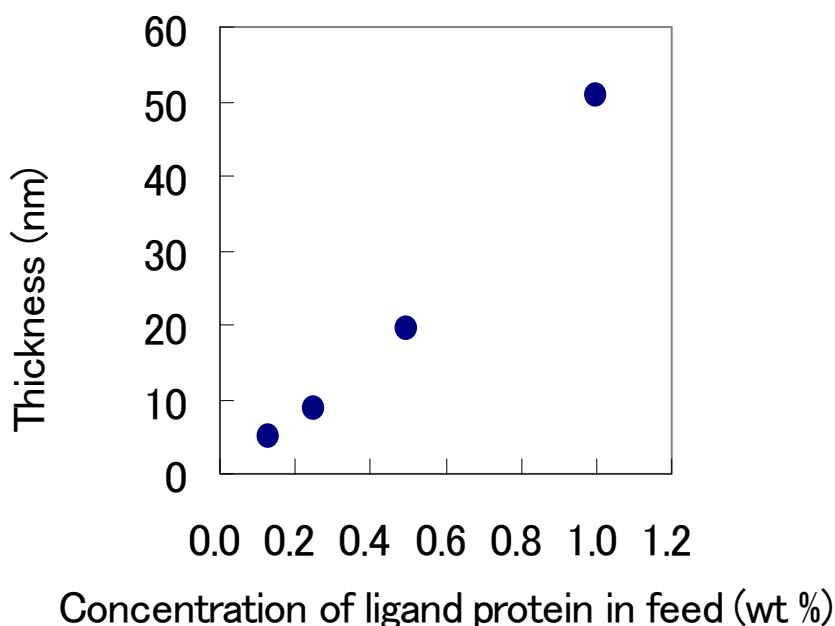


Figure 4-3 The relationship between the thicknesses of 3-D NPH and the concentrations of ligand protein in feed. The thicknesses were measured under dry condition using a KLA Tencor P-15 Stylus Profilometer.

4-3-3 AFMによるThin 3D NPH-Mouse IgGの解析

0.5 wt%, 1.0 wt %のタンパク質濃度で作製された Thin 3D NPH-Mouse IgG の表面を大気中及び水溶液中にて AFM により観察した。Figure 4-4 は、相対的に平坦なスポット中央部の領域を観察した結果を示している。

0.5 wt%の場合、金基板表面は、完全に Thin 3D NPH-Mouse IgG によって被覆されているわけではなく、いくつかの領域において金表面が暴露している箇所が観察された。加えて、その表面は、直径およそ 30 nm 程度の隆起物で覆われていた。1.0 wt%の場合、金基板表面は、堆積した Thin 3D NPH-Mouse IgG によってほぼ完全に被覆されていた。隆起物は、およそ直径 100 nm となり、比較的そのサイズが大きくなっていることが明らかになった。

次に、AFM を用いて水溶液中における Thin 3D NPH-Mouse IgG の表面状態を観察することにした。0.5, 1.0 wt%のいずれの条件で作製された Thin 3D NPH-Mouse IgG も水溶液中における表面形状を AFM により観察した結果、乾燥状態に比べ膨潤することが確認された。このことより、この Thin 3D NPH-Mouse IgG は、架橋密度が比較的低いものと考えられた。次に、水溶液中における Thin 3D NPH-Mouse IgG 表面の凹凸状態が、乾燥状態に比べ、より明確に観察された。これより、その Thin 3D NPH-Mouse IgG は、不均一であることを示唆しているものと考えられた。

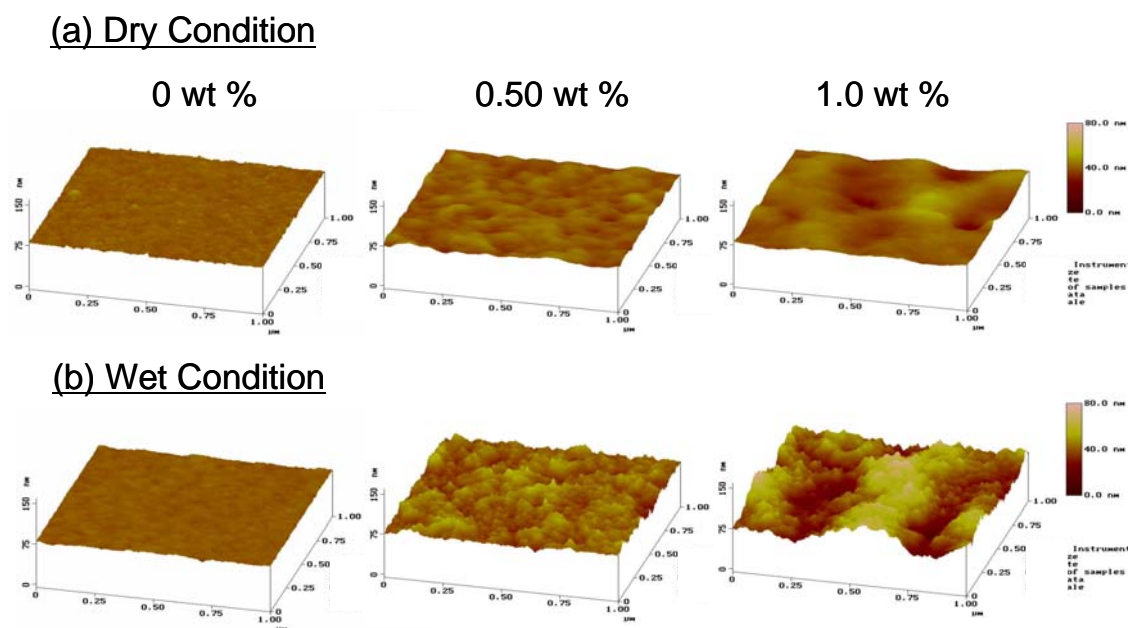


Figure 4-4 The surfaces of 3-D NPH were made by changing with the concentration of ligand protein (0, 0.50, and 1.0 wt%) in feed. (a) AFM images of a surface of 3-D NPH-IgG in dry condition; (b) AFM images of a surface of 3-D NPH-IgG in wet condition.

水溶液中における Thin 3D NPH-Mouse IgG 端の厚みは、AFM 測定により乾燥状態に比べおよそ 2 倍程度高さ方向に膨潤した。例えば、乾燥状態の膜厚測定結果と 2 倍程度の膨潤した結果を参考にして、1.0 wt%における Thin 3D NPH-Mouse IgG の膜厚は、水溶液中において 100 nm 程度になるものと推測された。この水溶液中における膜厚は、SPR 測定を行う場合に重要である。100 nm 程度の膜厚であれば、SPR 検出を行う際の基板表面から検出範囲の限界領域(200 nm 以内)に入るため、この Thin 3D NPH-Mouse IgG の SPR 測定は膜厚の点において可能である。

以上より、接触式ピン型スポッターにより作製された Thin 3D NPH-Mouse IgG マイクロアレイは高密度にナノゲルが堆積し、スポット同士が独立したものであることがわかった。

4-3-4 Thin 3D NPH-Mouse IgGを用いたタンパク質アッセイ

Thin 3D NPH-Mouse IgG マイクロアレイを SPR に適用し、タンパク質間相互作用の検出を行った。Figure 4-5 は、各 Thin 3D NPH におけるリガンドタンパク質濃度とアナライトタンパク質間の相互作用を検出した場合の SPR センサーグラムである。タンパク質間相互作用を SPR 検出するための条件として、固定化するリガンドタンパク質には Mouse IgG を使い、4 通りの濃度で固定化を行った。アナライトタンパク質としては、anti-Mouse IgG Fab'を用い、10 µg/mL の濃度にてアッセイを行った。

その結果、アナライトタンパク質 anti-Mouse IgG Fab'の SPR シグナルは、3D NPH 法により固定化されたリガンドタンパク質 Mouse IgG の固定化量の増加に伴って顕著に向上することがわかった。Figure 4-6 は、ほぼ飽和状態に達した際における固定化されたリガンドタンパク質 Mouse IgG 量と反応したアナライトタンパク質 anti-Mouse IgG Fab'量の相関を示したものである。反応したアナライトタンパク質 anti-Mouse IgG Fab'量は、Thin 3D NPH-Mouse IgG の固定量に伴い向上した。3D ハイドロゲルのシグナルは、およそ 1000 mdeg.までほぼ直線的に向上する。アナライトタンパク質 anti-Mouse IgG Fab'の送液中において固定化されたリガンドタンパク質 Mouse IgG との置換わりの可能性は、固定化された Thin 3D NPH-Mouse IgG が金基板上に導入された SAM 末端のカルボキシル基と共有結合していることから排除される。

それゆえ、リガンドタンパク質 Mouse IgG の固定化濃度によって SPR シグナルを向上させることが可能であることがわかった。

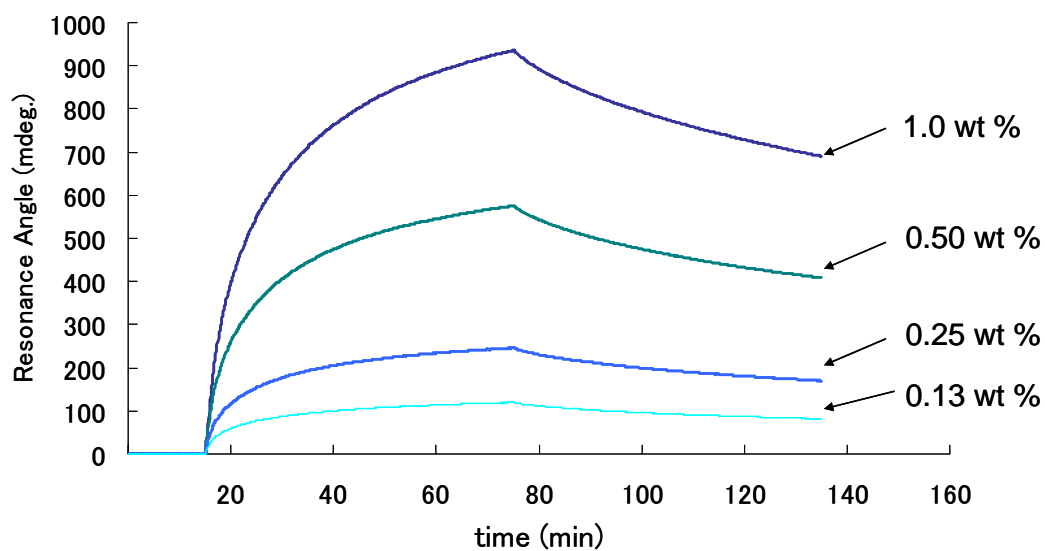


Figure 4-5 SPR measurements of the signals of protein-protein interactions were carried out by using $10 \mu\text{g/mL}$ anti-mouse IgG Fab' as an analyte and four kinds of spots carrying different amounts of 3-D NPH made of Mouse IgG.

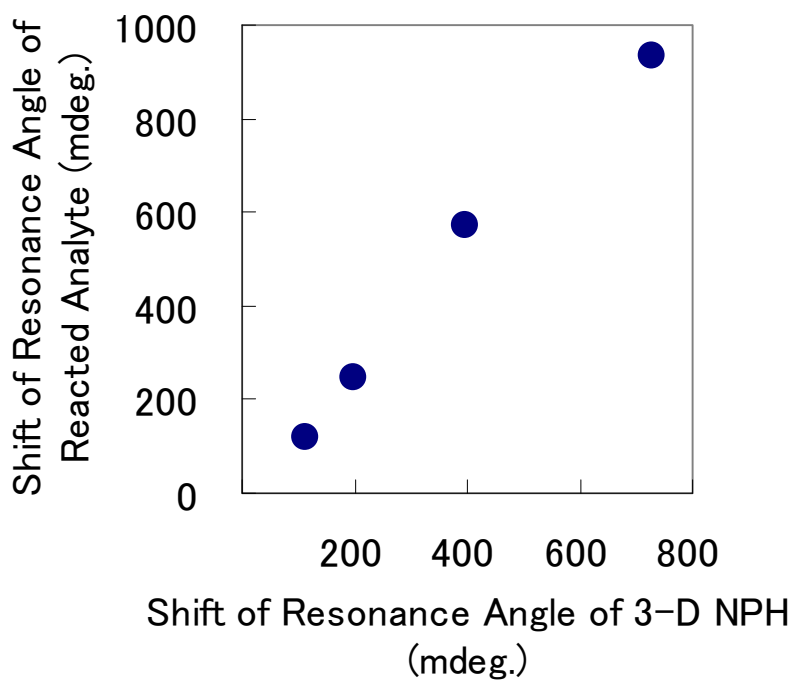


Figure 4-6 Relationship between the immobilized ligands and reacted analyte proteins amounts obtained from SPR protein microarray measurements

4-3-5 Thin 3D NPH-Mouse IgGへの非特異吸着に関する検討

Figure 4-7 は、各種基板表面への Streptavidin(SA) の非特異吸着量を SPR 測定によって求めたものである。尚、Au+SAM は SAM が表面導入された金基板を示す。2D は、1% BSA で被覆された金基板を示す。3D は、3D NPH 法によって 1% BSA が固定化された金基板を示す。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SA による非特異吸着は、3D NPH-Mouse IgG の場合ほとんど生じることなく、加えて、ウサギの血清を用いた場合も非特異吸着がほとんど検出されなかった。これは、リガンドタンパク質固定化の増加により暴露した基板表面が減少するため、Au+SAM や 2D に比べ 3D NPH-Mouse IgG への SA の非特異吸着が低減したものとする。

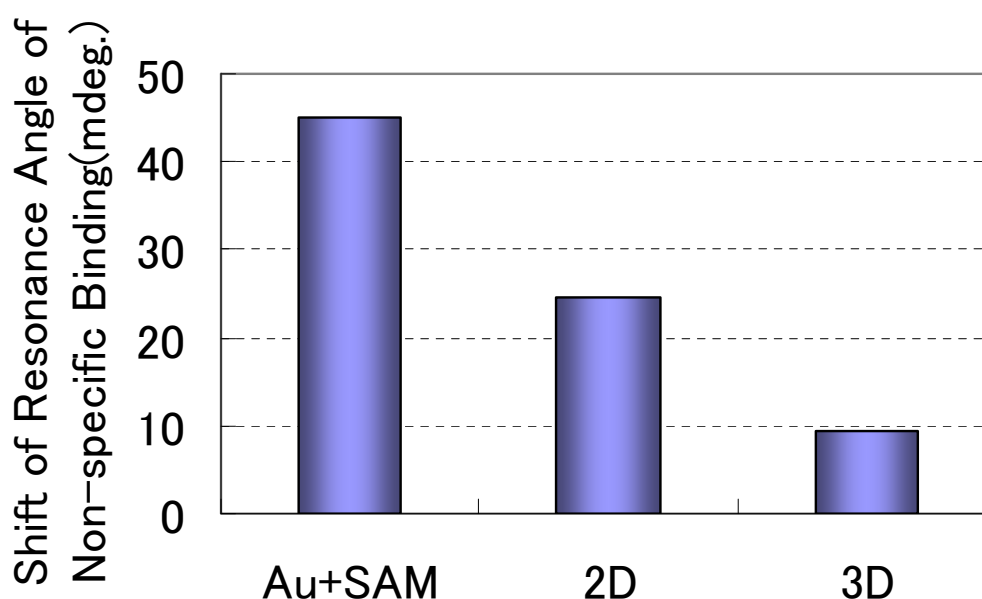


Figure 4-7 The amounts of non-specific binding of streptavidin to several substrates. Au+SAM means Au surface coated with SAM. 2D means the flat surface coated with 1% BSA. 3D means the surface coated with 3-D NPH-BSA.

4-3-6 3D NPH断面TEM像の比較

Figure 4-8 は、比較的厚い 3D NPH-Mouse IgG 層（以降、Thick 3D NPH-Mouse IgG とする）と薄い 3D NPH-Mouse IgG 層（Thin 3D NPH-Mouse IgG）にアナライトタンパク質が浸透した際の断面構造を TEM 観察した結果である。比較的厚い場合と薄い場合の 3D NPH-Mouse IgG の断面構造を比較するために、アナライトタンパク質として Protein A - Au colloid particle を用いて反応を行った後、各 3D NPH-Mouse IgG 層の断面を TEM にて観察した。TEM 像にみられる黒い点が直径 10 nm の Protein A - Au colloid particle である。TEM 像によると、Protein A - Au colloid particles は、いずれも場合も 3D NPH ハイドロゲル内に

浸透し、ハイドロゲルとして固定化された IgG 分子の Fc 領域に結合することが確認された。

Thick 3D NPH-Mouse IgG の場合、アナライト分子 Protein A - Au colloid particle(粒径 10nm)のような比較的分子量の大きい分子がハイドロゲル内に浸透可能であることが示唆される。但し、Protein A - Au colloid particles が凝集体の周囲にのみ結合し、それらの中には浸透しないことがわかる。これは、凝集体内の架橋度が高いために、凝集体内に Protein A - Au colloid particles が進入可能な空隙がないことを示唆している。

一方で、Thin 3D NPH-Mouse IgG の場合、Protein A - Au colloid particles による黒点が断面のいずれの箇所にもほぼ均等にあることが観察された。これは、滴下するサンプルが少量化された結果、乾燥時間が短縮され架橋時間が短くなったために、凝集体間の架橋度は低くなり、Protein A - Au colloid particles が薄膜全体に進入可能な空隙が均一に形成されたことを示しているものと考えられる。以上のことが、リガンドタンパク質 Mouse IgG に対するアナライトの反応効率を向上させた要因であると考えられる。

そのようなことから、接触型ピン方式スポッター装置を用いて微量のサンプル量で新しいスポンジ構造を持つ Thin 3D NPH-Mouse IgG を作製することができた。そのようにして得られたスポンジ構造を持つ薄膜のハイドロゲルを構築することで、アナライトタンパク質が浸透できない領域があるというこれまでの問題点を解消することができた。

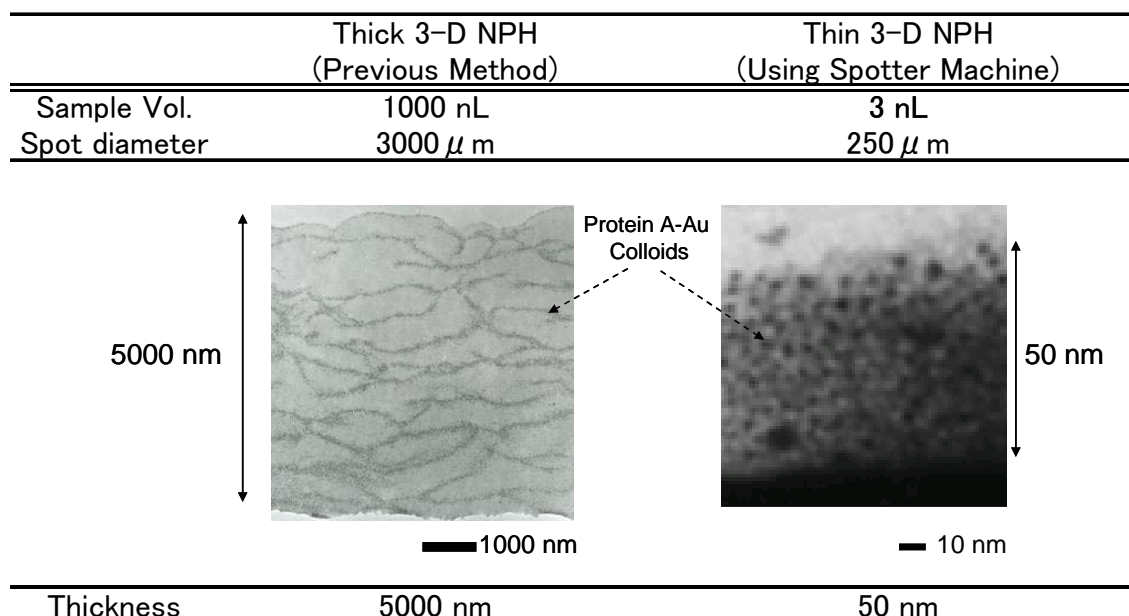


Figure 4-8 TEM images of a cross-section of thick and thin 3-NPH-IgG reacted with protein A - gold particles. Left side is the cross-section of thick 3-D NPH, and right is that of thin 3-D NPH.

4-3-7 2D、CMD、Thin 3D NPHの比較

Figure 4-9 は、薄膜の 3D NPH に対して従来用いられてきた 3D 化法のひとつである CMD と基板に直接タンパク質を固定化する 2D 法との比較を示している。この Figure 4-9 は、SPR 測定を行った場合のリガンドタンパク質 Mouse IgG 固定化量とアナライトタンパク質 anti-Mouse IgG Fab' 反応量の点について上記 3 方法を比較したものである。第一に、3D NPH 法により固定化したリガンドタンパク質 Mouse IgG 量は、2D に比べ 7 倍増加した。さらに、CMD に比べると、Thin 3D NPH-Mouse IgG のリガンドタンパク質 Mouse IgG 量は 2 倍となった。次に、Thin 3D NPH-Mouse IgG のアナライトタンパク質 anti-Mouse IgG Fab' の反応量は、2D に比べ 7 倍向上した。その上、CMD に比べると、Thin 3D NPH-Mouse IgG のアナライトタンパク質 anti-Mouse IgG Fab' の反応量は 4 倍となった。興味深いことに、固定化されたリガンドタンパク質 Mouse IgG に対するアナライトタンパク質 anti-Mouse IgG Fab' の反応率に着目すると、CMD のタンパク質間相互作用の反応効率は、30% であり、Thin 3D NPH-Mouse IgG が 88 % であったことに比べると低いことがわかった。これまでの検討結果より、Thick 3D NPH-Mouse IgG に含まれるリガンドタンパク質量 Mouse IgG は、およそ 96 wt% になることがアミノ酸分析により明らかとなっている。一方で、今回の Thin 3D NPH-Mouse IgG のスポットはあまりにも微小であるために、Thin 3D NPH-Mouse IgG に含まれるリガンドタンパク質 Mouse IgG の正確な量を計測することはできなかった。それゆえ、今回の微量スポットにより作製された Thin 3D NPH-Mouse IgG のタンパク質含有率は、96 % と仮定した。Thin 3D NPH-Mouse IgG は、2D と同様に高いリガンド-アナライトの反応効率を示した。アミンカップリング法により、リガンドタンパク質 Mouse IgG のような比較的分子量の高い分子を CMD のようなマトリックスに固定化する場合、ポリマー鎖間で固定化分子を介して架橋が生じてしまう。その結果、相互作用を検出する際にタンパク質のようなアナライト分子はマトリックス中に浸透できないと考えられている^[21]。そのことは、今回の CMD の結果を示唆するものであると考えられる。一方、Thin 3D NPH-Mouse IgG は架橋度が比較的低い。そのため、Thin 3D NPH-Mouse IgG はポーラス構造を有するタンパク質 3 次元固定化を可能とした。従来の 3 次元固定化法に比べ、Thin 3D NPH-Mouse IgG は高い反応効率によりシグナルを顕著に向上させることができると考えられる。

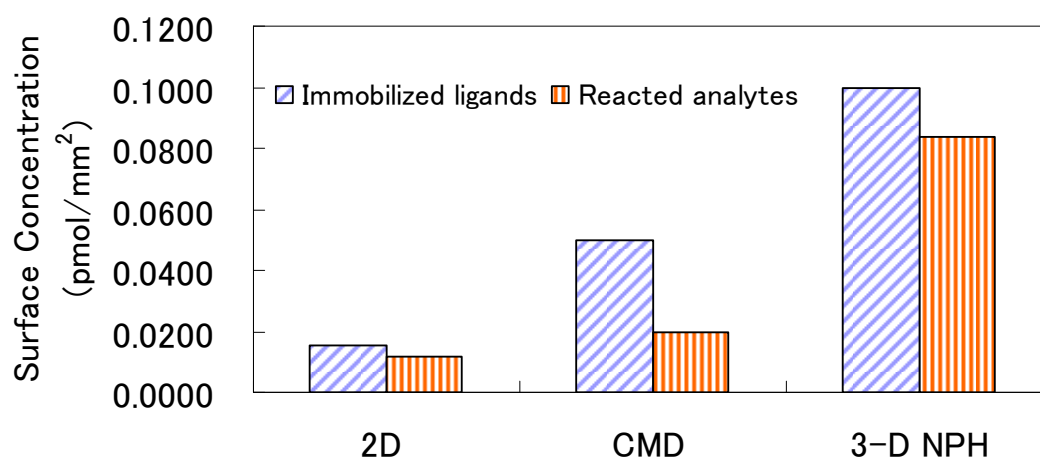


Figure 4-9 The comparison of protein immobilization methods in terms of surface concentration of immobilized ligands and reacted analyte proteins. 2-D method is left part of the graph, middle part of the graph is CMD method, and 3-D NPH method is right part of the graph.

4-4 結論

接触型ピン方式スポッターを用いて微量のサンプル混合液(3nL)を基板上に滴下することにより、Thin 3D NPH マイクロアレイの構築を試みた。その結果、サンプル量を少量化し、反応性ポリマーPoly(NAM-co-NAS)とリガンドタンパク質 Mouse IgG が結合するための時間が短縮されることで、緩く架橋したスポンジ状の構造を有する Thin 3D NPH-Mouse IgG を作製することができた。さらに、スポンジ状に 3D NPH のナノ構造が改良されたことで、アナライトタンパク質が容易に浸透できる構造を創り出すことに成功した。このために、タンパク質間相互作用のシグナルが、Thin 3D NPH-Mouse IgG マイクロアレイを用いることで効率よく向上することが示された。さらに、タンパク質の非特異吸着は、このマイクロアレイを用いた場合、本実験の範囲内において検出されないことがわかった。

したがって、3D NPH 法をプロテインマイクロアレイに適用した場合、異なる表面を形成することができる他法と比較した場合、タンパク質間相互作用におけるシグナルが顕著に向上することが見出された。

4-5 引用文献

- [1] G. MacBeath, S. L. Schreiber, Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination, *Science*, 289 (2000) 1760-1763.
- [2] A. Q. Emili, G. Cagney, Large-Scale Functional Analysis Using Peptide or Protein Arrays, *Nat Biotechnol*, 18 (2000) 393-397.
- [3] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, Protein Microarray Technology, *Trends Biotechnol*, 20 (2002) 160-166.
- [4] D. S. Wilson, S. Nock, Recent Development in Protein Microarray Technology, *Angew Chem Int Ed*, 42 (2003) 494-500.
- [5] H. Zhu, M. Synder, Protein Arrays and Micorarrays, *Curr Opin Chem Biol*, 5 (2001) 40-45.

-
- [6] H. Zhu, M. Synder, *Protein Chip Technology*, *Curr Opin Chem Biol*, 7 (2003) 55-63.
- [7] H. Koga, M. Kyo, K. Usui-Aoki, K. Inamori, A chip-based miniaturized format for protein expression profiling: The exploitation of comprehensively produced antibodies, *Electrophoresis*, 2 (2006) 3676-3683.
- [8] H. B. Lu, C. T. Campbell, D. G. Castner, Attachment of Functionalized Poly(ethylene glycol) Films to Gold Surfaces, *Langmuir*, 16 (2000) 1711-1718.
- [9] S. Lofas, B. Johnsson, A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands, *J Chem Soc Chem Commun*, 21 (1990) 1526-1528.
- [10] R. Polzius, T. Schneider, F. F. Bier, U. Biltewski, W. Kosciński, Optimization of Biosensing Using Grating Couplers: Immobilization on Tantalum Oxide Waveguides, *Biosens Bioelectron*, 11 (1996) 503-514.
- [11] J. Dai, Z. Bao, L. Sun, S. U. Hong, G. L. Baker, M. L. Bruening, High-Capacity Binding of Proteins by Poly(Acrylic Acid) Brushes and Their Derivatives, *Langmuir*, 22 (2006) 4274-4281.
- [12] Y. Zhou, O. Andersson, P. Lindberg, B. Liedberg, Protein microarrays on carboxymethylated dextran hydrogels: immobilization, characterization and application, *Microchim Acta*, 147 (2004) 21-30.
- [13] H. Tanaka, T. Isojima, M. Hansaki, Y. Ifuku, H. Takeuchi, H. Kawaguchi, T. Shiroya, Porous protein-based nanoparticle hydrogel for protein chips with improved sensitivity, *Macromol Rapid Commun*, 29 (2008) 1287-1292
- [14] F. M. Veronese, R. Largajolli, C. Visco, P. Ferruti, A. Miucci, Surface Modification of Proteins by Covalent Binding of Acrylic Polymers, *Appl Biochem Biotechnol*, 11 (1985)

269-277.

[15] F. D'Agosto, M. T. Charreyre, F. Melis, B. Mandrand, C. Pichot, High Molecular Weight Hydrophilic Functional Copolymers by Free-Radical Copolymerization of Acrylamide and of *N*-Acryloylmorpholine with *N*-Acryloxysuccinimide: Application to the Synthesis of a Graft Copolymer, *J Appl Polym Sci* 88 (2003) 1808-1816.

[16] P. Mitchell, A Perspective on Protein Microarrays, *Nat Biotechnol*, 20 (2002) 225-229.

[17] A. Okumura, Y. Sato, M. Kyo, H. Kawaguchi, Point mutation detection with the sandwich method employing hydrogel nanospheres by the surface plasmon resonance imaging technique, *Anal Biochem*, 339 (2005) 328-337.

[18] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, Capillary Flow as the Cause of Ring Strains from Dried Liquid Drops, *Nature*, 389 (1997) 827-829.

[19] Y. Deng, X-Y. Zhu, Transport at the Air/Water Interface is the Reaction for Rings in Protein Microarrays, *J Am Chem Soc*, 128 (2006) 2768-2769

[20] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins, *J Colloid Interface Sci*, 143 (1991) 513-526

[21] A. Larsson, C. X. Du, B. Liedberg, UV-Patterned Poly(ethylene glycol) Matrix for Microarray Applications, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 3511-3518.

第 5 章

総括

以上のように、プロテインマイクロアレイに適したタンパク質固定化法を創製した。本手法により、タンパク質間相互作用を検出した場合、検出シグナルが顕著に向上することが判明した。このことは、固定化されたタンパク質の単位面積あたりの固定化量が 3 次元的に増加したことによることを確認した。3D NPH は、タンパク質と反応性ポリマーの混合液を基板上に滴下することによって簡便に作製できる。そのモルフォロジー、すなわち 3D NPH の物性や生物学的機能について検討した。基板上にタンパク質と反応性ポリマーの混合液を滴下することによって簡便にタンパク質を固定化することができ、タンパク質間相互作用を検出する場合に検出シグナルが顕著に向上した。さらに、そのシグナルの向上がタンパク質の固定化量の増加によることを検証した。

次に、構造解析の結果、シグナルの向上の要因は、アナライト分子が浸透することができる空隙がハイドロゲル内に存在することによることが判明した。また、構築される 3-D NPH は、タンパク質とポリマーからなるナノ粒子が積層し形成されるポーラスな構造体であった。作製したハイドロゲルは、タンパク質と反応性ポリマーから形成されるナノ粒子の凝集体から構築される。そのハイドロゲルは、ナノ粒子が会合し形成された凝集体によって作製される。アナライトタンパク質は、凝集体間にある空隙にアナライト溶液が浸透し、膨潤したハイドロゲル中に容易に浸透することが判明した。

以上から、我々はチップ表面にタンパク質と反応性高分子の混合溶液をスポットすることで簡便に作製できる 3D NPH による高感度タンパク質固定化法を構築することができた。しかしながら、構造解析の結果によると、ハイドロゲル内には、反応に寄与せず固定化されタンパク質が存在することが予測された。より効率的なタンパク質の固定化を実現するために、タンパク質チップの検出法のひとつである SPR 法に着目し、チップ表面よりおよそ 200 nm 以下が検出範囲とされる SPR 法において、3D NPH の膜厚を制御し SPR 検出シグナルの効率的な向上が可能となった結果について検証した。

3D NPH をマイクロアレイに適用した場合、既存の方法に比べアナライト分子の補足量が大幅に向上することがわかった。また、その固定化量及び膜厚は作製条件により制御できることが判明した。この 3 次元構造体は、簡便に作製することができるため、さまざまなバイオ用途に適用可能である。

今後の展望を以下に述べる。本研究においては、タンパク質間相互作用に用いたタンパク質はあくまでモデル系であるため、今後は疾患に関連する実検体を用いた検討が必要となる。それが検証されてはじめて、予防医療に展開することができ、医療の QOL を向上さ

せることができる。例えば、診断分野では迅速な検査が必要な疾患もあるが、大型な設備等を必要とする場合、検査結果を得るまでに時間がかかってしまい処置が遅れ、疾患が進行し手遅れになることがある。一方で、プロテインマイクロアレイ以外に本研究を応用することで、再生医療分野にける細胞培養の足場材への利用、タンパク質のクラウディング現象の理解、タンパク質の保存方法への展開、タンパク質の化学修飾への展開など、他の分野への応用展開にも役立つものと期待できる。本研究において創製した 3 次元タンパク質固定化基板は、容易に作製できることから、製造の観点からも大きな利点を有する。さらに、本研究を解明することで、表面改質による界面への影響に関する点や凝集体形成におけるコロイド分散現象の理解につながることから、本研究は理論的にも重要で興味深い。

本論文に関係した論文発表

第 2 章

H. Tanaka,

Materials Integration, **20**, 52 (2007)

Preparation of Porous Proetin-based Hydrogel for Highly Sensitive Protein Microarray

H. Tanaka, M. Hanasaki, T. Isojima, H. Takeuchi, T. Shiroya, H. Kawaguchi.,

Macromolecular Symposia, **266**, 81 (2008)

Preparation of Porous Proetin-based Hydrogel for Highly Sensitive Protein Chips

第 3 章

H. Tanaka, M. Hanasaki, T. Isojima, H. Takeuchi, H. Kawaguchi, T. Shiroya.,

Macromolecular Rapid Communication, **29**, 1287(2008)

Porous protein-based nanoparticle hydrogel for protein chips with improved sensitivity

第 4 章

H. Tanaka, M. Hanasaki, T. Isojima, H. Takeuchi, T. Shiroya, H. Kawaguchi.,

Colloidal and Surfaces B, accepted (2008)

Enhancement of sensitivity of SPR protein microarray using a novel 3-D protein immobilization

T. Shiroya, H. Tanaka, M. Hanasaki, H. Takeuchi,

Methods in Molecular Biology Reverse chemical genomics Humana Press (2008)

Preparation of highly sensitive protein array using reactive polymer

学会口頭発表

Hiroyuki Tanaka*, Toshifumi Shiroya, Minako Hanasaki, Tatsushi Isojima, Hisao Takeuchi,
Haruma Kawaguchi

International Congress on Biohydrogel 2007 2007 年 11 月 17 日

Preparation of porous protein-based hydrogel for highly sensitive protein chips

Hiroyuki Tanaka*, Minako Hanasaki, Tatsushi Isojima, Hisao Takeuchi, Toshifumi Shiroya,
Haruma Kawaguchi

IUMRS International Congress in Asia 2008 2008 年 12 月 12 日

Protein-based Hydrogel for Highly Sensitive Protein Microarrays

田中裕之*、花崎美奈子、五十島健史、白谷俊史、竹内久雄

2006 年度 日本バイオマテリアル学会 2006 年 11 月 27 日

タンパク質と反応性高分子からなる機能性ハイドロゲルの構築

田中裕之*、花崎美奈子、五十島健史、竹内久雄、白谷俊史 川口春馬

2007 年度 高分子学会年次大会 2007 年 5 月 29 日

タンパク質と反応性高分子からなる複合ゲルの構造制御とその応用

田中裕之*、花崎美奈子、五十島健史、竹内久雄、白谷俊史 川口春馬

2007 年度 高分子討論会 2007 年 9 月 19 日

高感度バイオチップのための新規 3 次元タンパク質固定化法

田中裕之*、白谷俊史、花崎美奈子、五十島健史、竹内久雄、川口春馬

2008 年度 高分子学会年次大会 2008 年 5 月 30 日

膜厚を制御したタンパク質 3 次元固定化による SPR センサーの高感度化

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始にわたり御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、また社会人博士課程という大変貴重な研究機会を与えて下さいました恩師慶應義塾大学理工学部 川口 春馬 教授に衷心より感謝の意を表します。

本論文の執筆に際し、数々の貴重な御指導、御助言を賜りました群馬大学工学部 窪田 健二 教授、慶應義塾大学理工学部 戸嶋 一敦 教授、堀田 篤 准教授に深く感謝いたします。先生方との個別の議論は、大変勉強になり、思い出深い経験になりました。

輪講に際し、高分子科学に関する御指導、御鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部 藤本 啓二 教授に深く感謝いたします。

透過型電子顕微鏡撮影及び御指導を賜りました花市電子顕微鏡技術研究所 花市 敬正 博士に深く感謝いたします。

プロテインマイクロアレイに関する御指導、ご鞭撻をいただきました かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部ゲノム医学研究室 古閑 比佐志 室長に心より感謝いたします。

年齢が離れているにも関わらず、同じ学生として分け隔てなく接していただいた川口研究室の先輩と学生の皆さん、秘書の友田 祐子さんに心より感謝いたします。また、輪講で共に、高分子科学を学んだ藤本研究室の学生の皆さんに深く感謝いたします。

社会人博士課程での研究に対する御理解と御協力を賜りました株式会社三菱化学科学技術研究センター 白谷 俊史 様、竹内 久雄 様、五十島 健史 様、花崎 美奈子 様、三菱化学メディエンス株式会社 井福 康夫 様に深く感謝いたします。

研究に対する情熱とおもしろみを教えて下さいました入社当時の先輩で、川口研究室の先輩でもあります神奈川工科大学工学部 清水 秀信 助教に厚く御礼申し上げます。

最後に、終始にわたり研究生活を支えて下さいました両親、妹、祖父母に感謝いたします。

慶應義塾大学大学院理工学研究科
川口 春馬 研究室