

高密度 PEG ブラシが引き出すバイオ機能 —ナノ表面がシャペロンになる？—

筑波大 TIMS・筑波大 TARA・筑波大院数理解物質・筑波大院人間総合

長崎 幸夫

基材表面に抗体や抗原等のタンパク質を固定し、生体分子の特異的反応を利用するシステムは、古くから免疫診断、酵素免疫測定法による生体分子の検出など、様々な研究開発が行われてきた¹。これは固定する生体分子の本来有する特異性が利用され、選択的かつ高感度な検出を可能にする極めて理想的なセンシングシステムとして認知されている。最近では DNA チップ、プロテインチップや表面プラズモン共鳴(SPR)センサーなど様々なバイオセンシングが広がりつつあり、特にこれらは網羅的解析を目指した新しい解析法として大きな期待を集めている。

しかしながらこのような特異的バイオ認識能を利用した微弱信号を検出する上では、生体組織あるいは生体液とセンシング界面が直接接触するため、これら大量に存在するタンパク質、脂質などの夾雑物が非特異的に作用し、バイオ計測を高感度化するための信号変換部や増幅部の高性能化をはかっても、バックグラウンドも同時に増加し、結果として S/N が期待するほど向上しないことが極めて重大な問題となってくる。このような観点を鑑みて高性能なバイオインターフェースに要求されるポイントとしては、①基材に固定した生体分子が活性を低下させることなく機能し高い選択性と感度を示すことのみならず、②夾雑するタンパク質や脂質の非特異吸着を抑制し、バックグラウンドを極限まで低下させることが要求されている。

基材表面に固定するバイオ分子の機能を失活させる事無く適正に配向させることは広く検討されており、たとえばオリゴヒスチジンを導入したタンパク質をニッケル錯体と複合化することによる His-Tag 法²や抗体をフラグメント化することによってむき出しになる SH 基を利用した金表面固定化法³など様々な角度から提案されている。しかしながら His-Tag 法を利用した固定化法ではタンパク質の固定量や配向は確かに上がるものの、同時にバックグラウンドとしての非特異吸着が増加するため、必ずしも特異的な認識能を検出するには向いていない。ビオチン-アビジン系を利用した固定化法に関しても複数のタンパク質で固定するため、それらによる非特異吸着が増加することが避けられないのが現状である。

バックグラウンドを低下させるためには固定した抗体や DNA 等の生体分子の周りの表面を、通常ブロッキング剤と言われる物質で覆うことによって夾雑物の非特異吸着を抑えることが行われる。このブロッキング剤には牛血清アルブミン(BSA)や牛乳タンパクとして知られるカゼインなどの動物性タンパク質が広く利用されている。しかしながらこのような動物由来物質を大量にブロッキング剤として利用する現状は、①非特異吸着抑制効果が十分でなく、かつ生体分子の特異的認識能も低下させ、期待する機能が十分に達成されないばかりでなく、②動物由来物質を材料にするため BSE などの供給源からの感染という危険性をはらみ、さらには③倫理的な問題も避けられないという点で大きな問題を含んでいる。また、ロット間による材料の性能のばらつきや保存安定性など、問題点をあげればき

Improved Biofunctionality by Densely Packed Poly(ethylene glycol) Tethered Chain Surface -Does the condensed PEG tethered chain surface work as macromolecular chaperone ?-

Yukio NAGASAKI (Tsukuba Research Center for Interdisciplinary Materials Science, Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, Graduate School of Pure and Applied Sciences, and Graduate School of Comprehensive Human, University of Tsukuba, 1-1-1 Tenn-noudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, JAPAN).

Tel: 029-853-5749, Fax: 029-853-5749, e-mail: nagasaki@ims.tsukuba.ac.jp

Key Word: PEG tethered chain surface / Chaperone / ELISA / Antibody / Enzyme

Abstract: Immobilization of proteins such as antibody and enzyme on substrate surface coupled with poly(ethylene glycol) tethered chain were carried out for creation of high functionality biointerface. With the increasing PEG chain density on the surface, the functionality of proteins increased. The densely packed PEG chains surrounding the immobilized protein on the substrate surface might change the conformation of the protein. The chaperone like phenomena on the substrate surface is promising for high-performance biointerface.

りが無いのが現状である。

このような中で人工物質を利用したバイオ表面設計が急務であり、さらには高感度化のためにタンパク質、DNA や細胞といった特異的認識物質を、その機能を損なうことなく人工材料と融合させる方法論を構築し、生体由来物質の高度集積化と効率的な分子増幅を通じて、「必要な時に、必要な場所で、必要な検出」を高感度かつ高特異的に行うことが重要である。

筆者らは基材表面へのポリエチレングリコール(PEG)の固定化を長年研究することにより、鎖長の異なる PEG 鎖を固定することで PEG 鎖密度が増し、非特異吸着がほぼ完全に抑制することを見いだしてきた⁴。

この表面を利用して抗体との共固定化を行い、その認識能を評価した。図 1.には Fab'フラグメントを金表面に固定し、その周りに様々な PEG 鎖ブラシを構築した結果を示す。PEG 鎖長が増すごとに非特異吸着が低下するものの、抗体の検出感度も低下するのに対し、2k/5k ブラシではその高密度化により非特異吸着をほぼ完全に低下させるだけでなく、抗体の検出感度を飛躍的に向上させることがわかった。これは高密度 PEG 鎖によって界面に固定した抗体のリフォールディング等の現象が起こっていることを考えないと説明できない(図 2.)。このハイブリッド密生法による表面構築技術は様々な免疫計測機器のセンシング部分作製の基盤技術として有用である。また、金コロイドなどの基材上に酵素を固定した後に PEG を固定すると酵素の活性があがるだけでなく、高温処理を行っても活性の低下が強く抑えられることがわかった。この様に基材表面へのタンパク質と PEG の共固定はタンパク質の活性を 100%引き出しうる新しい表面設計として期待できる。

【謝辞】PEG 表面設計に関しては片岡一則教授(現東大)、吉本 敬太郎博士(筑波大講師)、飯島道弘博士(現小山高専講師)、大塚英典博士(現東京理科大准教授)、内田勝美博士(現東京理科大学助教)、源 暁非博士(筑波大)、金子 充弘君(現川澄化学)、平瀬 匠君(筑波大大学院)、石井志郎君(筑波大大学院)及び長崎研究室学生諸氏を中心に行われたものである。心から感謝いたします。

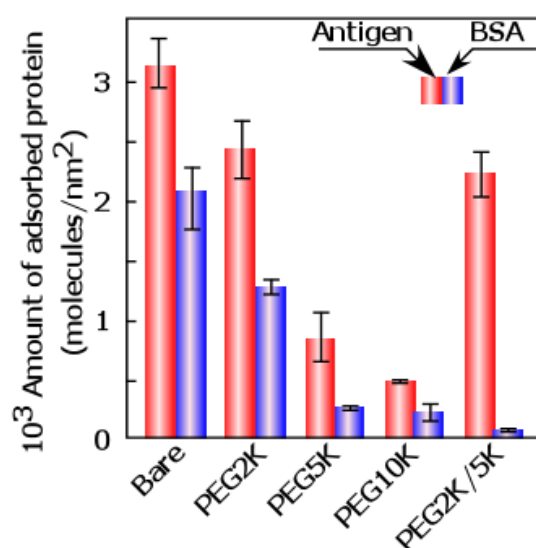


図 1.抗体の感度は PEG ブラシ密度を上昇させることにより非特異吸着を抑制しつつ飛躍的に向上させた。(PEG2K/5K による高密度 PEG 密生層の効果がシグナルの増強に示されている、右端)

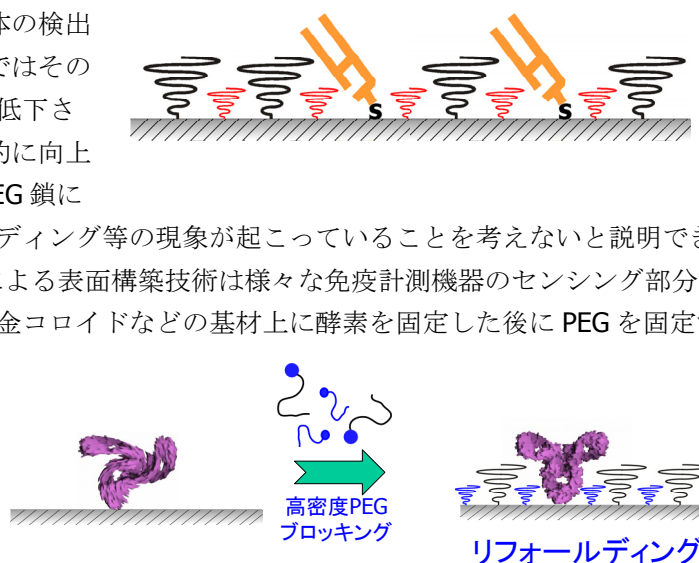


図 2.ハイブリッド密生層による抗体検出感度の上昇

¹ a)バイオマテリアル特集号、2006 年、24 巻、3 号および引用文献、b)“Immunodiagnosics.” R. Edwards, Ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1999. c) “ELISA : Theory and Practice”, in Methods Mol. Biol., Totowa, N. J., 1995; 42. J.R. Crowther, Ed., Humana, Totowa, N. J. U.S.A. 1995

² J.Schmitt, H.Hess, H.G. Stunnenberg, *Mol. Bio. Rep.*, 18(3), 223(1993) and references there in

³ H.Zhang, M.E. Meyerhoff, *Ana. Chem.*, 78, 609(2006)

⁴ K.Uchida, et al., *Ana. Chem.*, 77, 1075(2005)