

反射干渉分光法を利用した分子間相互作用測定装置

Intermolecular Interaction Measuring Apparatus Using Reflectometric Interference Spectroscopy

栗原 義一*
Yoshikazu KURIHARA

泉谷 直幹*
Naoki IZUMIYA

柏崎 治**
Osamu KASHIWAZAKI

山崎 茂*
Shigeru YAMASAKI

要旨

近年、タンパク質・核酸・糖・脂質などの生体分子に関連する分子間相互作用の測定に対するニーズが拡大している中で、コニカミノルタではこれまで培ってきた光学技術、微細加工技術を活かして反射干渉分光法 (Reflectometric Interference Spectroscopy : RIfS) を利用した分子間相互作用測定装置を「MI-Affinity」という名称で製品化し、2010年4月より上市を開始した。

MI-Affinityは、測定原理に光の干渉を利用しており、生体分子の相互作用としては代表例とも言える抗原抗体反応を測定出来る一方で、干渉という特長から、細胞のような μm オーダーのサイズの相互作用を測定出来る可能性を十分秘めている。

本稿では、分子間相互作用についての説明、RIfS測定システムの概要、抗原抗体反応を用いた分子間相互作用の測定結果について報告する。

Abstract

In recent years, the need to measure intermolecular interactions relating to biomolecules such as protein, nucleic acid, sugar, and lipids has grown. In response, Konica Minolta, taking advantage of its accumulated optics and micro-fabrication technologies, developed the MI-Affinity, an intermolecular interaction measuring apparatus utilizing reflectometric interference spectroscopy (RIfS). The MI-Affinity went on the market in April, 2010.

The MI-Affinity utilizes the interference of light as its principle of the measurement. The MI-Affinity can measure such a typical interaction between biomolecules as antigen-antibody reactions. At the same time, the characteristics of interference allow the device to measure interactions between objects on a micron scale, such as a biological cell.

In this report, we explain intermolecular interaction, we outline the RIfS system, and we present the results of measuring an intermolecular interaction such as the antigen-antibody reaction.

* コニカミノルタオプト(株)
技術開発本部 LC事業推進室
** コニカミノルタオプト(株)
技術開発本部 技術開発センター 事業開発部

1 はじめに

近年、ライフサイエンスの研究の発展に伴い細分化してきた多くの研究分野の中でも、タンパク質・核酸・糖・脂質などの生体分子に関連する相互作用を解析していくことは、生命活動のメカニズムを解明していく上で、また、バイオミメティックな機能性材料を開発、評価する上でキーテクノロジーとなってきており、年々ニーズは高まっている。

そのようなニーズの拡大に対して、我々はこれまで汎用的に利用されているものとは異なる測定原理を有する反射干渉分光法 (Reflectometric Interference Spectroscopy : RIfS) を利用した分子間相互作用測定装置を「MI-Affinity」という名称で製品化し、2010年4月より上市を開始した。

2 分子間相互作用とは

生体分子は、単独で機能することはなく、相互作用によって複雑に組織化された状態になることで、はじめてその機能を発揮する。生命活動のメカニズムを解明していくには、生体分子間の相互作用を詳細に解析することが不可欠であり、解析していくことで今後の生命科学の分野における研究の新たな発見をもたらすことが期待される。

分子間の相互作用の形式には、例えばFig. 1のように静電引力、ファンデルワールス力、水素結合といった、電荷や双極子により発生する電氣的親和性による引力に加え、生体分子の存在している環境が通常水を溶媒としている事を考慮すると、疎水性相互作用などの因子も重要になってくる。いずれにしても非共有結合によるものが一般的に挙げられる¹⁾。

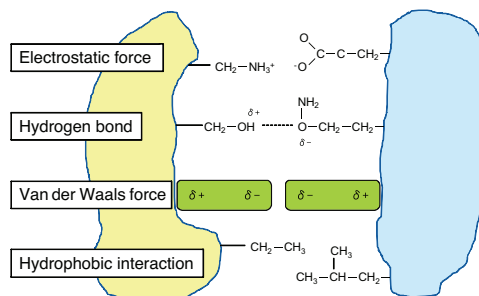


Fig. 1 Noncovalent molecular interaction.

例えば、DNAはプリン塩基であるアデニン、グアニンとピリミジン塩基であるチミン、シトシンがそれぞれ水素結合することではじめて、安定した二重らせん構造を形成、保持することが可能となる。また、タンパク質は、ポリペプチド鎖の主鎖間の水素結合により安定した二次構造を形成し、更に前述の相互作用が複合的に働くことにより、三次構造や四次構造といった複雑かつ規則的な立体構造の形成が可能となる。糖や脂質についても、DNAやタンパク質ほど明確になっていない部分があるものの同様の相互作用が働くことで様々な複合体を形成しているということが分かっている。

現在、そのような非共有結合的な相互作用の有無、結合や解離の速度を測定する機器の分野において、汎用的に利用されているものとしては、蛍光色素や放射性同位体などの標識を必要とせず、リアルタイムに相互作用を測定することが可能な、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) や水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance : QCM) を利用したものが挙げられる。

しかし、前者は、測定表面からの距離に依存するエバネッセント波を測定原理として利用しており、200nm以上の大きさの分子間相互作用を測定するには不向きとされており、後者は、温度や振動など外界の影響を非常に受けやすい水晶共振子を測定に用いるため、安定した測定を行うには非常に精密な温度コントロールが必要であり、そのために装置が大型化、あるいはコストが高くなるといった懸念点を抱えており、両者とも分析装置としてのこれ以上の高機能化には、限度があると推測される。

3 RfSの測定原理、システム

3.1 RfSの測定原理

分子間相互作用の測定において、分子によって構成される層を光学的な薄膜とみなすと、その薄膜面での反射光の干渉効果を分光計測することで、相互作用の状況がわかるだろうというのが、RfS、反射干渉分光法の基本的な考え方である。

反射光の性質は、薄膜の屈折率とその厚さ及び使用している光の波長によって決まる。同じ厚さの薄膜であっても、波長によって反射干渉の効果が異なるので、異なった波長からなる光、例えば白色光を用いると、薄膜からの反射光の分光特性は、薄膜の厚さの変化に伴って変化することになる。この干渉現象は、測定対象が光学的な薄膜とみなされる場合には、通常の光源を用いても膜厚が1 μ m程度であっても十分に観察される。

一方、分光測定において、多くの波長の値を選択して測定をすることで、反射光の分光特性の微小変化も感知することができ、結果として数nmの分子の挙動も測定できる。つまり、対象とする試料の大きさの範囲を、原理的に、非常に広くとることができるということが、RfSが、分子間相互作用の測定において、他の方式に比べて

持っている優位点である。

そして、この反射干渉効果は光学技術の一分野として古くから研究されており、実際にはレンズ表面の反射防止膜、増透膜、あるいは特定波長領域だけの透過率を制御するなど、多岐にわたって活用されている。それだけに、光学薄膜の反射干渉特性を評価する、いわゆる薄膜シミュレーションソフトも普及している。

MI-Affinityにおいては、その反射干渉によって分光反射率が極小値を示す波長の変化を測定のパラメータとしている。

測定器の光源や分光器の特性と、測定対象の光学的特性を考慮し、またアルカリや酸への耐性を考慮した上で、シリコン基板の上に、窒化シリコンをいわゆる1/4波長条件に近い膜厚で蒸着したものをセンサーチップとして用いている。それによって測定をモデル化すると、Fig.2のようになる。つまり、相互作用の基板 (substrate) にはシリコン、第1層に窒化シリコン、媒質 (medium) には水を用いて、薄膜上に分子が吸着する前後の反射率の変化を測定することになる。

薄膜上に吸着する分子の屈折率と膜厚を仮定して与えると分光反射率の計算を行うことができる。

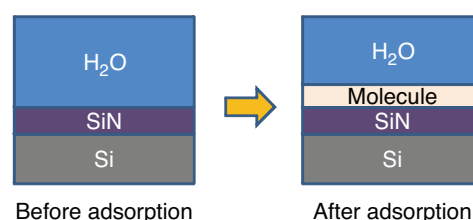


Fig. 2 Thin film simulation model.

Fig. 3 に示すようにシミュレーションの結果、分子が光学薄膜上に吸着することで、光学膜厚の増加に伴い、反射率のスペクトルに変化が見られ、ボトムが長波長側にシフトする様子が分かった。基本的に、相互作用においても同様の現象が起きると推定され、本測定装置は基本的にボトムピークの波長シフト ($\Delta\lambda$) をリアルタイムに測定することによって、相互作用を測定する仕組みとなっている。

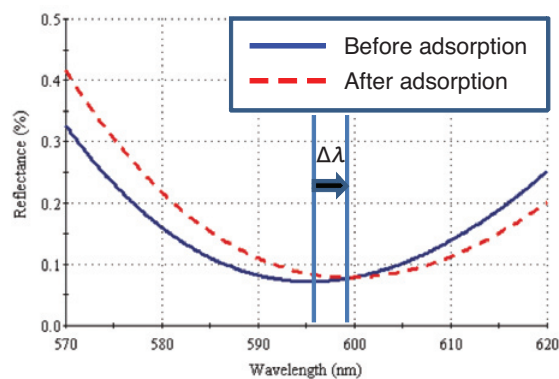


Fig. 3 Result of thin film simulation.

3.2 RIFSの測定システム

今回、我々が開発したMI-Affinityのサイズは280W×435D×270H (mm)と分析装置としては、小型で設置しやすい大きさとなっている。

Fig. 4 に示すように装置本体にPC, 任意の送液可能なポンプを接続するだけで測定が可能なシンプルな構成となっており, システム電源投入から稼働まで通常は1時間以上かかるのが約30分で完了するため, 測定までの待機時間も短く済む。



Fig. 4 Complete RIFS system.

装置手前にある遮光カバーを開けて, センサーチップとフローセルをセットする。フローセルをセンサーチップに密着させることで, 密閉した微細流路を形成することが可能となる。

センサーチップは, シリコンウエハーの上にPE-CVDにより窒化シリコン(SiN)の薄膜を形成したもの, フローセルはポリジメチルシロキサン(PDMS)製であり, 流路のサイズは2.5W×16D×0.1H (mm), 容積約4ulとなっている。

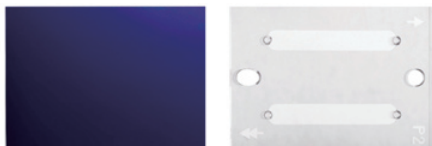


Fig. 5 Disposable sensor chip and flow cell.

RIFSのソフトには測定モード, 解析モードがある。測定モードでは, ソフトが装置に組み込まれた分光器と常時通信し, 波長に対する反射光の強度である分光強度の取得, 反射率の計算, 反射率ボトム値の算出を実施する。取得, 算出した3値はグラフにリアルタイムに反映される (Fig. 6)。

小グラフをクリックすると大グラフ側に切り替わり, 大グラフではドラッグ範囲を拡大出来る為, 測定者がこのグラフのここが見たいという思いを即反映出来る。これにより測定者は分子結合の有無や異常の発生を常に把握する事が可能である。また, グラフは常に画像ファイルに保存する事も可能となっている。

全体は日本語表記になっており, 機能にメニューリストは使わず説明入りボタンに統一してシンプル化した事で, 測定者は短時間で操作方法を習得出来る。

解析モードでは反射率ボトム値の時間変動データを解析する事により, 分子間の結合力の指標として会合定数, 解離定数, 会合速度定数, 解離速度定数を算出出来る

(Fig. 7)。この値から分子同士の結合の速さ, 結合の強さを判断する事が可能である。会合, 解離の位置は手動/自動で設定可能であり, グラフ全体のフィルタリングや拡大機能により, 会合, 解離位置の微調整も可能である。

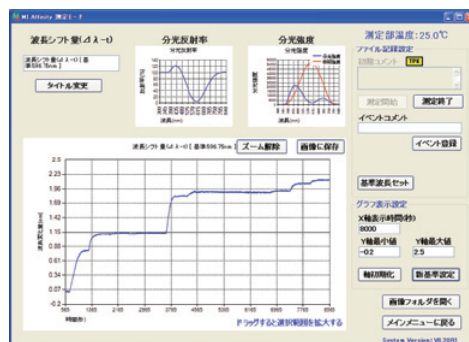


Fig. 6 Monitoring of measurement.

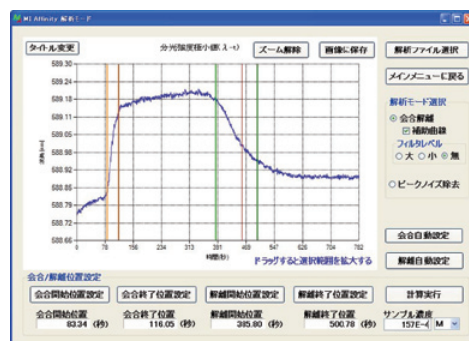


Fig. 7 Analysis of measurement data.

4 測定の流れ

4.1 相互作用測定の流れ

本稿で報告する相互作用の例としては, 無修飾の窒化シリコン基板に対して, 官能基を修飾する工程と, 官能基修飾を行った基板を測定装置にセットして, 送液による相互作用を測定する工程の2つに分けることが出来る。

4.2 センサーチップの表面修飾

センサーチップの表面修飾は, シランカップリング剤やビオチン化試薬を用いて, 以下のFig. 8 に示す通りに調製を行った。

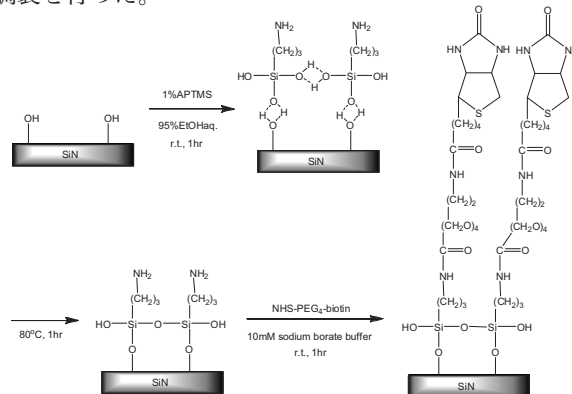


Fig. 8 Preparation of a biotinylated sensor chip.

まず最初に、95%エタノール水溶液10mlに3-Amino-propyltrimethoxysilane (APTMS) を100ul添加し、室温で1時間攪拌してシランカップリング剤の加水分解を行った。次に、無修飾の窒化シリコン基板を、加水分解を行ったシランカップリング剤溶液に室温で1時間浸漬し、窒化シリコン基板表面の水酸基とシランカップリング剤の水酸基とを水素結合で結合させた。エタノール、超純水で洗浄後、80°Cで1時間脱水縮合させることにより、アミノシラン化した基板を調製した。

基板表面へのアミノ基導入の確認は、XPS (X-ray-photoelectron spectroscopy) を用いて行った。

Table 1 Elementary analysis of the sensor chip by XPS.

Element	C	N		O	Si	
		N-C	N-Si		Si-N	Si-O
Unmodified sensor chip	16.9%	18.8%		37.7%	26.7%	
		0.0%	18.8%		20.7%	6.0%
Amino-silanized sensor chip	32.2%	25.7%		20.4%	21.8%	
		3.0%	22.7%		14.8%	7.0%

XPSにより、無修飾基板にシランカップリング剤と反応可能なSi-O結合の存在と、実際にシランカップリング剤により、アミノ基が導入されたことを示す、新たなN-C結合の存在を確認することが出来た (Table 1)。

更に、NHS-PEG4-BiotinをpH8.5に調製した10mMホウ酸ナトリウムバッファー中で室温、1時間反応させることで、基板表面にビオチンを有する基板を調製した。

4.3 相互作用測定結果

表面をビオチンで修飾した基板を測定装置にセットし、以下に示す実験プロトコルにより相互作用の測定が可能か検証を行った。

今回紹介するのは、生体分子の相互作用において一般的な抗原抗体反応であり、抗原としては、肝細胞癌の腫瘍マーカーとして代表的なAFP (Alpha-fetoprotein) を用いた。

測定の流れとしては、以下のFig.9に示す通りである。

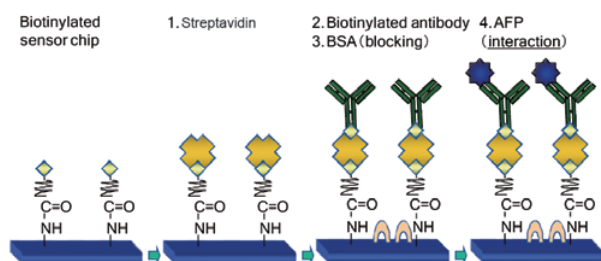


Fig. 9 Schematic protocol of antigen-antibody interaction by RfS.

ビオチン化した基板に対して、ストレプトアビジン、ビオチン化抗AFP抗体、AFPの順番に流すことで、アビジン-ビオチン反応、抗原抗体反応がそれぞれ検出可能か検証を行った。また、抗原抗体反応が特異的な反応で

あることを確認するため、AFPを流す前に牛血清アルブミン (Bovine Serum Albumin : BSA) で基板をブロッキングすることとし、また、抗体を固相化しない場合にも同様の実験を行い、両者の差を比較した (Fig. 10)。

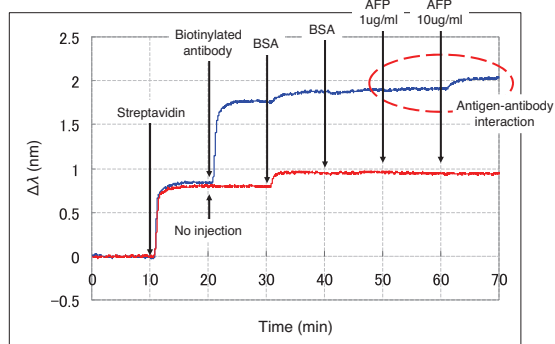


Fig. 10 Binding of streptavidin, biotinylated anti-AFP antibody, and AFP to the sensor chip.

Blue curve: immobilized antibody;
Red curve: unimmobilized antibody.

結果としては、ストレプトアビジン、ビオチン化抗体を流した時に抗体を固相化した場合にのみ、抗原を流した時に $\Delta\lambda$ の上昇が見られた。これらの結果から、本装置を用いて特異的な相互作用が検出可能であることが確認された。

尚、抗原濃度1ug/mlでは、 $\Delta\lambda$ の上昇はわずかであり、相互作用が十分検出出来たとは言い難いが、10ug/mlでは検出可能であることが確認された。今回の測定例から本装置の抗原抗体反応の検出限界は、1~10ug/ml程度であることが推測される。

また、本稿では紹介を割愛するが、抗原抗体反応だけでなく、DNAのハイブリダイゼーションや糖-レクチンといった相互作用も同様の手法を用いて検出可能であることを確認している。

5 まとめ

今回紹介したRfSを用いた分子間相互作用測定装置は、特異的な相互作用をノンラベルで、リアルタイムに検出できることを、代表的な相互作用である抗原抗体反応を用いて確認した。

今後、システムを高感度化、小型化、低価格化することにより、SPRやQCMと同様の分子間相互作用装置としてだけでなく、体外診断装置として市場に参入できる可能性があると考えている。

また、RfSの測定原理を活かしたサイズが大きい高分子や細胞についての測定方法を確立していくことで、新たな研究用途に対する分析機器として提供できるようになると考えている。

●参考文献

- 岡村和夫「抗体科学入門」, (株)工学社, p28