



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。



別紙様式3 (博士論文審査等内規第2条関係)

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 _____

(氏名: 安藤 公二 NO. 1)

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に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免疫アッセイを行った。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, 8,9 μ M)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中から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。