バイオミディア

生体分子の整列固定化法

飯嶋　益巳[1]・黒田　俊一[2]

タンパク質，糖鎖，核酸などの生体分子は，基本的に方向性を有する巨大分子である．これらはセンシング，物質生産，生体制御などにおける機能性分子として，医療，創薬，食品，環境，セキュリティー分野などで活用されている．こうした分子は主に固定化した状態で利用される．まず古典的な固定化技術としては，ファンデルワールス力，疎水結合，イオン結合などの非特異的結合に基づく方法が長く使用されている．しかし，これらは生体分子の向きをランダムに固定化するので，立体障害が生じてその機能を充分に引き出せないことが多い（図1左上）．そこで，整列固定化を行うために，バイオセンシング領域（酵素，蛍光および放射標識免疫測定法，水晶発振子微量天秤法，表面プラズモン共鳴法，エリプソメトリー，蛍光偏向測定法など）では，主に使用される抗体の固定化法として，クロスリンカー分子，自己組織化単分子膜（self-assembled monolayer（SAM））およびFc結合タンパク質（*Staphylococcus aureus*由来Protein Aなど）が足場分子として日常的に用いられている（図1左下）[1]．ただ，クロスリンカー分子は抗体分子内の結合部位が一定でなく，SAMはポリマーであるため自身が揺らいでおり，Fc結合タンパク質は自身の向きを精密制御できないことから，これらの方法では抗体を二次元平面上に一部しか整列固定化できなかった．また，抗体の断片化（Fab'およびHalf IgG）により生じるSH基や，遺伝子組換え技術による単鎖抗体（scFvおよびVHH）の特異なCOOH基やNH_2基を介する整列固定化法[1]もあるが，広範な種類の抗体には適用できない．生体分子の機能を十分に引き出すためには，分子の向きを精密制御して二次元平面上に最密充填状態で整列固定化することが望まれる．最近，金[2]，シリカ，ポリスチレンなどの固相素材と高い親和性でそれぞれ結合するペプチドを融合したFc結合タンパク質を足場分子とする方法や，固相上の人工膜に膜貫通領域を介して固定化する方法（図1右下）[3]が開発されたが，完全長・未修飾抗体の任意の一残基と特異的に結合して，抗体結合部位を最密充填状態で整列提示し，化学的・物理的ストレスに対して耐性な足場分子の報告はなかった．そのような中，Fc結合ドメインを脂質二重膜の表層に最密充填状態で整列提示するナノ粒子（ZZ-BNC）を足場分子とした抗体固定化法[4]が開発された（図1右上）．本法では，バイオセンサーの検出感度ならびに抗原結合量が，古典的固定化技術と比べて，それぞれ最大約130倍および約250倍となった．一方，抗体以外のタンパク質，糖鎖および核酸などの固定化法[5]も数多く報告されているが，抗体のようなコンパクトな構造を有していないので，最密充填状態で整列提示を可能にする汎用的な固定化法はまだ開発されていない．

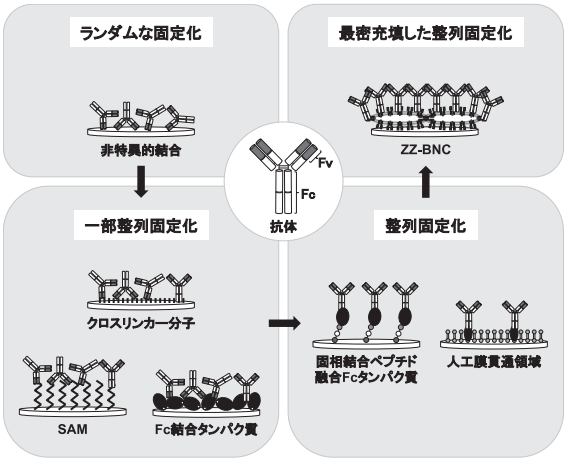

図1．抗体の整列固定法

最近では，上述のセンシング領域だけではなく，物質生産領域において酵素の精密整列化を行う固定化法が注目されている．化学合成が困難な物質の生産では複数の酵素反応を連続的かつ効率的に行う必要があるが，従来の固定化法では必要な酵素群をバッチで混合しただけであり，非連続的かつ非効率的であった．そこで，酵素群を反応順に二次元平面上で整列固定化する試みがなされている[6]．近い将来，一つのチップ上でさまざまな酵素反応を連続的に行うmicro-total analysis systemsやマイクロリアクターなどのデバイス開発において，上記の抗体を最密充填状態で精密整列化する技術を活用することが重要になると考えられる．

1) Makaraviciute, A. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **50**, 460 (2013).
2) de Juan-Franco, E. *et al.*: *Analyst*, **138**, 2023 (2013).
3) Le Brun, A. P. *et al.*: *Biomaterials*, **32**, 3303 (2011).
4) Iijima, M. *et al.*: *Biomaterials*, **32**, 1455 (2011).
5) Redeker, E. K. *et al.*: *Bioconjugate Chem.*, **24**, 1761 (2013).
6) Hirano, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 4756 (2015).

著者紹介　[1]大阪大学産業科学研究所生体分子反応科学研究分野（特任助教）　E-mail: maiijima@sanken.osaka-u.ac.jp
[2]大阪大学産業科学研究所生体分子反応科学研究分野（教授）　E-mail: skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp