

氏名(本籍)	平瀬匠(山口県)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第4599号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	数理物質科学研究科
学位論文題目	高度バイオセンシングを目指したポリマーブラシ表面の精密設計
主査	筑波大学教授 長崎幸夫 工学博士
副査	筑波大学教授 鈴木博章 博士(工学)
副査	筑波大学教授 丹羽修 工学博士
副査	筑波大学准教授 白木賢太郎 博士(理学)

論文の内容の要旨

近年分子生物学の発展に伴い、遺伝子の発現産物であるタンパク質の機能解析が注目を集めている。そのためタンパク質同士の相互作用解析が可能となる、迅速かつ高感度な検出システムの開発が望まれ、その中でプロテインチップテクノロジーは診断分野、薬のスクリーニングなどへの応用が期待され注目を集めている。このようなプロテインチップの開発においてセンサーデバイス表面として金表面が広く利用されている。これは金表面が導電性や酸化耐性があり、また金表面の表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象が、数多くの分光法や解析法に利用されているためである。しかし未処理の金表面においては、生体分子に対して選択性を示さないため、ほとんどのタンパク質や生体分子が非特異的に吸着してしまう事が懸念され、高性能なバイオセンサーデバイスへの開発のためには、金表面の機能化と生体分子を非特異的に吸着しない性質を可能とする新規金表面処理の提案が必要不可欠である。金表面の機能化は電極の表面処理、SPR センサーや水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法などセンサーを構築する上で重要であり、特にチオール基を有する化合物は金表面と強固な結合を比較的容易に形成するため、金表面の修飾、機能化に広く利用されている。アルカンチオールを用いた自己組織化単分子膜 (SAMs) は金表面の表面処理は、現在でも有効な表面処理法の一つとして利用されており、更なる表面の機能化を目的として反応性官能基 (COOH 基, NH₂ 基, SH 基) を末端に導入したアルカンチオールによる金表面処理なども報告されている。

基板表面に機能性官能基を付与すると同時に、生体成分の非特異的な吸着を抑制する事は、センサーチップの高感度化において非常に重要である。そのため親水性のポリマーを表面に固定化する事による、タンパク質などの非特異的な吸着の抑制は様々な手法で試みられている。その中でも非常に多くの生物学に関連したシステムにおいてポリエチレングリコール (PEG) が表面のタンパク質吸着を抑制する事が見出されている。ブラシ構造として PEG を導入した表面は、生体分子の吸着を大幅に抑制する事が知られ、基板表面に非特異吸着抑制能を付与する表面処理技術として報告されている。PEG は高い親水性と分子鎖の運動性、すなわちタンパク質の吸着を抑制する立体排除効果や PEG の非イオン性の性質が組み合わせり、非特異吸着抑制能を発現していると考えられている。また、細胞の主成分であるリン脂質を有する膜が高い抗血栓性を示す事が報告され、リン脂質極性基をポリマー側鎖に用意して導入する観点からホスホリルコリン基を有す

るモノマー、2-メタクリロイルオキシエチレンホスホリルコリン (MPC) が報告された。様々な医療デバイスの血液適合性の改善に利用するため、MPCと疎水性のブチルメタクリレート (BMA) との共重合体が合成され、PMPCポリマーによって細胞類似表面の創製が報告され、PCユニットと相互作用する水和層によってタンパク質の非特異吸着を抑制し、PMPC共重合体を処理した基板が高い生体適合性、抗血栓性を示す事が報告されている。

本論文ではタンパク質の相互作用解析や機能解析などの高度バイオセンシングを目指したバイオセンサーチップの表面処理技術の確立を目的として、金表面に対するポリマーブラシ表面の精密設計を検討した。始めに分子量を精密に制御したポリマーの末端にチオール基を導入したポリマーを用いて、金表面に対するポリマーブラシ表面の設計を行い、その分子量や表面密度の影響を評価した。生体適合性材料として優れた特性を有するPEG及びPMPCを用いてポリマーブラシ表面を設計する事で、プロテインセンサー・チップなどの医療デバイス表面として有用となる表面処理技術の構築を検討した。精密に分子量制御されたポリマーブラシ表面を評価する事によって、表面の生体分子の非特異吸着抑制能などの表面の物性や特性を明らかにする事を目的として、SPRを用いて各表面のタンパク質・血清の非特異吸着の観測、エリブソメトリーによる膜厚測定、表面密度の算出、接触角測定による表面の濡れ性、ポリマーの配向性の比較、AFMによる表面形状の比較を行い、各ポリマーの分子量の表面物性や特性に対する影響を評価した。

次に非特異吸着抑制能の高いPEG混合ブラシ表面に対して、タンパク質固定化を目的とした表面機能化として、自由末端にチオール基を導入したPEG混合ブラシ表面を設計し、両末端にチオール基を有するPEGの合成、両末端にチオール基を有するPEGを用いたPEG混合ブラシ表面の作製方法、さらに自由末端に構築したチオール基を利用したタンパク質の固定化及び固定化における特異性評価、固定化したタンパク質の活性を評価し、自由末端にチオール基を導入したPEG混合ブラシ表面のプロテインセンサー・チップ表面への展開を議論した。

更には抗体フラグメントを用いて位置特異的に固定化する事で抗体の配向性を制御し、さらに非特異吸着抑制能に優れるPEG混合ブラシを共固定する事によって、抗体の配向性の制御と非特異吸着の抑制を両立した表面を設計した。抗体フラグメント/PEG混合ブラシ共固定表面の作製方法、さらに血清に対する非特異吸着抑制能、血清中での抗原認識能の評価について評価し、抗原認識能の維持と高い非特異吸着抑制能を併せ持つ表面の構築が達成された事から、抗体の配向性を制御した抗体フラグメント固定化表面に対して、PEG混合ブラシを共固定する事による高機能化が示唆され、高感度免疫センサーに向けた表面処理方法としての可能性を議論した。

このように本論文で見出された金表面に対する生体適合性ポリマーブラシ表面の新たな知見や、バイオセンサー表面の高機能化に向けたポリマーブラシの構築は、高感度診断を目指す医療デバイスなどへの応用が期待され、ポリマーブラシ表面を利用した診断・医療分野の向上に大きく貢献するものと期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者はポスト・ゲノム時代の柱となるタンパク質の相互作用解析や機能解析などの高度バイオセンシングを目指したバイオセンサーチップの表面処理技術の確立を目的として研究を進めており、金表面に対するポリマーブラシ表面の精密設計を検討し、生体適合性表面としてのポリエチレングリコール (PEG) 及びポリ(2-メタクリロイルオキシエチレンホスホリルコリン) (PMPC) 表面における、タンパク質吸着抑制能に対して精密に分子量を制御したポリマーブラシ表面を比較する事で、ポリマーブラシの効果の違いを明らかにした。これはポリマーブラシを利用した医療デバイス等の開発において、重要な知見が得られたと考えられる。また高度な非特異吸着抑制能を有するPEG混合ブラシ表面の機能化として、表面のPEG密度を制御す

る事によって両末端 SH 基 PEG の固定化状態を制御し、自由末端にチオール基を有する PEG 混合ブラシ表面を構築し、チオール基を介して PEG 混合ブラシ表面上にタンパク質が活性を失う事なく固定化され、固定化タンパク質によるタンパク質センシングと非特異吸着抑制能を両立した表面の構築に成功した。このように PEG 密度を制御し、自由末端にチオール基を構築して機能化したポリマーブラシ表面の構築は新規的であり、生体分子固定化としての応用が期待される。さらに免疫センサーの高性能化を目指して、配向性を制御した抗体フラグメントを金表面に直接固定化し、PEG 混合ブラシを共固定する事で表面の構築を行った。構築した抗体フラグメント / PEG 混合ブラシ共固定表面は、血清中のタンパク質に対しても高い吸着抑制能を示し、ターゲットとなる抗原に対して、血清中における抗原認識を可能とした。抗体の配向性制御と非特異吸着抑制能を両立した表面の構築により、他の抗体固定化表面と比較して高いセンシング能が得られた事から、免疫センサーの高感度化表面処理として大きく期待される。このようにバイオセンシング基板の表面設計としての、金表面の表面処理技術に対して、ポリマーブラシ表面の新たな知見が得られ、高機能化に向けた新たな表面処理技術の構築により、医療・診断分野の技術向上に大きく貢献するものと言える。

よって、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。