



Highly sensitive detection of biomolecules combining biological membrane and nanometric gap structure

安藤, 公二

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Date of Publication)

2026-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7215号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007215>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 安 藤 公 二

専攻・講座 生命機能科学専攻 農環境生物学講座

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Highly sensitive detection of biomolecules combining biological membrane and nanometric gap structure (人工生体膜とナノ空間を利用した超高感度分子計測技術 の開発)

指導教員 森 垣 憲 一

1 分子蛍光計測技術の発展により分子の平均的な挙動ではなく 1 分子の挙動が理解されるようになり生物学や農学への発展に貢献している。全反射顕微鏡や、ゼロモード導波路といった既存の 1 分子蛍光計測技術ではサンプル界面から 200 nm 以下の空間にまで照射領域を抑えることで、バックグラウンド蛍光を抑えた 1 分子観察が可能となっている。一方これらの手法では、多くの夾雑分子が存在する条件や、高濃度で分子が存在する条件ではバックグラウンドノイズが大きく、1 分子計測することが難しい。しかし、細胞膜は生体内において多くの夾雑分子が存在する中で特定の低濃度分子を検出し、シグナルとして細胞内へ伝達している。本研究では細胞膜を人工的に基板表面に作製した人工生体膜を用いることで新規バイオセンシング技術の開発を行った。人工生体膜とナノ空間を組み合わせることで夾雑分子(バックグラウンドノイズ)の中から標的となる分子を選択的に検出する技術を開発した(第 2 章)。次に人工生体膜表面で抗体を用いた疾患関連生体分子(バイオマーカー)検出技術の確立を行なった(第 3 章)。更なる高感度検出を目指し、人工生体膜とナノ空間を用いたバイオマーカーの検出を行なった(第 4 章)。

第 2 章では、人工生体膜とエラストマー材料(Polydimethylsiloxan; PDMS)とを組み合わせたナノ空間(ナノギャップ構造)を作製し、夾雑分子と標的分子が混在する中から標的分子の選択的検出を行った。光重合性脂質を基板上でパターン化重合した二分子膜(ポリマー膜)を作製し、流動性を維持している脂質膜(流動性膜)を組み込むことで 1 枚の基板にポリマー膜と流動性膜を組み合わせたハイブリッド膜を作製した。ポリマー膜と PDMS を 100 nm ほどの厚さを持つ接着層を介して接合することで、流動性膜と PDMS との間に 100nm ほどのナノギャップ構造を形成した。流動性膜には糖鎖脂質(GM1)を組み込んでナノギャップ構造を作製し、蛍光標識されたコレラ毒素(CTB)と、牛血清アルブミン(BSA)の混合溶液を導入した。CTB は GM1 に特異的に結合することが知られており、CTB の蛍光がナノギャップ構造内へ移動していく様子が確認された。一方、流動性膜と結合しない BSA はナノギャップ構造内を選択的に入っていく様子は確認されなかった。ナノギャップ構造内に見られる蛍光(シグナル; S)と、接着層に入り込む蛍光(ノイズ; N)として S/N 比を比べると、ナノギャップ構造内の S/N 比は、溶液導入部の S/N 比の 50 倍近い値になることがわかり、ナノギャップ構造が夾雑分子の多い条件下でも標的となる分子を高感度に検出できる構造であることが示された。

第 3 章では、人工生体膜を用いたアッセイ手法の確立を行った。非特異吸着が抑えられる生体膜表面による高感度計測技術を目指した。ガラス基板に作製された二分子膜表面で抗体によるバイオマーカーのサンドイッチイムノアッセイを行った。非標識バイオマーカーを 2 種類の抗体を用いて検出した。1 つをバイオマーカー捕捉用の抗体として流動性膜表面に提示させ、もう 1 つを蛍光染色し、検出用抗体として用いた。本研究において、抗体は抗原と結合する fab'領域を切り出し使用した。fab'には抗原と反応する領域とは反対の領域にチオール基をもち、選択的に分子修飾が可能である。捕捉用抗体を流動性膜に提示さ

(氏名：安藤 公二 NO. 2)

せるため、3つの手法で抗体を平面膜表面へ組み込んだ。1つ目の検討は、fab'を脂質分子と結合させ、界面活性剤(オクチルグルコシド)を用いる手法、2つ目はfab'を脂質と結合させ、シクロデキストリン(mCD)を用いて平面膜に導入する手法、3つ目は平面膜にアジド基をもつ脂質を用いてfab'とアルキン分子を結合させ、アジド-アルキンのクリック反応を利用する手法である。全ての手法でfab'の平面膜への導入が確認されたが、クリック反応を用いることで効率よく流動性膜表面に抗体を結合させることが可能となった。次に前立腺癌のバイオマーカー(prostate specific antigen; PSA)のサンドイッチアッセイを行なった。PSAの濃度に応じて流動性膜表面の蛍光強度が増加していくことを確認した。さらに、既存で発売されている磁性ビーズを用いた検査キット(CLIA法)の検出限界 0.08 ng/mL よりも1桁低濃度の 0.0025 ng/mL の PSA を検出することができた。これにより、人工生体膜を用いることで高感度な検出が可能であることが示された。

第4章ではナノギャップ構造を用いた高感度分子検出技術を開発した。ナノギャップ構造は膜と特異的に結合したタンパク質を選択的に、かつ高感度に検出できる。そのため、検出限界を決める要因となる非特異吸着を抑えた検出が可能となると考えられた。ナノギャップ構造内での PSA サンドイッチ検出を行なった。ナノギャップ作製後、捕捉用抗体を平面膜と結合させ、非標識 PSA は検出用抗体と同時に導入した。捕捉用抗体-PSA・検出用抗体の複合体は脂質の拡散によりナノギャップ構造内へ移動し検出された。PSA 濃度を変化させて(0.89nM, 89nM, 8.9μM)導入し、膜表面での蛍光値変化を確認した。PSA の濃度が増加するに従い膜表面の蛍光値が上昇したため、ナノギャップ構造内において分子定量が可能であることが示された。同時に 0.89 nM (0.00025 ng/mL)という平面膜の上では検出できなかった低濃度においても PSA が検出できたことが示された。これによりナノギャップ構造は高感度分子計測技術として有用であることを示した。

さらに、既存の1分子蛍光計測技術である全反射顕微鏡(TIR-FM)を用いてナノギャップ構造との S/N 比を比べることで、1分子計測技術としての有用性も確認した。全反射顕微鏡では高濃度条件下での1分子を観察することができない。そこで、分子が高濃度で存在する中でもナノギャップ構造を用いることで1分子観察が可能であることを示した。これにより、ナノギャップ構造が全反射顕微鏡よりも高い S/N 比を持つことが示され、医療応用だけでなく様々な1分子計測へと応用できる可能性を示すことができた。

本博士論文においてナノギャップ構造を作製し、高感度検出技術へと発展させることを目的として研究を行なった。高い検出技術が求められている診断領域において、既存の手法よりも高感度な手法を作製することができた。さらに TIR-FM を用いた1分子計測技術よりも高い S/N 比で分子検出できることが示された。そのため、共存分子の多い血液から1分子での PSA 検出を行うことでさらなる高感度観察が可能であると考えられる。また、ナノギャップ構造は医療応用だけでなく、様々な分野に応用できると思われる。例えば、環境物質の検出や、病気の原因分子の1分子挙動解明、膜タンパク質と分子の1相互作用な

(氏名：安藤 公二 NO. 3)

どがリアルタイムに1分子観察可能である。ナノギャップ構造の利用により、医学、農学、薬学など幅広い領域の発展において大きく貢献できるものと期待している。

氏名	安藤 公二		
論文 題目	Highly sensitive detection of biomolecules combining biological membrane and nanometric gap structure (人工生体膜とナノ空間を利用した超高感度分子計測技術の開発)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	准教授	森垣 憲一
	副 査	教授	藤嶽 暢英
	副 査	教授	宅見 薫雄
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
環境中、食品中、体内などに存在する生体分子を高感度に検出する技術は、環境モニタリング、食品安全検査、医療診断など、多様な分野において基盤をなす重要なものである。近年では、1分子蛍光計測技術の発展により、多くの分子の平均的挙動ではなく個別分子の挙動を1分子ずつ計測することで生体分子の特性や機能がより正確に理解されるようになってきている。また、1分子蛍光計測技術を応用することで、1分子のDNAから遺伝子配列を決定する超高速シーケンシング技術が実用化されている。一方で、これらの手法では、体液や環境サンプルなど、多種多様な夾雑分子が高濃度で存在する条件において特定分子を高感度で検出することは困難であった。そこで、本研究は生体膜の物性や機能を模倣して、高濃度の夾雑分子が存在する環境下でも特定の生体分子を1分子ずつ計測できる新規バイオセンシング技術の開発を行った。生物は、多くの夾雑分子が存在する環境中においても、低濃度の特定分子を超高感度に検出し、シグナルとして伝達している（例えば、カイコは空気中に存在する極微量のフェロモンを検出して、オスがメスを追尾できる）。このような超高感度、高選択性の生体分子検出を可能にしているのが細胞膜を介したシグナル伝達機構である。細胞膜はタンパク質の非特異吸着を抑えるリン脂質からなり、膜に結合したタンパク質や糖鎖が特定の分子を分子認識で検出することができる。また、リン脂質二分子膜構造は二次元の液晶構造を持ち、分子が側方拡散することで特定のシグナルを選択的に増幅することを可能にしている。本研究では、ガラスなどの固体基板表面に生体膜を模した人工生体膜を作製し、高分子エラストマー材料との間に厚さ数十ナノメートルの微小空間を形成することで、夾雑分子が存在する環境下で特定の生体分子を選択的、高感度に検出することを可能にした。			
第1章では、全反射顕微鏡や、ゼロモード導波路といった既存の1分子蛍光計測技術の原理を説明し、高濃度の夾雑分子が存在する環境下で特定の生体分子を1分子ずつ計測できる技術を開発する重要性和本研究の目的について述べている。既存技術は、全反射やゼロモード導波路といった原理で照射領域をナノ空間に限定することで、バックグラウンド蛍光を抑制し1分子観察が可能となっているが、多種多様な夾雑分子が高濃度で存在する条件において特定分子を高感度で検出することは困難である。一方、生体膜は、非特異的吸着の抑制、2次元側方拡散（流動性）と言ったユニークな物性ゆえに、多くの夾雑分子が存在する環境中においても低濃度の特定分子を超高感度に検出しシグナルとして伝達することが可能である。そのような背景にもとづき、人工生体膜とナノ空間とを組み合わせた研究開発のコンセプト、意義が説明されている。			
第2章では、人工生体膜と高分子エラストマー材料（Polydimethylsiloxan; PDMS）とを組み合わせ、厚さが数十ナノメートルの空間（ナノギャップ構造）を形成する技術の開発を行っている。光重合性脂質をガラス基板表面でパターン化重合した二分子膜（ポリマー膜）と、生体膜由来の流動性を維持している天然脂質膜（流動性膜）を組み合わせることで、1枚の基板にポリマー膜と流動性膜を組み合わせたパターン化ハイブリッド膜を作製することが可能である。そして、ポリマー膜とPDMSを厚さ100 nmほどの接着層を介して接合することで、流動性膜とPDMSとの間に同程度の厚さを持つナノギャップ構造を			

氏名	安藤公二
形成した。そして、流動性膜に特定分子にのみ結合できる分子（例：糖鎖脂質(GM1)）をあらかじめ含ませることで、水溶液中にある分子群の中から、その分子に特異的に結合できる分子のみが流動性膜に結合において背景蛍光（ノイズ）を抑制して、高い検出感度（シグナル・ノイズ比：S/N 比）で検出される。本研究では、モデル分子として蛍光標識されたコレラ毒素(CTB)と牛血清アルブミン(BSA)を用い、それらの混合液の中から CTB を選択的に検出した。CTB は GM1 に特異的に結合することが知られており、膜に結合した CTB 分子が膜側方拡散によりナノギャップ構造内に選択的に輸送された。一方、流動性膜と結合しない BSA はナノギャップ構造内に入っていくことができなかった。ナノギャップ構造内に見られる CTB の蛍光（シグナル; S）と、接着層に入り込む非特異的蛍光（ノイズ; N）の比（S/N 比）は、通常の微小流路（幅・高さ数十マイクロメートル）と比較して 50 倍ほどになることがわかり、ナノギャップ構造が夾雑分子の多い条件下でも標的となる分子を高感度に検出できる構造であることが示された。	
第3章では、人工生体膜を用いた生体分子計測技術の確立を行った。ナノギャップ構造での生体分子検出を目標として、ガラス基板に吸着した二分子膜表面において、非標識バイオマーカーを2種類の抗体を用いて検出した（サンドイッチイムノアッセイ）。バイオマーカー捕捉用抗体を流動性膜表面に提示させ、検出用抗体には蛍光色素を結合した。抗体分子中で抗原と結合する fab' 領域を切断し、抗原と反応する領域と反対側にあるチオール基に選択的に分子修飾を行なった。捕捉用抗体を流動性膜に提示させるためには、あらかじめ fab' を脂質分子と結合させて界面活性剤やシクロデキストリン（mCD）を用いて平面膜に導入する手法、クリック反応を用いて fab' と脂質をパターン化人工膜表面に直接結合する手法が検討された。クリック反応を用いる手法の方が高効率で流動性膜表面に抗体を結合させることができた。これらの技術をもとに、前立腺癌のバイオマーカーである prostate specific antigen（PSA）の検出を行なった。PSA の濃度に応じて流動性膜表面の蛍光強度が増加していくことを確認した。さらに、既存で発売されている磁性ビーズを用いた検査キットよりも1桁低濃度の PSA を検出することができた。この結果により、人工生体膜を用いることで高感度な検出が可能であることが示された。	
第4章では、ナノギャップ構造を用いた生体分子の高感度分子検出技術を開発した。ナノギャップ構造は流動性膜と特異的に結合した生体分子のみを選択的かつ高感度に検出できる。そのため、検出限界を決める要因である非特異吸着によるノイズを抑えた検出が可能となる。また、1分子ずつを計測することで、従来技術にはない正確な分子検出が可能になるものと期待される。この高感度検出原理を実証するために、ナノギャップ構造を用いた PSA 検出を行なった。捕捉用 fab' と検出用 fab' を用いることで、非標識 PSA に結合した捕捉用 fab'-PSA-検出用 fab' の複合体が脂質膜側方拡散によりナノギャップ構造内へと選択的に輸送された。ナノギャップ構造内部において PSA-抗体複合体を1分子ずつ計量することで、より低濃度の PSA を検出することが可能となった。これらの結果によりナノギャップ構造が、超高感度分子計測技術として有用であることを実証した。さらに、既存の1分子蛍光計測技術である全反射顕微鏡ではバックグラウンド蛍光が高すぎて1分子検出ができない高濃度条件下でも1分子を観察することができ、高濃度の夾雑分子がある条件下でも特定の生体分子を1分子計測できることが示された。これは、ナノギャップ構造を用いた生体分子計測が医療診断、環境計測など幅広い分野に応用できることを示唆する極めて重要な成果である。	
以上のように、本研究は、人工生体膜とナノ空間（ナノギャップ構造）を利用した生体分子の高感度検出技術を開発した。生体膜の持つ特異な表面物性と二次元側方拡散を、厚さ数十ナノメートルの微小空間と組み合わせることで、高濃度の夾雑分子がある溶液中で特定の生体分子を選択的に高感度で検出することが可能になった。特に、脂質膜表面におけるサンドイッチイムノアッセイと組み合わせることで、蛍光標識されていない生体分子（例：腫瘍マーカー）をナノギャップ構造に選択的に導入して検出することに成功した。そして、高い S/N 比で1分子検出することで、従来技術にはない超高感度検出が可能であることが示された。これらの結果は、ナノギャップ構造が医療診断だけでなく環境計測など幅広い分野に応用できることを示唆している。例えば、環境中汚染物質、食品成分などの検出をさまざまな夾雑分子の存在する溶液で行えるものと期待される。従って、本研究は、医学、農学、薬学など幅広い領域の発展において大きく貢献できる極めて重要な価値のある知見の集積であると言える。よって、学位申請者の安藤公二は、博士（学術）を得る資格があると認める。	