<総 説>

(受理：平成 28 年 8 月 29 日)

抗体を固定化する単分子膜表面の構築

Fabrication of Monolayer Surface to Immobilize Antibody

田 中 睦 生*

Mutsuo TANAKA

1. はじめに

抗体とは、あるタンパク質と特異的に結合する免疫グロブリンの総称であり、この特異的結合性によって抗体はタンパク質を取り扱うライフサイエンス研究において必須のツールとなっている。1975 年に抗体産生法が見いだされて以来、免疫学的測定・解析、細胞やタンパク質の機能解析、遺伝子の発現スクリーニングなど、生命現象を個々のタンパク質レベルで解析する研究において様々な抗体が利用されている。昨今では、近未来の医療を担う薬としても抗体は注目されている。このような抗体の特異的結合性を用いた測定機器の一つとしてバイオセンサがある。診断・治療に有用なバイオマーカーやホルモンなどの生体関連物質を測定するために、抗体の特異的結合性（抗原抗体反応）を利用した様々なバイオセンサが開発されている^{1,2)}。抗体を利用した生体関連物質検出には、抗体のセンシング表面への固定化法やタンパク質の非特異吸着抑制法など、様々な技術が必要である^{3,4)}。本稿では、導波モードセンサ^{5~7)}をバイオセンサとして用いるために検討した、バイオセンシング界面構築法について紹介する。

2. バイオセンシング界面の構築⁸⁾

抗体の固定化法には、物理吸着固定化法^{9,10)}と化学結合固定化法^{11,12)}がある。物理吸着固定化法では、測定中の抗体剥離や吸着による抗体の変性の問題があるため、化学結合固定化法が望ましいとされている。抗体をセンシング表面に化学結合固定化する手法として、アミノ基と反応するスクシンイミドエステルや、メルカプト基と反応するマレイミドを有する表面修飾材料でセンシング表面を修飾

し、修飾表面と抗体を反応させて固定化するという手法が開発され、様々なバイオセンサに用いられている。

バイオセンサの測定試料は血清や唾液が代表的であり、いずれの試料にも様々なタンパク質が多量に含まれている。タンパク質には物質表面に物理的、すなわち非特異的に吸着する性質があり、センシング表面にも同様な現象が起こる。このような非特異吸着がセンシング表面に起こると測定感度は著しく低下するために、タンパク質の非特異吸着抑制はバイオセンサ開発における大きな課題となっている。さらには、タンパク質の一種である抗体は、非特異吸着によって基板に吸着されると失活してしまうことが知られている¹³⁾。非特異吸着を抑制するために様々な表面修飾材料が開発されていて、ポリエチレングリコール (PEG)^{14~16)}は非特異吸着を抑制するための代表的な表面修飾材料として広範に用いられている。高分子ではないオリゴエチレングリコール^{17~20)}の場合でも、自己集合膜 (SAM) のような単分子膜とすることによって非特異吸着を抑制できることが報告され、様々な官能基が単分子膜状態において非特異吸着抑制機能を示すことが見いだされている^{21~23)}。非特異吸着抑制材料として最近注目されているのは、ホスホリルコリン^{24~27)}やスルホベタイン^{28,29)}などのツビッター

田 中 睦 生

略歴：1987：大阪大学大学院プロセス工学研究科博士前期課程修了，1987：出光石油化学(株)，1989：工業技術院大阪工業技術試験場（現産業技術総合研究所関西センター），2005：産業技術総合研究所つくばセンター，現在に至る。1996：博士（工学）大阪大学大学院，1996：セント州立大学博士研究員，1997：南カリフォルニア大学博士研究員

専門：有機材料化学
趣味：ツーリング，山スキー，登山，梅酒と肴造り

* 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 健康工学部門
茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 〒305-8566
Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Health Research Institute
1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

図1 バイオセンシング界面模式図

イオン型官能基を導入した材料である。

以上の理由からバイオセンシング界面構築には、抗体を固定化でき、かつタンパク質等の非特異吸着を抑制できる修飾表面が必要である。このような二重機能修飾表面を構築する手法として、抗体を固定化する表面修飾材料と非特異吸着を抑制する表面修飾材料を用いた混合表面修飾法がある。図1には、抗体固定化機能と非特異吸着抑制機能という二重機能を有する修飾表面を用いて構築したバイオセンシング界面の模式図を示す。

導波モードセンサは、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサに類似したシステムを持つ、近接場光を利用したセンサの一つである⁵⁻⁷⁾。導波モードセンサをバイオセンサとして利用するために、バイオセンシング界面の構築に用いる表面修飾材料を検討した。導波モードセンサのセンシング表面はガラスであるので、ガラス表面と反応し、かつ精製が容易であるトリエトキシシランを導入した表面修飾材料の分子設計を行った。抗体固定化と非特異吸着抑制を担う官能基は、トリエトキシシラン部位と反応しないことが必須であるので、メトキシオリゴエチレングリコールを非特異吸着抑制官能基に、スクシンイミドエステルを抗体固定化官能基に選定した。オリゴエチレングリコールの非特異吸着抑制機能に関しては、鎖長が長い方が効果的であるとの報告があるので^{17,19)}、比較検討のためトリ (M3EG)、テトラ (M4EG)、ペンタエチレングリコール誘導体 (M5EG) を合成した (図2)。

混合表面修飾では、二重機能を発揮させるためには表面修飾材料の鎖長の組合せが重要であることが明らかになっている¹⁹⁾。そこで図3に示すように、それぞれの非特異吸着抑制材料よりもわずかに鎖長が長い抗体固定化材料3種類を合成した。

これらの表面修飾材料を用いて目的とする非特異吸着抑制機能や抗体固定化機能を持つ表面を構築するには、図1の模式図のように自己集合膜同等の表面濃度が高い単分子膜を形成させる必要がある³⁰⁾。そこで非特異吸着抑制材料のトルエン溶液を調整し、様々な条件下でセンシングチップの表面修飾を行い、最適表面修飾条件を探索した。非特異吸着抑制機能はウシ血清アルブミン (BSA) を用いて

図2 非特異吸着抑制表面修飾材料

図3 抗体固定化表面修飾材料

評価し、表面修飾材料の表面濃度は X 線光電分光装置 (XPS) を用いて測定した。その結果、表面修飾材料の鎖長が長くなるにつれて反応性が低下し、非特異吸着抑制機能が低下するという傾向が見られた。M3EG では室温 24 時間で十分な非特異吸着抑制効果が得られたが、M4EG では 50℃ 24 時間、M5EG では反応促進剤として 5mM の酢酸を加えて 50℃ 24 時間という条件が必要であった。次にそれぞれの最適条件下で修飾した表面の非特異吸着抑制効果を、ヒトコントロール血清を用いて評価した。血清にセンシングチップを 5 分間浸漬し、生理食塩水 (PBS) で洗浄した場合 (左側) と 0.05% 界面活性剤 (Tween20) 入り PBS で洗浄した場合 (右側, T で表示) の非特異吸着に起因する波長変化値を図4に示した。図には比較のために未修飾チップの値も加えた。図4から明らかのように、オリゴエチレングリコールの鎖長が長い表面修飾材料が非特異吸着抑制機能に優れ、界面活性剤入りの PBS で洗浄した場合は、いずれの表面修飾材料でも非特異吸着は検出限界以下となることが明らかになった。

次に、非特異吸着抑制材料 (M3EG) に抗体固定化材料 (C12Es) を混合して表面修飾を行い、その混合比による

図4 非特異吸着抑制材料の評価

図5 表面修飾材料混合比による応答変化

抗原抗体反応の変化を検討した。抗体には、糖尿病のプレマーカーとして知られるレプチンに結合する抗レプチン抗体を用いた。図5に示すように、抗体固定化表面修飾材料のモル比が増加するにしたがって応答も増大するが、ある程度以上は頭打ちとなる傾向が観測された。この傾向は、抗体固定化材料のモル比増加にしたがって固定化される抗体の表面濃度も増加するが、ある程度以上では“抗体の単分子膜”状となって飽和状態になることを反映しているためと考えられる。

非特異吸着抑制材料と抗体固定化材料の組合せと混合比を検討した結果を図6にまとめた。抗体固定化材料の鎖長が長い場合、修飾表面への導入量が減少するために固定化される抗体量も減少して応答が小さくなる傾向が見られた。

その一方で、C12Es 抗体固定化材料に、鎖長がより長い M4EG 非特異吸着抑制材料を混合した場合は、まったく応答が見られなくなるという結果が得られた。このことは、抗体固定化材料の鎖長は非特異吸着抑制材料の鎖長よりも長くなければ抗体を固定化できないことを表している。

抗体固定化材料に C12Es、非特異吸着抑制材料に M3EG を用いてセンシング界面を構築し（混合モル比=1:10）、PBS 中のレプチンの検出を実施した。図7に示すように、数十 ng/mL のレプチンが検出できることを見いだした。

次に、同じセンシング界面を用いてヒトコントロール血清中のレプチン検出を行った。図8に示すように、PBS 中に比べて血清成分の非特異吸着によって若干感度は低下するものの、100ng/mL のレプチンを検出できることから、抗体固定化材料と非特異吸着抑制材料からなる混合修飾表面は、効果的に非特異吸着を抑制できることが明らかになった。

センシング基板に固定化した抗体は、基板への非特異吸着によって失活してしまうため長期保存が困難であることが知られている¹³⁾。そこで M3EG-C12Es を用いて抗体を固定化したセンシングチップを冷蔵保管し、その応答性の経時変化を検討した。その結果、防腐剤としてアジ化ナトリウムを添加した PBS 中で保管したチップは、4 週間後もまったく応答性に変化がないことを確認した。よって M3EG-C12Es 修飾表面は、抗体を固定化しつつ非特異吸着を抑制するという優れた二重機能を有していることが示

図6 非特異吸着抑制材料-抗体固定化材料の組合せと混合比

図7 PBS 中のレプチンの検出

図8 血清中のレプチン検出

された。

同様に、様々な組合せの抗体固定化材料と非特異吸着抑制材料を用いて表面修飾を行ってセンシング界面を構築し、血清中のレプチン検出を実施した。非特異吸着抑制材料のみの修飾表面では、エチレングリコール鎖が長い表面修飾材料が非特異吸着を効果的に抑制したが、抗体固定化材料との混合修飾表面では、鎖長が長い場合は血清の非特異吸着によって著しく検出感度が低下するという現象が見られた。そこで抗体固定化材料のみで表面修飾を行い、非特異吸着を比較したところ、鎖長が長い抗体固定化材料は血清の非特異吸着を誘起することが示された。非特異吸着に対する抗体固定化材料と非特異吸着抑制材料の相反する鎖長依存性の結果として、鎖長が短い材料の組合せである、M3EG と C12Es を用いて構築したセンシング界面がもっとも高感度にレプチンを検出できることが明らかになった。

より高感度に目的物を検出するために様々な増感法が考案されている。中でも二次抗体を用いる増感法は最も効果的な手法として知られている。二次抗体に酵素や蛍光色素などを導入して増感を図る手法が開発されているが、ここでは単に二次抗体が検出タンパク質に結合することによる増感を試みた。図7と同じ条件で測定した結果を図9に示す。二次抗体を用いることにより数 ng/mL のレプチンが検出できるようになり、約 10 倍の感度増強が可能であることが見いだされた³¹⁾。

一方で、抗体を用いたセンシング界面では、図1中に示したように検出するタンパク質と結合する Fab 領域が基板側に向いて固定化されることによる感度低下が指摘されている。この課題を解決するために、抗体の Fc 領域と結合するプロテイン A や G を用いて抗体の配向性をそろえる増感法が試みられている³²⁾。そこで本混合修飾表面にプロテイン A および G を固定化し、抗レプチン抗体を導入したセンシング界面を構築して増感効果を検討したが、有意な増感効果は見られなかった。この結果は、プロテイン A や G の配向性にも考慮する必要があることを示唆している。抗体の配向性制御には、遺伝子操作によって抗体の

Fc 領域に基板と結合するアミノ酸配列を発現させるという生物学的手法が有効であることが報告されている^{13, 33)}。

3. まとめ

抗体を固定化する表面修飾材料と非特異吸着を抑制する表面修飾材料からなる混合表面修飾を、分子レベルで制御してセンシング素子に施すことによって、効果的に非特異吸着を抑制しつつ目的タンパク質を検出できるセンシング界面が構築できることを明らかにした。混合表面修飾における要点は、表面修飾材料分子の表面濃度を高める反応条件で表面修飾を行うこと、材料分子の組合せで鎖長および機能物性を考慮することであった。このような分子レベルでの機能と構造を考慮した表面修飾法が、接着技術の展開にも役立つことを期待している。

文 献

- 1) H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 55 (2003).
- 2) U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 453 (2009).
- 3) S. L. Seurynck-Servoss, A. M. White, C. L. Baird, K. D. Rodland, R. C. Zangar, *Anal. Biochem.*, **371**, 105 (2007).
- 4) Y. Kurihara, M. Takama, T. Sekiya, Y. Yoshihara, T. Ooya, T. Takeuchi, *Langmuir*, **28**, 13609 (2012).
- 5) X. Wang, M. Fujimaki, T. Kato, K. Nomura, K. Awazu, Y. Ohki, *Opt. Express*, **19**, 20205 (2011).
- 6) M. Fujimaki, C. Rockstuhl, X. Wang, K. Awazu, J. Tominaga, Y. Koganezawa, Y. Ohki, T. Komatsubara, *Opt. Express*, **16**, 6408 (2008).
- 7) M. Fujimaki, K. Nomura, K. Sato, T. Kato, S. C. B. Gopinath, X. Wang, K. Awazu, Y. Ohki, *Opt. Express*, **18**, 15732 (2010).
- 8) M. Tanaka, K. Yoshioka, Y. Hirata, M. Fujimaki, M. Kuwahara, O. Niwa, *Langmuir*, **29**, 13111 (2013).
- 9) Z. Yang, Y. Chevolot, T. Géhin, J. Solassol, A. Mange, E. Souteyrand, E. Laurenceau, *Biosens. Bioelectron.*, **40**, 385 (2013).
- 10) Z. Yang, Y. Chevolot, T. Géhin, V. Dugas, N. Xanthopoulos, V. Laporte, T. Delair, Y. Ataman-Önal, G. Choquet-Kastylevsky, E. Souteyrand, E. Laurenceau, *Langmuir*, **29**, 1498 (2013).
- 11) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules*, **8**, 1775 (2007).
- 12) P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 9618 (2008).
- 13) K. Yoshimoto, M. Nishio, H. Sugawara, Y. Nagasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 7982 (2010).
- 14) X. Yuan, K. Yoshimoto, Y. Nagasaki, *Anal. Chem.*, **81**, 1549 (2009).
- 15) H. Lee, K. D. Lee, K. B. Pyo, S. Y. Park, H. Lee, *Langmuir*, **26**, 3790 (2010).
- 16) W. Norde, D. Gage, *Langmuir*, **20**, 4162 (2004).
- 17) S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt, M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9359 (2003).
- 18) C. E. Soteropoulos, K. M. Zurick, M. T. Bernards, H. K. Hunt, *Langmuir*, **28**, 15743 (2012).
- 19) Y. Sato, K. Yoshioka, M. Tanaka, T. Murakami, M. N. Ishida, O. Niwa, *Chem. Commun.*, 4909 (2008).
- 20) K. Yoshioka, Y. Sato, T. Murakami, M. Tanaka, O. Niwa,

図9 二次抗体を用いた感度増強検出

- Anal. Chem.*, **82**, 1175 (2010).
- 21) R. G. Chapman, E. Ostuni, S. Takayama, R. E. Holmlin, L. Yan, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 8303 (2000).
- 22) E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **17**, 5605 (2001).
- 23) R. E. Holmlin, X. Chen, R. G. Chapman, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **17**, 2841 (2001).
- 24) V. A. Tegoulia, W. Rao, A. T. Kalambur, J. F. Rabolt, S. L. Cooper, *Langmuir*, **17**, 4396 (2001).
- 25) S. Chen, J. Zheng, L. Li, S. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 14473 (2005).
- 26) Y. Iwasaki, K. Ishihara, *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 534 (2005).
- 27) M. Tanaka, T. Sawaguchi, Y. Sato, K. Yoshioka, O. Niwa, *Tetrahedron Lett.*, **50**, 4092 (2009).
- 28) A. T. Nguyen, J. Baggerman, J. M. J. Paulusse, C. J. M. van Rijn, H. Zuilhof, *Langmuir*, **27**, 2587 (2011).
- 29) H. Jiang, X. B. Wang, C. Y. Li, J. S. Li, F. J. Xu, C. Mao, W. T. Yang, J. Shen, *Langmuir*, **27**, 11575 (2011).
- 30) M. Tanaka, T. Sawaguchi, M. Kuwahara, O. Niwa, *Langmuir*, **29**, 6361 (2013).
- 31) 未発表データ
- 32) N. Tajima, M. Takai, K. Ishihara, *Anal. Chem.*, **83**, 1969 (2011).
- 33) Y. Kumada, Y. Ohigashi, Y. Emori, K. Imamura, Y. Omura, M. Kishimoto, *J. Immunol. Meth.*, **385**, 15 (2012).
-