

■ 研究課題名

酵母由来中空バイオナノ粒子を用いる革新的超高感度バイオセンシング技術の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① センシングに適した中空バイオナノ粒子の開発
（◎谷澤克行／国立大学法人大阪大学産業科学研究所）
- ② 粒子の高機能化とその精製および生産効率の向上
（妹尾昌治／株式会社ビークル）
- ③ 粒子標識手法と高感度センシングツールの基板開発
（米原徹／東レ株式会社先端融合研究所）

■ 研究の目的

これまでに、B型肝炎ウィルスの表面抗原タンパク質が、その物理化学的な性質に基づき自己組織化され酵母細胞内で直径平均約100ナノメートルの中空バイオナノ粒子として高効率に生産されることを見いだした。本粒子は物理的に安定で、その表面や内部に様々な生体関連物質の提示や内包が可能な極めてユニークな“バイオ”“ナノ”融合素材である。本研究では、この中空バイオナノ粒子の特性を活かし、現在、医療・環境・食品検査の分野で大きな課題となっている、超微量物質とそれらに対する特異抗体の迅速かつ高感度な検出が可能なバイオセンシング技術を開発する。具体的にはバイオマーカー（アルブミンや肝機能検査用酵素GPT・GOT等、尿や血清中に含まれる生体由来の物質で生体機能の変化を定量的に把握するための指標となるもの）や内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）、さらにはアレルギー原因物質（アレルゲン）等に対するバイオセンシング技術を開発する。

■ 主要な成果

- ① 遺伝子工学的手法を用いてバイオナノ粒子の表層に抗体タンパク質結合タグ（ZZタグ）を付加し、バイオナノ粒子（ZZ粒子）を作製した。これに各種の標識抗体を結合させることで、酵素免疫測定法（ELISA法）を高感度化することが可能であることを明らかにした（図1）。
- ② ビオチン標識したバイオナノ粒子を作製し、これを用いることにより、ELISA法におけるABC試薬のシグナルを大幅に増幅させることに成功した。具体的な応用例として、市販のアレルゲン特異的IgE測定キットに対し、約50倍の検出感度を持つ測定系を構築することができた（図2）。
- ③ ZZ粒子を用いることにより、疾患に関連する抗体を迅速かつ簡便に測定するための検査キットに含まれるイムノスティック（材質はポリスチレンで、チューブ内で反応を行うことにより研究室外でもELISAやRIAテストが可能）のシグナルを増幅させ、臨床現場における診断の感度を向上させるのに有効であることを実証した（図3）。
- ④ 人工脂質膜小胞であるリポソームに蛍光ビーズ等のセンシング用分子を内包させ、バイオナノ粒子と融合する方法を確立した（図4）。また、これを用いることにより各種特

異抗体の蛍光センシングが可能であることを確認した。

- ⑤ バイオナノ粒子を固相化した基板を用いることにより抗体を整列化させ、ELISA 法による癌マーカーの検出感度を向上させることに成功した（図5）。
- ⑥ ZZ 粒子に対する各種動物由来の抗体タンパク質（IgG）の結合量を水晶発振子マイクロバランス測定法（QCM 法）により測定し、各種動物の IgG サブクラスにより ZZ 粒子への結合能が著しく異なることを明らかにした（図6）。
- ⑦ 上記結果から、ZZ タンパク質 1 個に対する抗体タンパク質の結合量は最大でも約 0.47 個（ZZ 粒子 1 個当たりでは、約 60 個）であることが判明した。これは、バイオナノ粒子表面の ZZ タグの密度が高すぎることにより、バイオナノ粒子への結合における抗体分子間の立体障害に起因すると考えられた。そこで、これを回避するため、ZZ タグ付きタンパク質とタグなしタンパク質のハイブリッド型バイオナノ粒子を開発した。
- ⑧ 酵母によるバイオナノ粒子の生産について、培養工程、集菌工程、破碎・抽出工程、透析・熱処理工程、分画・濃縮工程、凍結乾燥工程の最適化を行い、バイオナノ粒子の大量生産プロセスを確立した（図7）。

■ 公表した主な特許と論文

- ① 特開 2007-121276：基板およびその製造方法：東レ（株）、（株）ビークル
- ② 特開 2007-127626：免疫学的測定用ナノ粒子：東レ（株）、（株）ビークル

■ 今後の展開方向

- ① 新たに開発したハイブリッド型バイオナノ粒子への抗体結合条件の最適化等を行い、より高感度なセンシングが可能でバイオナノ粒子に改良する。
- ② 酵母によるバイオナノ粒子の大量生産プロセスを確立できたので、酵母の培養条件等をさらに詳細に検討し、培養バッチ毎の生産量の変動が少なく安定的にバイオナノ粒子を供給できる生産プロセスを開発するとともに、生産コストの削減にも取り組む。
- ③ 癌抗原・アレルギー関連抗体の ELISA 法による測定をバイオナノ粒子により高感度化した成果を活用し、診断薬事業への展開を図る。
- ④ バイオナノ粒子を用いた高感度抗体測定キットや、バイオナノ粒子を用いた抗体整列基板など、研究支援ツールの開発に取り組む。
- ⑤ ③および④に関する受託事業を検討する。

■ 問い合わせ先

- ① センシング用バイオナノ粒子の改良：大阪大学産業科学研究所（06-6879-8460）
- ② バイオナノ粒子の安定的大量生産プロセスの開発：（株）ビークル（086-286-8091）
- ③ 抗原及び抗体の免疫学的測定による診断薬事業：東レ株式会社 東京本社 研究開発企画部（03-3245-5678）
- ④ 抗体測定キットなど研究支援ツール事業（バイオナノ粒子を用いた抗体整列基板）：東レ株式会社 東京本社 研究開発企画部（03-3245-5678）
- ⑤ ③および④に関する受託事業：東レ株式会社 東京本社 研究開発企画部（03-3245-5678）

■ 研究成果の具体的図表

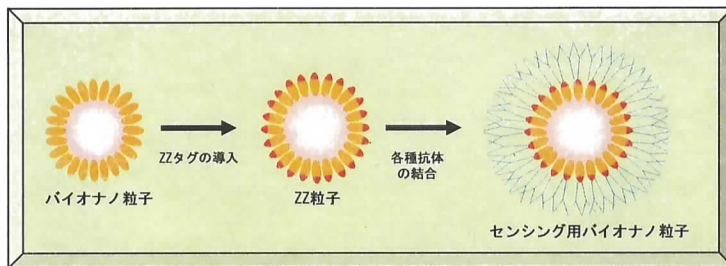


図1 センシング用バイオナノ粒子の作製（上）と超高感度化（下）

上：各種抗体タンパク質の不変領域と結合するZZタグ（▲）を遺伝子工学的手法でバイオナノ粒子表面に付加（ZZ粒子の作製）することにより、任意の抗体（Yや、ELISA法の二次抗体など）をタグを介して表面に多数提示できるセンシング用粒子を作製した。

下：ZZ粒子に、蛍光またはビオチン標識した二次抗体を多数結合させる（高感度なセンシング用粒子の作製）ことにより、従来のELISA法を超高感度化することが可能である。

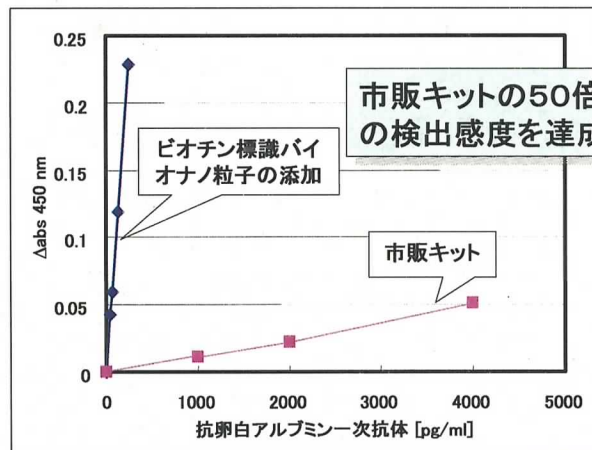
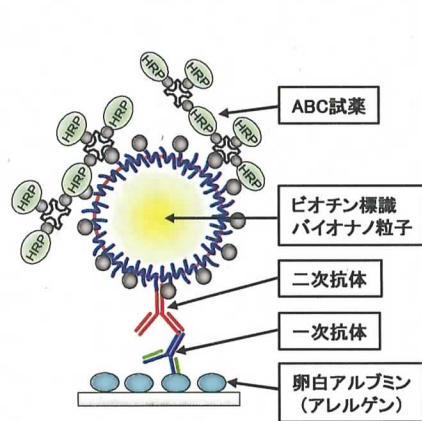
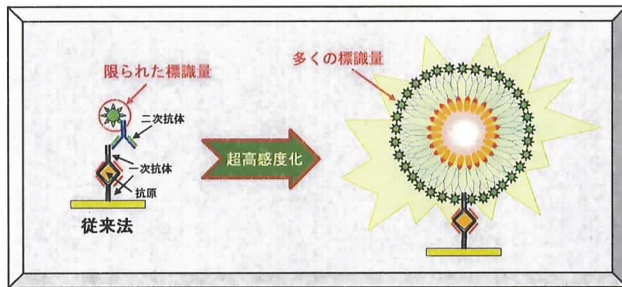


図2 ビオチン標識バイオナノ粒子を用いたアレルギー特異的抗体の高感度測定

バイオナノ粒子の表面に多数のビオチン標識を導入することにより、ELISA法のABC試薬（ストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体）の結合量を大幅に増加させることができた。

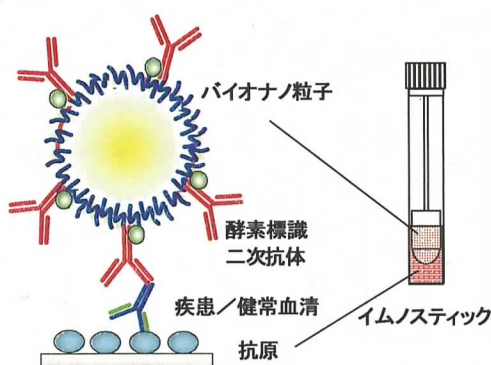


図3 疾患関連抗体のバイオナノ粒子による高感度測定

左：検査キットのポリスチレン製イムノスティックと成分構成

右：バイオナノ粒子を添加することにより、イムノスティック上での発色が約10倍上昇し、迅速簡易診断キットを高感度化することができた。臨床診断に有用である。

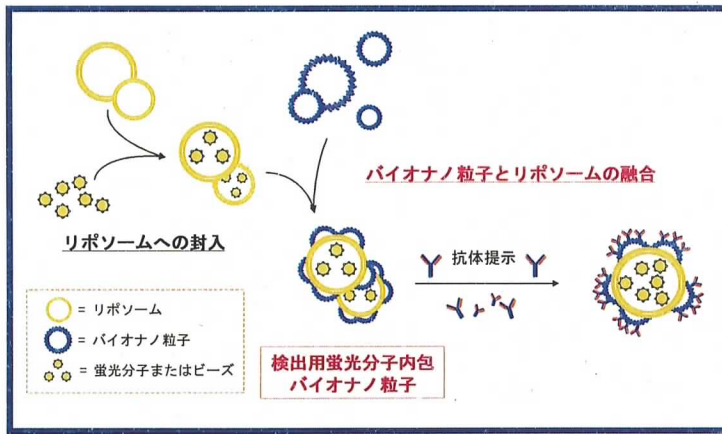


図4 蛍光分子を内包したバイオナノ粒子の作製

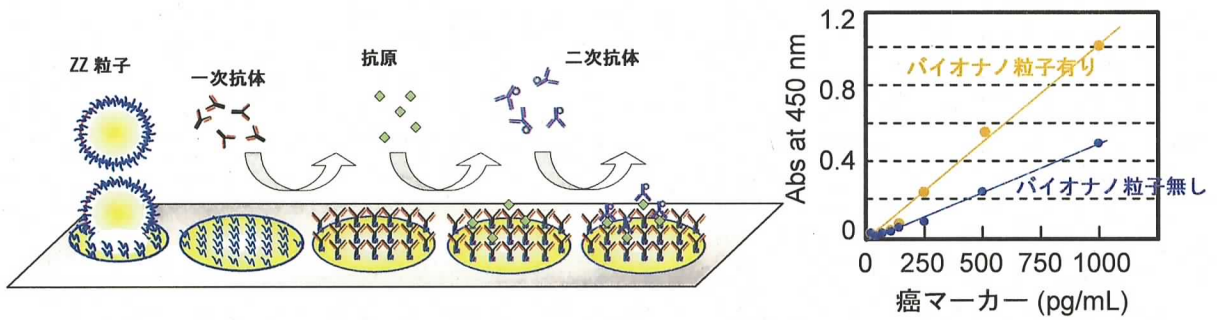


図5 バイオナノ粒子による抗体整列基板の作製（左）と癌マーカー測定の高感度化（右）

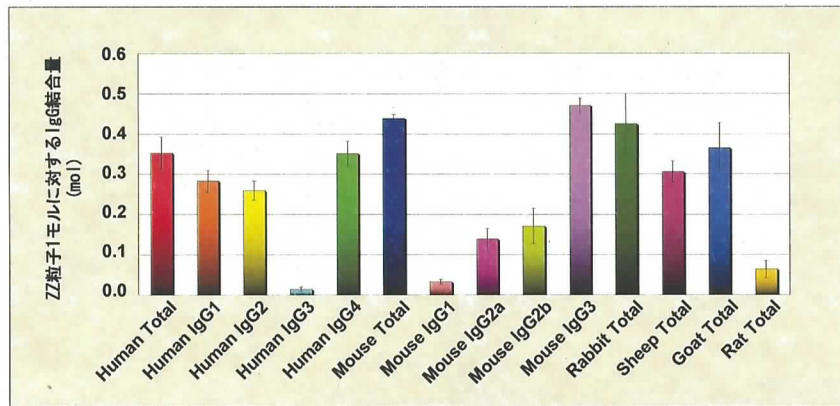


図6 ZZ粒子に対する各種動物由来の抗体の結含量の測定



図7 バイオナノ粒子の大量生産プロセスの確立