

【成果情報名】 原子間力顕微鏡を応用した新規な抗原抗体反応測定システムの構築

【要 約】 原子間力顕微鏡技術を応用し、抗原を固定した基板と抗体を固定した探針との間に働く微弱な力を、物理吸着等の非特異的な力と区別して明確に検出する手法を確立した。本手法は、アレルゲン等の食品中に含まれる微量成分を迅速検出するための基礎技術となり得る。

【部 署】 食品総合研究所・食品工学部・計測工学研究室

【連絡先】 計測工学研究室 029-838-8054

【成果区分】 参考

【キーワード】 原子間力顕微鏡 (AFM)、抗原抗体、アレルゲン

【背景・ねらい】

ピコニュートン (pN) レベルの非常に微弱な力計測が可能な原子間力顕微鏡 (AFM) 技術を応用した、生体分子間相互作用の有無を迅速に検出する新規技術の構築をめざしている。本技術が実用化されれば、1～数分子のタンパク質間相互作用計測の実現による生命科学や基礎医学への貢献に加え、食品中のアレルゲンや細菌等の危険因子の検出、糖鎖やペプチドの機能解析等への応用の可能性も大きく、食品産業における応用が期待できる。

【成果の内容・特徴】

1. 金被覆 AFM 探針上にアルカンチオールを介して活性(抗原への結合能)を損なうことなく抗体(抗フェリチン抗体)を固定する技術、マイカ基板をナノレベルの平滑を保ったまま、APTES (3-aminopropyltrimethoxysilane)により修飾し、その基板の上にタンパク質試料(抗原:フェリチン; 参照試料:BSA、アビジン)を固定する技術を確立した。
2. AFMにより探針と基板の間に働く吸着力を計測し、抗体と抗原間の相互作用力計測を行った。また、測定溶液条件を検討し、生理緩衝液(PBS)の場合には非特異的吸着が大きく、抗原と参照試料の間に違いを検出することが困難であるが、測定溶液中への界面活性剤及びタンパク質加水分解物の添加により、探針と基板間の非特異的吸着が大幅に減少することを見出した。
3. 上記に加えて、探針の移動速度を制御することにより、従来手法では困難であった抗原と抗体の間の特異的相互作用力を、物理吸着等の非特異的な相互作用力と明確に区別して検出することに成功した(図1、図2)。この結果に基づき、抗原抗体反応の検出方法に関する特許出願を行った。
4. 将来的に、複数の探針を持つアレイ化プローブを使用して、基板の上に配列した複数の試料に対して抗原抗体反応の検出を行うことを想定し、タンパク質を基板の上に複数の微小スポットとしてパターン化して固定する方法の検討を行い、マイクロコンタクトプリント(μ CP)法により、10～20 μ mのタンパク質スポットを50 μ m間隔で配置したタンパク質アレイを作製した(図3)。

【成果の活用面・留意点】

現在、本技術のアレルゲン検知への適用をめざして、卵アレルギーの主要アレルゲンであるオボムコイドを試料としたモデル実験に着手しており、その後、食品由来の実試料への展開を想定している。本技術が完成すれば、新しい原理に基づくアレルゲン検査装置やアレルゲンチップ等への展開の可能性も考えられる。

[具体的データ]

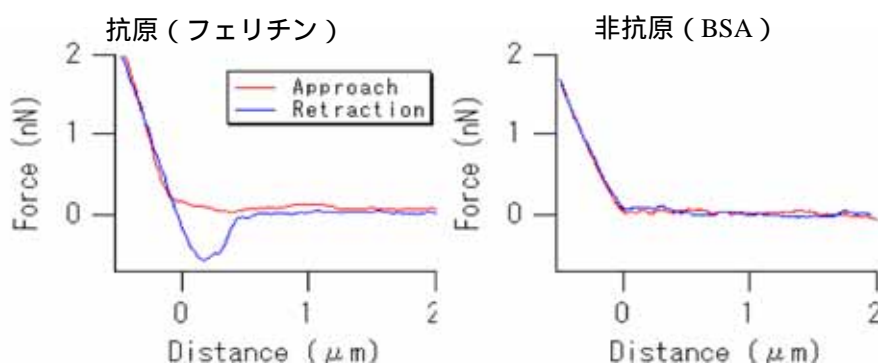


図 1 AFM による抗原抗体相互作用の検出
抗原固定探針と抗体固定基板の間には、抗原抗体反応に由来する吸着力（左図下向きのピーク）が観察されるが、非抗原固定基板との間には観察されない。

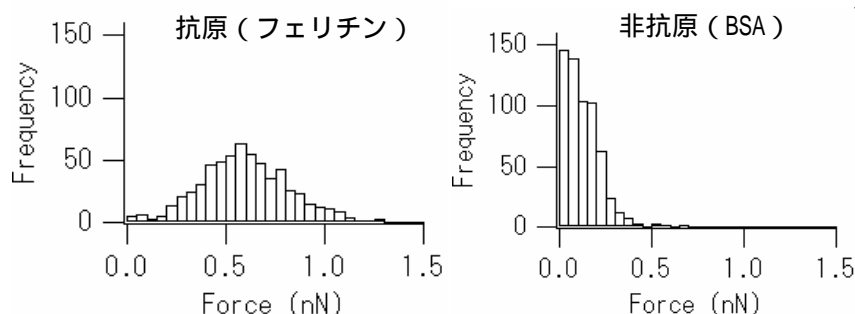


図 2 AFM により計測された抗原抗体間の相互作用力のヒストグラム
抗原に対しては、抗体固定探針との間に約 0.6nN を分布のピークとする相互作用力が計測されたが、非抗原との間の相互作用力は弱く、ピークも観察されない。

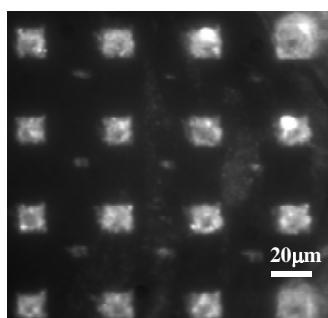


図 3 μ CP によるタンパク質アレイの作製
APTES 修飾マイカ基板上に μ CP 法によりフェリチン（蛍光標識）を転写し、タンパク質アレイを作製した。図の白い部分にタンパク質が固定されている。パターンは約 $15\mu\text{m}$ 角の方形、間隔は $50\mu\text{m}$ である。

[その他]

研究課題名：液中用プローブの評価およびバイオチップシステム評価実験

予算区分：NEDO 基盤技術

研究期間：2003～2006 年度

研究担当者：杉山滋、若山純一、小堀俊郎、大谷敏郎

発表論文等：

- 1) 若山純一、赤沼哲史、関口博史、大谷敏郎、杉山滋：原子間力顕微鏡による抗体抗原反応測定のための新しい方法、ブレインテクノニュース、No.133、26～31（2006）
- 2) 杉山滋、若山純一、関口博史、佐宗めぐみ、大谷敏郎：抗原抗体反応の検出方法と抗原抗体反応検出用キット、特願 2005-336594(2005 年 11 月 22 日)