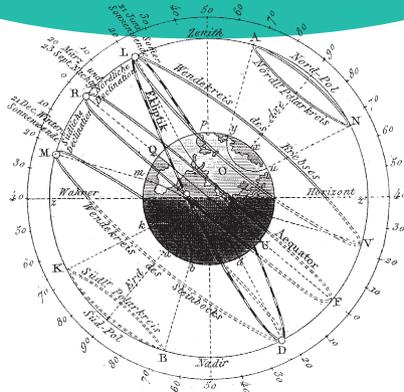


【解説】



【2017年農芸化学女性研究者賞】

ナノ界面における生体分子の精密整列固定化技術： バイオナノカプセル

バイオセンシングの高感度化に向けて

飯嶋益巳*¹，黒田俊一*²

生体分子間相互作用を検出するバイオセンシング技術は、食品、環境、医療、セキュリティなどの応用分野のみならず、農芸化学をはじめとする生命科学などの基礎分野においても極めて重要な技術である。バイオセンシングの感度や特異性を向上させるためには、センシング分子（例、抗体、受容体、レクチン、酵素など）と標的物質（抗原、リガンド、糖鎖、基質など）が効率良く結合できるように、ナノ界面でセンシング分子をクラスター化し、その配向性を精密に制御して整列固定化できる足場分子が鍵となる。本稿では、筆者らが開発した「バイオナノカプセル足場分子」を用いたセンシング分子のクラスター化および精密整列固定化技術、および本技術を用いた各種バイオセンシングの高感度化について解説する。

従来のセンシング分子固定化技術

本稿では、代表的な生体分子間相互作用である抗原抗

体反応を例にとり、イムノグロブリン (immunoglobulin (Ig)) Gの固定化技術について概説する⁽¹⁾ (図1A)。最も古典的なIgG固定化法は、ファンデルワールス力、疎水性、電荷などの物理的吸着力を用いたものであるが (図1A-a)、IgGの配向性がランダムになり、抗原結合部位 (Fv) 周辺の立体障害により標的物質の認識能を十分に引き出すことができない。次に、リンカー (例、polyethylene glycol (PEG) 鎖、アルキル鎖、DNA) (図1A-b)、自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer (SAM)) (図1A-c) に、IgG表層のフリー NH₂基やフリー COOH基、Fc領域に存在する糖鎖を化学結合させて固相上に完全長IgGを固定化することで、ある程度Fv周辺の立体障害を低減させた方法が開発された。しかし、一般的にIgG表面での化学修飾部位が定まらないためIgGの配向性がランダムになるとともに、化学修飾によるIgGの変性が課題である。一方、Fc結合能を有するタンパク質やペプチドを用いる方法 (図1A-d) やリンカーやSAMと組み合わせる方法 (図1A-e) は、完全長IgGを未修飾のまま固定化することができるが、足場分子自身の配向性制御が困難なため、IgGの完全な整列化は達成できない。さらに、断片化IgGであるFab'

Precise Oriented Immobilization of Biomolecules on Nano-Interface with Bio-Nanocapsule: Aiming at the Establishment of Sensitive Biosensing Techniques

Masumi IJIMA, Shun'ichi KURODA, *¹東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科, *²大阪大学産業科学研究所生体分子反応科学研究分野

◇◇◇ コラム ◇◇◇

「バイオセンシング技術」とは、生体分子間相互作用を定量化する技術で、農芸化学を含むライフサイエンス分野において必須なテクニックです。具体的には、生体内に侵入した異物を排除する免疫機構で中心的な役割を果たす「抗体と抗原」、細胞増殖や分化の開始シグナルとして機能する「受容体と成長因子」、細胞間認識に重要な役割を果たす「レクチンと糖鎖」、生体分子の合成や分解を行う「酵素と基質」などの2分子間相互作用を特異的に検出し、その相互作用の程度に従い、電気、蛍光、発光、色素などを生成させて定量するものです。その用途としては、食品に含まれる「アレルゲン、微生物、毒素」、水・土壌・大気に含まれる「有害物質、環境ホルモン」、臨床検査における「ウイルス、細菌、疾患マーカー」、さらにセキュリティにおける「危険物、薬物」などの生体および細胞に直接作用する物質などの検出に使用されます。主な測定原理は、サンプルを固相に接触させて、測定対象物質（抗原、成長因子、糖鎖、基質など）を固相に結合させ、次に放射性物質・蛍光色素・酵素などで標識したセンシング分子（抗体、受

容体、レクチン、酵素など）を液相に添加して、生成した「測定対象物質・センシング分子複合体」を標識物質量により定量します。最近では、煩雑なセンシング分子の標識操作を省き（ラベリフリー化）、一層の高感度化を目指すために、センサー基板（固相）に固定したセンシング分子に液相の測定対象物質が結合した際、極小な重量変化を定量する「水晶発振子微量天秤法」やプラズモン波発生による屈折率変化を定量する「表面プラズモン共鳴法」、または液相中での「測定対象物質・センシング分子複合体」形成に伴う偏光度変化を定量する「蛍光偏光法」などが行われています。また、サンプルのハンドリングを手動ではなく、微細加工技術に基づくマイクロ流路系に搭載することで、多数のサンプルを短時間で測定できるハイスループット化が行われています。さらに、本稿でも述べたように、一般的に高価であるセンシング分子の使用量を可能な限り少なくし、無駄なく生体分子間相互作用に供して、さらに高感度化を達成するために、センサー基板に固定するセンシング分子のクラスター化（最密充填化）および精密整列固定化（配向性の一定化）を行う足場分子技術の開発が急がれています。

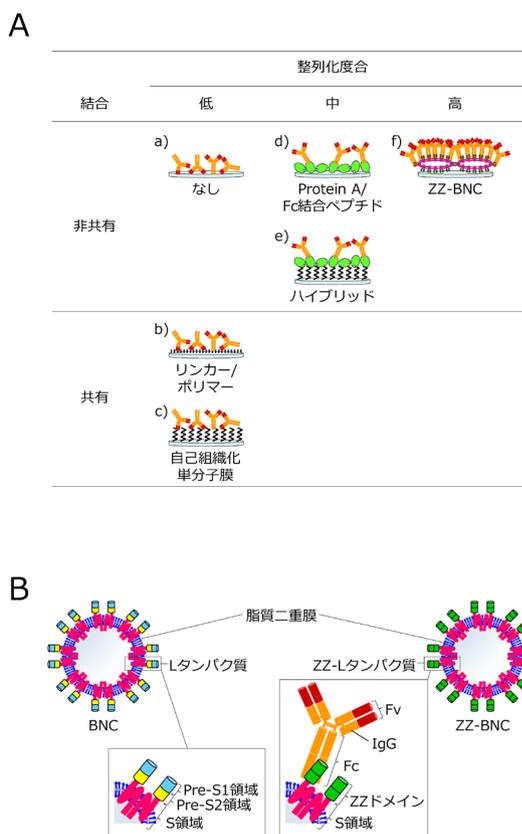


図1 ■ IgGの整列固定化に使用する足場分子 (A), BNCおよびZZ-BNCの構造 (B)

やHalf IgGのSH基や、遺伝子組換え技術を用いた単鎖抗体 (single-chain (sc) Fv) およびラクダ科重鎖抗体由来可変ドメイン (VHH (camelid single-domain antibodies)) のC末端COOH基を用いる固定化法は完全な整列化を期待できるが、抗体作製が煩雑な点、既存の抗体には適用できない点、化学修飾が必要な点などが課題である。そこで、IgGの抗原認識能を最大限に引き出すための理想的な足場分子として、以下の6条件を想定しているが、これまでに上記条件をすべて満たす足場分子は存在しなかった。

- ①足場分子自身が整列化可能
- ②完全長IgGの非侵襲的固定が可能
- ③IgG分子内固定部位が1カ所に限定
- ④化学的・物理的ストレスに対して高耐性
- ⑤バイオセンサー表面での最密充填可能
- ⑥あらゆる形状のバイオセンサー表面にIgG固定化が可能

バイオナノカプセル (BNC) 足場分子の開発

筆者らは、B型肝炎ワクチン抗原およびB型肝炎ウイルスの感染機構に基づく薬物送達用ナノキャリアとして、同ウイルス外皮Lタンパク質 (389アミノ酸 (aa))

を出芽酵母内で過剰発現させて直径約30nmの中空ナノ粒子「バイオナノカプセル (bio-nanocapsule (BNC))」を得た^(2,3) (図1B左). Lタンパク質は, C末端側半分(3回膜貫通型ドメイン (S領域))を有し, N末端側半分(Pre-S1, Pre-S2領域)をBNC表層に提示している. 最近, Lタンパク質のN末端領域の一部(51~159 aa)をProtein A由来IgG-Fc結合Zドメイン2量体(ZZ; 127 aa)に置換したZZ-Lタンパク質を作製し, BNCと同様に出芽酵母内で過剰発現させ, 直径約30nmのZZドメイン提示型BNC (ZZ-BNC)を得た⁽⁴⁾ (図1B右). ZZ-BNCと各種IgGとの結合能を水晶発振子微量天秤法(quartz crystal microbalance (QCM))により測定した結果, protein Aと類似した抗体特異性を示し, ZZ-Lタンパク質1分子あたり最大でIgG約0.5分子と結合した. ZZ-BNC 1粒子にはZZ-Lタンパク質約120分子が埋め込まれてZZドメインを提示することから⁽⁵⁾, ZZ-BNC 1粒子あたり最大約60分子のIgGが結合できると考えられた⁽⁴⁾. また, 金基板に固定したZZ-BNCと液中のIgGの会合を高速原子間力顕微鏡により経時的に観察したところ, IgGは速やかにFc領域を介してトラップされ, Fc領域を支点として平均速度0.92nm/秒, 最大角度44°で回転ブラウン運動を行ったことから, ZZ-BNCはその表層でIgG Fv領域を放射状に整列提示できると考えられた⁽⁶⁾ (図1A-f). そこで, 筆者らは, ZZ-BNCが上述した理想的な足場分子の諸条件を満たす可能性が高いと考えて, 以下の検討を行った.

液相中ZZ-BNCによるIgGのクラスター化および精密整列固定化

固相上の抗原(例, オボアルブミン (ovalbumin (OVA)))を検出する酵素標識免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA))において, 西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase (HRP))標識二次抗体とZZ-BNCとの複合体を用いると, 従来の二次抗体のみの場合と比べて検出感度が約10倍に上昇し, さらにアビジン-ビオチン複合体を併用すると約20倍に上昇した⁽⁶⁾ (図2A上). このZZ-BNCの効果は, ウェスタンブロット法においても認められ, ZZ-BNC単独で約50倍, アビジン-ビオチン複合体を併用で約100倍であった. 次に, HRP (約40kDa)よりも高分子のアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase (ALP)) (約100kDa)で標識された二次抗体を用いるELISAでは, ZZ-BNCとALPが立体障害により干渉したが, 両分子間のリンカー長を最適化することにより同障害を回避することに成功した⁽⁷⁾. 以上より,

ZZ-BNCは二次抗体を表層にクラスター化および精密整列化し, 抗体1分子あたりの標識酵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. また, 4種類の抗原を同時検出するウェスタンブロット法において, 同じ動物種由来の一次抗体しか存在しない場合, 従来は実施不可能であった. そこで, 各一次抗体を4種類の蛍光色素 (Cy2, Cy3, Cy5, Cy7)で標識したZZ-BNCとそれぞれ複合体化し, 同一ブロット上に同時添加したところ, 各抗原を同時に高感度検出できた⁽⁸⁾ (図2A下). 本技術 (IRODORI法と命名)は, 従来技術での多重同時染色における使用抗体制限という課題を初めて解消するとともに, 蛍光免疫組織・細胞染色法およびフローサイトメトリー法にも応用可能であった.

固相上ZZ-BNCによるIgGのクラスター化および精密整列固定化

QCMセンサーチップ上に, 等量の検出用IgGを直接法, Protein A法, SAMを介したProtein A法, またはZZ-BNC法で添加したところ, 直接法ではほとんど抗原検出できなかったが, ZZ-BNC法は抗原結合量および検出感度を最も改善し, 直接法に比べてそれぞれ約247倍および約128倍になった⁽⁴⁾ (図2B). このとき, 固定化IgG 1分子に結合できる抗原分子数が0.01分子から1.22分子に上昇し, 理想的な分子数 (2分子)に近づいた. 同様なZZ-BNCの効果はほかの抗原抗体系3種類でも観察されており, またQCM法のみならず表面プラズモン共鳴法 (surface plasmon resonance (SPR))においても観察された. SPR法によるカイネティクス解析では, ZZ-BNC法はProtein A法と比べて抗原結合速度は同等だが, 抗原解離速度が約3割まで抑制されていた. これは, IgG Fv領域周辺の立体障害による抗原脱離が軽減された結果, アフィニティーが上昇したと考えられた⁽⁴⁾. 以上より, ZZ-BNCはセンサー表面においてIgGのクラスター化および精密整列固定化を達成し, 抗体1分子あたりの抗原結合数を最大化できる足場分子であることが判明した. また, QCMセンサーチップ上に固定化したZZ-BNCの抗体結合能は, 酸処理 (0.16 N HCl)による抗体剥離を20回以上繰返しても変わらなかった⁽⁴⁾. さらに, BNCの粒子構造は, 界面活性剤処理 (0.2% SDS, 室温, 30分)⁽⁹⁾や, 熱処理 (70°C, 20分)⁽¹⁰⁾にも安定であることから, ZZ-BNCは化学的および物理的ストレスに対して高い耐性を有する足場分子であると判明した. 最近, 抗ネスチン抗体修飾ナノニードルによる神経幹細胞の1細胞単離において, ZZ-BNC法で同抗体を固定化すると細胞回収率が著しく上昇した⁽¹¹⁾. こ

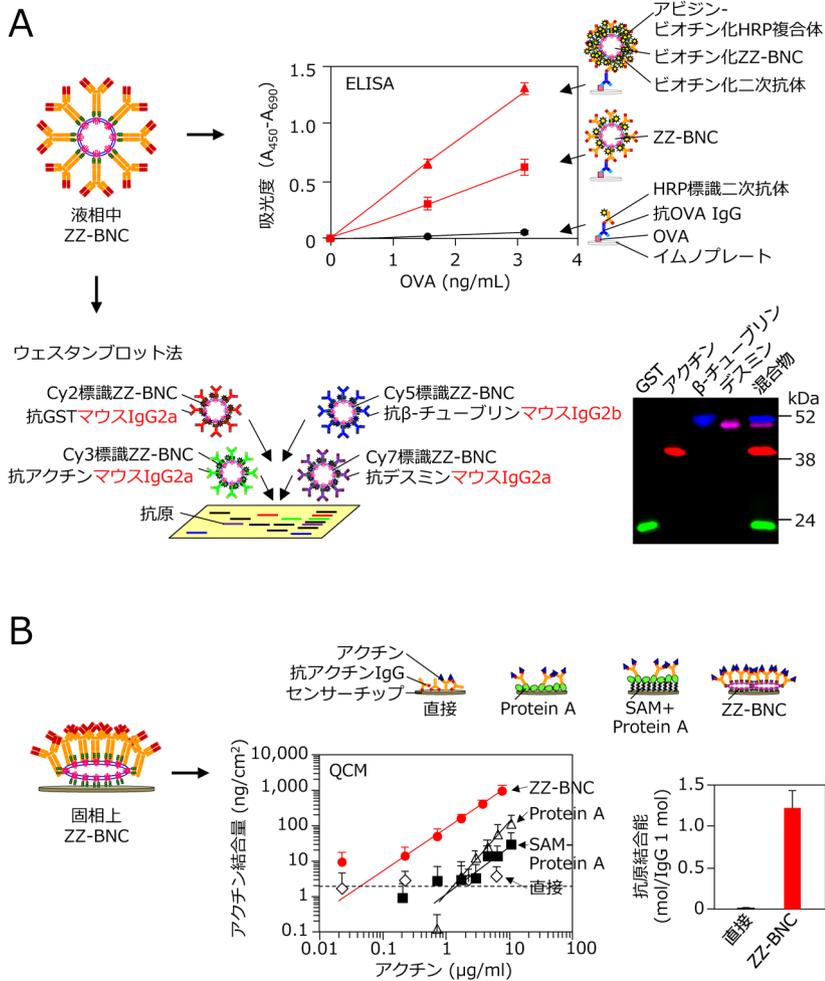


図2 ■ 液相中ZZ-BNCを用いたIgGのクラスター化と精密整列固定化による各種バイオセンシングの高感度化

(A) 固相抗原検出ELISA (右), 固相化抗原 (オボアルブミン (OVA), 0~3.13 ng/mL) を0.05% (v/v) Tween 20を加えたPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2PO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) で3回洗浄後, 5%スキムミルクを用いて室温で1.5時間ブロッキングした。抗OVA IgG (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を室温で1.5時間反応後, PBSTで3回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を室温で1.5時間反応後, PBSTで3回洗浄した。このとき, アビジンを用いてビオチン化二次抗体 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ビオチン化ZZ-BNC (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびビオチン化HRPを複合体化した。免疫複合体の検出には, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate kitを使用し, 450 nmにおける吸光度を測定した (リファレンス波長690 nm)。従来法 (●), ZZ-BNC法 (■), アビジン-ビオチン複合体併用法 (▲)。同一動物種由来抗体4種類による多重蛍光ウェスタンブロット法 (IRODORI法) (下), 抗原 (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST), アクチン, β -チューブリン, デスミン (各0.5 $\mu\text{g}/\text{lane}$) および混合物 (2 $\mu\text{g}/\text{lane}$)) をSDS-PAGEで分離してポリフッ化ビリニデン膜に転写した。4種類のCy標識ZZ-BNC抗体複合体 (IgGとして各20 $\mu\text{g}/\text{mL}$: Cy2標識ZZ-BNC抗GSTマウスIgG2a, Cy3標識ZZ-BNC抗アクチンマウスIgG2a, Cy5標識ZZ-BNC抗 β -チューブリンマウスIgG2b, およびCy7標識ZZ-BNC抗デスミンマウスIgG2a) を1%スキムミルクを含むTBST (5 mM Tris, 13.8 mM NaCl, 0.27 mM KCl (pH 7.4), 0.02% Tween 20) に混合し, 膜と室温で1時間反応した後, TBSTで3回洗浄した。イメージアナライザーを用いてCy2 (励起473 nm, 蛍光506 nm), Cy3 (励起532 nm, 蛍光570 nm), Cy5 (励起635 nm, 蛍光670 nm), およびCy7 (励起776 nm, 蛍光785 nm) の蛍光を検出した。(B) 固相上ZZ-BNCを用いたIgGのクラスター化と精密整列固定化による液相抗原検出QCMの高感度化, QCMセンサーチップ (9-mm diameter Au disc) に抗アクチンIgG (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PBS) を添加して固定化した後, スキムミルク (2 mg/mL) でブロックし, アクチン (0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して結合量を測定した (直接法)。このとき, あらかじめProtein A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), SAM-Protein A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), およびZZ-BNC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をセンサーチップに固定化した方法と比較した。QCMによる液相アクチンの検出 (左), 直接法 (◇), Protein A法 (△), SAM-Protein A法 (■), ZZ-BNC法 (●), 測定限界値 (2 ng/cm^2) (点線)。抗体1分子あたりの抗原結合数 (右), 直接法 (黒), ZZ-BNC法 (赤)。

れは, ナノニードル先端部における抗ネスチン抗体群のAvidityがZZ-BNCのクラスター化および精密整列固定化効果により上昇したことを示している。以上から, 「ZZ-BNC足場分子技術」はバイオセンサーの高感度化だけでなく, 抗原抗体反応を用いるさまざまな技術の効

率化を可能にすると考えられた。

ZZ-BNCによるFc融合受容体のクラスター化および精密整列固定化

ZZ-BNC足場分子の汎用性を広げるために, これまで

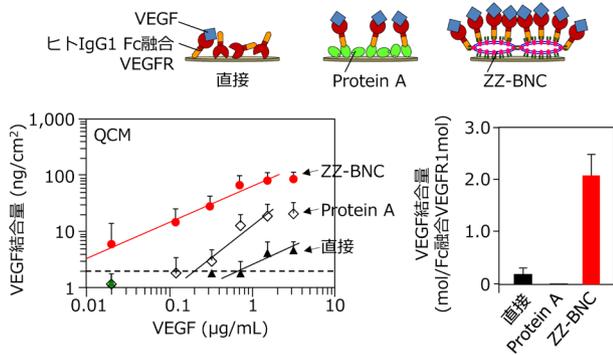


図3 ■ Fc融合VEGFRのクラスター化と精密整列固定化したZZ-BNCによるVEGF検出QCMの高感度化

QCMセンサーチップにFc融合VEGFR (2µg/mL PBS) を添加して固定化した後、スキムミルク (2mg/mL) でブロックし、ヒトVEGF (0~7.3µg/mL) を添加して結合量を測定した (直接法)。このとき、あらかじめProtein A (10µg/mL) およびZZ-BNC (10µg/mL) をセンサーチップに固定化した方法と比較した。QCMによる液相VEGFの検出 (左)、直接法 (▲)、Protein A法 (◇)、ZZ-BNC法 (●)、測定限界値 (2ng/cm²) (点線)。Fc融合VEGFR 1分子あたりのVEGF結合数 (右)、直接法 (黒)、Protein A法 (白)、ZZ-BNC法 (赤)。

の抗原検出を行うIgGではなく、ホルモンやサイトカインなどのリガンド検出を行うFc融合受容体 (リガンド結合部位を含む細胞外ドメインとヒトIgG1-Fcとの融合体) を用いるQCM法を検討した⁽¹²⁾ (図3A)。QCMセンサーチップ上に、等量のヒト血管内皮増殖因子受容体 (vascular epidermal growth factor receptor (VEGFR)) 細胞外ドメイン融合ヒトIgG1-Fc (VEGFR-Fc) を直接法、Protein A法、ZZ-BNC法で添加したところ、ZZ-BNC法は直接法と比べてリガンド (VEGF) の検出感度および結合量が、それぞれ約46倍および約4倍上昇していた。このとき、固定化VEGFR-Fc (2量体) 1分子に結合できるVEGF分子数が0.20分子から理想的な分子数 (2分子) に近い2.06分子に上昇していた。同様なZZ-BNCの効果はほかのリガンド・受容体系2種類でも観察され、SPR法や酵素標識リガンド結合アッセイでも再現できた。以上から、「ZZ-BNC足場分子技術」はIgGのみならずFc融合受容体のような多様なバイオセンシング分子にも対応できることが判明した。

scCro-BNCによるDNAアプタマーのクラスター化と精密整列固定化

核酸アプタマーは抗体のように特定の標的物質に対して高い親和性と特異性を示す捕捉分子であり、抗体に替わるセンシング分子や分子標的医薬として注目されている。筆者らは、核酸アプタマーを固相上でのクラスター化および精密整列固定化により、標的分子の検出感度の

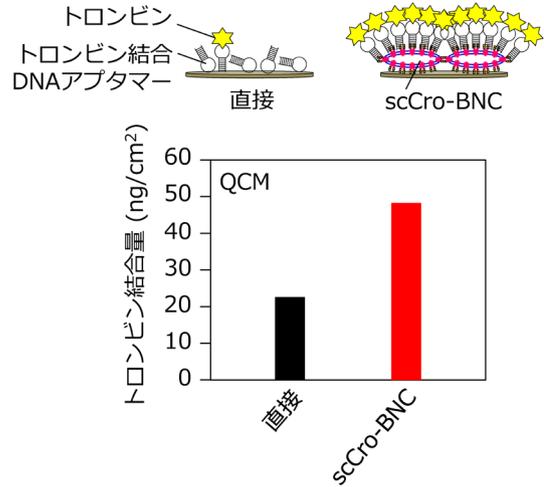


図4 ■ トロンピン結合DNAアプタマーのクラスター化と精密整列固定化したscCro-BNCによるトロンピン検出QCMの高感度化

QCMセンサーチップにトロンピン結合DNAアプタマー (2µg/mL) を添加して固定化した後、スキムミルク (2mg/mL) でブロックし、トロンピン (0~2µg/mL) を添加して結合量を測定した (直接法)。このとき、あらかじめscCro-BNC (10µg/mL) をセンサーチップに固定化した方法と比較した。QCMによる液相トロンピン検出、直接法 (黒)、scCro-BNC法 (赤)。

向上を目指した。一方、ZZ-BNCはFc領域を有するセンシング分子の精密整列固定化に限定されていた。そこで、核酸アプタマーにZZ-BNC足場技術を応用するために、λファージ転写抑制因子Cro由来の特異的DNA配列結合領域を一本鎖化した分子 (single-chain Cro (scCro))⁽¹³⁾ を提示したBNCを出芽酵母で過剰発現させ、直径約30~50nmのscCro-BNCを得た (山田ら、投稿準備中)。QCMセンサーチップ上に、等量のscCro認識配列融合トロンピン特異的DNAアプタマーを直接法またはscCro-BNC法で添加したところ、単位センサー面積あたりのトロンピン結合量が約1.7倍上昇することを見いだした (図4)。これは、DNAアプタマー1分子に結合するトロンピン分子数が約2.5倍増加したことを示しており、scCro-BNC上でDNAアプタマーがクラスター化および精密整列固定化され、トロンピン認識部位周辺の立体障害が著しく改善されたためと示唆された。一方、DNAアプタマー提示scCro-BNCのリガンド結合量の上昇率は、抗体提示ZZ-BNCおよびFc融合受容体提示ZZ-BNCと比べて低かった。これは、DNAアプタマーがほかのセンシング分子と比べて構造がフレキシブルであるためと考えられた。以上から、scCro-BNCはDNAアプタマーを用いるバイオセンサーの高感度化および標的物質の結合能を高める有望な足場分子であると考えられた。

ZZ-L膜によるIgGのクラスター化および精密整列固定化

ZZ-BNCは固相上においてドーム構造（高さ約13nm，直径約48nm）を形成するため，センサーチップ側ZZ-Lタンパク質が無駄になること，センサーチップ表面でパッチ状に存在すること，センサーチップ表面近傍（数nm以内）の分子間相互作用を検出するSPR法やエリプソメトリー法などには不向きであることが課題であっ

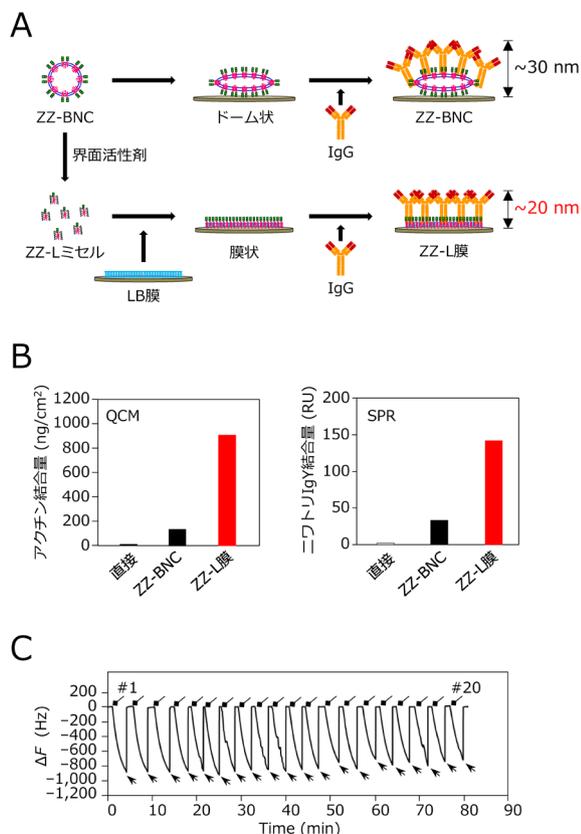


図5 ■ ZZ-BNCからZZ-L膜の作製

(A) ZZ-BNC (上) およびZZ-L膜 (下) を用いたIgG固定化。(B) 抗体整列化ZZ-L膜によるQCMの高感度化 (左)，QCMセンサーチップに抗アクチンIgG (3μg/mL PBS) を添加して固定化した後，スキムミルク (2mg/mL) でブロックし，アクチン (0~10μg/mL) を添加して結合量を測定した (直接法)。このとき，あらかじめZZ-BNC (0.5μg/mL) およびZZ-L膜 (0.5μg/mL) をセンサーチップに固定化した方法と比較した。直接法 (白)，ZZ-BNC法 (黒)，ZZ-L膜法 (赤)。抗体整列化ZZ-L膜によるSPRの高感度化 (右)，SPRセンサーチップ (Au) に抗ニワトリIgY IgG (10μg/mL PBST) を添加して固定化した後，ニワトリIgY (0~6μg/mL) の結合量を測定した。このとき，あらかじめZZ-BNC (0.5μg/mL) およびZZ-L膜 (0.5μg/mL) をセンサーチップに固定化した方法と比較した。直接法 (白)，ZZ-BNC法 (黒)，ZZ-L膜法 (赤)。(C) QCMセンサーチップ上でのZZ-L膜の安定性，QCMセンサーチップにZZ-L膜 (0.5μg/mL PBS) を添加して固定化した後，スキムミルク (2mg/mL) でブロックした。ウサギIgG (5μg/mL) を添加して3分後の結合量を測定した後，0.16N HClを添加してIgGを剥離する操作を20回繰り返した。ウサギIgG (ひし形矢印)，HCl (矢印)。

た。そこで，ZZ-BNCの膜構造を界面活性剤で破壊してZZ-Lミセルを得て，センサーチップ上にZZ-Lミセルを埋め込んだ二次元膜（高さ約7nm）を展開し，センシング分子を垂直に精密整列固定化するZZ-L膜法を開発した (図5A，飯嶋ら，投稿中)。本ZZ-L膜を展開したセンサーチップ表面にIgGを提示して，QCM法およびSPR法で抗原検出を行ったところ，等量のIgGを添加したZZ-BNC法と比較して，それぞれの単位面積あたりの抗原結合量は約6倍および約4倍に上昇した (図5B)。なお，QCM法においてIgG 1分子あたりの抗原結合分子数は大きく変化しなかったことから，ZZ-L膜の精密整列固定化効果はZZ-BNCと同等であるが，センサーチップ表面全体に対し均一にZZ-L密度を高めてクラスター化に貢献すると考えられた。また，QCMセンサーチップ上に固定化したZZ-L膜の抗体結合能は，酸処理 (0.16N HCl) による抗体剥離を20回以上繰返してもほとんど変わらなかったことから (図5C)，ZZ-L膜は化学的ストレスに対して高い耐性を有する足場分子であると判明した。以上から，ZZ-L膜は，既に実績のあるZZ-BNCよりもさまざまな形状に加工できることから，一層広範なバイオセンサーの高感度化に寄与できると考えている。

今後の展開

本稿では，センシング分子のクラスター化ならびに精密整列固定化を行う「BNC足場分子技術」について概説し，各種バイオセンシングの高感度化にZZ-BNCが有効であることを示した。しかし，ZZ-BNCに使用しているZドメインはマウスIgG1やヒトIgG3などの一部のIgGに対する親和性が極めて低いことから，ZZ-BNCの適用範囲は限定されていた。そこで，筆者らは広範囲なIgGと高い親和性を示すprotein G由来のFc結合ドメインや，広範囲なIg分子と親和性を示すprotein L由来のFab結合ドメインを提示した新型BNCも作製しており⁽¹⁴⁾，今後「BNC足場分子技術」のバイオセンシング分野での適用範囲拡大に貢献できると考えている。

特にZZ-L膜は，冒頭で述べた理想的な足場分子の6条件を基本的に満たしている。近年，SPRの金基板上に，PEGでSAMを形成し，足場分子となるZZctOmpA (ZZドメインを融合した大腸菌由来膜タンパク質) を埋め込んでIgGを固定化し，抗原を感度良く検出する方法が報告された⁽¹⁵⁾。本法もZZ-L膜と同様に理想的な足場分子の6条件を満たしており，ZZ-L膜と共通する構造的特徴を有していた (図6)。具体的には，膜貫通ドメ

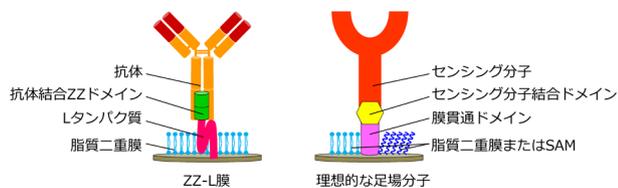


図6 ■ ZZ-L膜および理想的な足場分子の構成

インを有する足場分子，センサーチップ表面に対し垂直に足場分子を保持する脂質二重膜およびSAM，足場分子とセンシング分子をつなぐ結合ドメインである。今後，本足場分子技術を一層進化させるためには，物理的および化学的安定性が高い膜分子と膜透過ドメインを用いるとともに，分子揺らぎの少ない構造のセンシング分子結合ドメインを用い，さらに多様なセンシング分子を提示できる結合ドメインを導入する必要がある。

謝辞：本研究は，日本学術振興会：科学研究費補助金・基盤研究（S）（16H06314（黒田）），基盤研究（C）（16K04888（飯嶋）），国立研究開発法人：日本医療研究開発機構補助金（17cm0106214h0002，17fk0310105h0001（黒田）），文部科学省：人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミック・アライアンス（黒田）からご援助を賜りました。ここに深謝いたします。

文献

- 1) M. Iijima & S. Kuroda: *Biosens. Bioelectron.*, **89**, 810 (2017).
- 2) S. Kuroda, S. Otaka, T. Miyazaki, M. Nakao & Y. Fujisawa: *J. Biol. Chem.*, **267**, 1953 (1992).
- 3) T. Yamada, Y. Iwasaki, H. Tada, H. Iwabuki, M. K. Chuah, T. VandenDriessche, H. Fukuda, A. Kondo, M. Ueda, M. Seno *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 885 (2003).
- 4) M. Iijima, H. Kadoya, S. Hatahira, S. Hiramatsu, G. Jung, A. Martin, J. Quinn, J. Jung, S. Y. Jeoung, E. K. Choi *et al.*: *Biomaterials*, **32**, 1455 (2011).
- 5) M. Iijima, M. Somiya, N. Yoshimoto, T. Niimi & S. Kuroda: *Sci. Rep.*, **2**, 790 (2012).
- 6) M. Iijima, T. Matsuzaki, H. Kadoya, S. Hatahira, S. Hiramatsu, G. Jung, K. Tanizawa & S. Kuroda: *Anal. Biochem.*, **396**, 257 (2010).
- 7) M. Iijima, M. Yamamoto, N. Yoshimoto, T. Niimi & S. Kuroda: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 843 (2013).
- 8) M. Iijima, T. Matsuzaki, N. Yoshimoto, T. Niimi, K. Tanizawa & S. Kuroda: *Biomaterials*, **32**, 9011 (2011).
- 9) T. Yamada, H. Iwabuki, T. Kanno, H. Tanaka, T. Kawai, H. Fukuda, A. Kondo, M. Seno, K. Tanizawa & S. Kuroda: *Vaccine*, **19**, 3154 (2001).
- 10) J. Jung, M. Iijima, N. Yoshimoto, M. Sasaki, T. Niimi, K. Tatematsu, S. Y. Jeong, E. K. Choi, K. Tanizawa & S.

Kuroda: *Protein Expr. Purif.*, **78**, 149 (2011).

- 11) R. Kawamura, M. Miyazaki, K. Shimizu, Y. Matsumoto, Y. R. Silberberg, R. R. Sathuluri, M. Iijima, S. Kuroda, F. Iwata, T. Kobayashi *et al.*: *Nano Lett.*, **17**, 7117 (2017).
- 12) M. Iijima, N. Yoshimoto, T. Niimi, A. D. Maturana & S. Kuroda: *Biotechnol. J.*, **11**, 805 (2016).
- 13) R. Jana, T. R. Hazbun, J. D. Fields & M. C. Molling: *Biochemistry*, **37**, 6446 (1998).
- 14) K. Tatematsu, M. Iijima, N. Yoshimoto, T. Nakai, T. Okajima & S. Kuroda: *Acta Biomater.*, **35**, 238 (2016).
- 15) A. P. Le Brun, S. A. Holt, D. S. H. Shah, C. F. Majkrzak & J. H. Lakey: *Biomaterials*, **32**, 3303 (2011).

プロフィール



飯嶋 益巳 (Masumi IIJIMA)

<略歴>1996年東京農業大学農学部醸造学科卒業/1998年同大学大学院農学研究科醸造学専攻修士課程修了/同年(社)農林水産先端技術研究所研究員/2001年(社)北里研究所研究員/2005年米国マウントサイナイ医科大学リサーチコーディネーター/2007年大阪大学産業科学研究所特任研究員/2009年名古屋大学大学院生命農学研究科技術補佐員/2010年同研究員/2014年同特任助教/2015年大阪大学産業科学研究所特任助教/2016年同特任准教授/2018年東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科准教授，現在に至る<研究テーマと抱負>生体分子の精密整列固定化に関する研究<趣味>ゴルフ



黒田 俊一 (Shun'ichi KURODA)

<略歴>1984年京都大学農学部農芸化学科卒業/1986年同大学大学院農学研究科修士課程修了/同年武田薬品工業(株)研究員/1994年神戸大学バイオシグナル研究センター助教/1996年同助教/1998年大阪大学産業科学研究所助教/2003年ジュネーブ大学医学部客員教授/2009年名古屋大学大学院生命農学研究科教授/2015年大阪大学産業科学研究所教授，現在に至る<研究テーマと抱負>バイオ医薬創製関連技術(DDS, バイオセンサー, 嗅覚受容体, 1細胞育種, 醗酵)<趣味>映画, 旅行, 起業(2017年5月に4社目創業しました)<所属研究室ホームページ><http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/>

Copyright © 2018 公益社団法人日本農芸化学会

DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.56.591