

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 大竹 真央 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（工学） |
| 学位記番号 | 医工農博甲第77号 |
| 学位授与年月日 | 令和4年3月18日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 専攻名 | 工学専攻 システム統合工学コース |
| 学位論文題目 | 新規分子診断への応用を志向する 網羅的ナノ相互作用解析技術の研究 |
| 論文審査委員 | 主査 教授 藤 森 篤 教授 伊 藤 安 海 教授 桑 原 哲 夫 准教授 鍵 山 善 之 准教授 舩 谷 俊 平 准教授 浮 田 芳 昭 |

学位論文内容の要旨

本論文では、これまで結合の量的評価が主体であった分子間相互作用について結合力による質的評価を導入するべく、ハイスループットかつ簡便な分子間相互作用の力学解析手法の開発及びビーズに作用する非特異的な相互作用による影響の評価手法について開発を行った。

第1章では、遠心力を用いた分子間の結合力測定について測定原理の実証を行った。また、提示した測定原理の実証のため、基本的な実験系の構築を行った。ビーズ複合体に対して遠心力を印加すると、ある時点で結合部の分子間結合が破断して複合体が分離する。構築した実験系によってビーズ複合体が分離していく様子が観察できた。このとき得られた結合力の値は既存法による解析と同程度であることから、測定原理の実証に成功したと言える。一方、ビーズ複合体は形成収率が悪く、顕微鏡視野内に複数のビーズ複合体を集めることが困難であったため、ハイスループット化に向けた測定原理の改良が必要であった。

第 2 章では、実証に成功した分子間相互作用の測定原理について複数同時測定を可能にするための改良を行った。その結果、抗原分子の有無に関わらず基板表面に吸着しているビーズが見られた。そこで、ポリスチレンビーズに遠心力を印加してビーズの付着力を調べたところ抗原有りとは抗原無しでは付着力分布に違いが見られた。また、抗原有りで見られた付着力のピークは第 1 章で得られた抗原抗体反応結合力と近い値を示しており、抗原抗体反応の結合力を示していることが期待された。以上より、複数同時測定が実証できた。一方、1 度の実験で測定に成功した結合の数は数十個程度と少なく、更なるハイスループット化が必要であった。

第 3 章では、測定の更なるハイスループット化とバイオ計測に向けた測定系の改良を行った。初めに、引張力の印加方法をポリスチレンビーズに作用する浮力から遠心力による沈降力に変更した。また、ハイスループット化に向けた検討として APTES 処理によるアミノ基修飾ガラス基板の調製と GA による抗体修飾技術の確立を行った。さらに、チャンバーを複数配置可能な基板ホルダーの開発やビーズの自動カウントプログラムの構築を行った。以上の検討によって 1 度の実験で数千個のビーズについて付着力測定が可能となり、ハイスループット測定プラットフォームの構築に成功した。

一方、得られたビーズ付着力分布では抗原有りとは抗原無しの反応系による違いを識別することができなかった。さらに、200 pN の沈降力を加えても分離しないビーズが多く見られた。これは、これまでの分子間相互作用測定結果と比べると非常に強固にビーズが基板と付着しており、ビーズ-基板間に作用する非特異的な相互作用について影響の評価を行う必要があった。

第 4 章では、非特異的なビーズの付着について主要因となる分子間力を調べた。これまでの実験結果より、ビーズの付着には表面官能基による帯電が影響していることが示唆された。そこで、基板表面の官能基が異なる条件下においてマイクロビーズの付着率を測定したところ、基板表面の官能基による影響は限定的であった。次に、分散溶媒に DPBS と超純水を使用してビーズ付着率の比較を行ったところ、DPBS ではほぼ全てのビーズが基板に付着しており、超純水ではほぼ全てのビーズが基板から分離していた。このことから、コロイド粒子の分散予測に用いられる DLVO 理論を基に考察を行った。その結果、ビーズの物理吸着はファンデルワールス力が主要因であることがわかった。

第 5 章では、DLVO ポテンシャルエネルギーの試算結果を基に分子間相互作用を指向し

た界面設計戦略について検討を行った。初めに、粒子径の変更が及ぼす影響について検討を行った。その結果、粒子径の大きいビーズは界面積の増加によって表面間に作用する非特異的相互作用の影響が大きくなると示唆された。次に、生体分子の反応時間の間斥力ポテンシャルによるビーズの保持が安定的であるか調べた。これまでのビーズ付着率測定では、ビーズに重力を印加して基板から分離することでビーズ付着率を測定していた。しかし、この方法では同一ビーズの付着状態の変化を観察することができないため、分離動作を行わずにビーズの付着率測定が可能なブラウン運動解析法を開発した。開発したブラウン運動解析法によってビーズ付着率の時間変化を調べたところ、十分負に帯電しているカルボキシル基修飾ビーズでは、時間による付着率変化がほとんど見られなかった。それに対して電氣的に中性に近づいているアミノ基修飾ビーズでは時間に応じて付着率が増加していく様子が確認された。以上の検討から分子間相互作用測定における界面設計戦略を提示した。

以上の新規分子診断への応用を目的としたナノ界面間相互作用測定技術の測定原理実証とハイスループット測定プラットフォームの構築、非特異的相互作用によるバックグラウンドノイズの評価を通じてこの解析技術が新規分子診断技術への応用に対して有意性を持つことを示した。

これまでの分子間相互作用測定は、無数に発生している分子間結合の平均的な挙動を測定パラメータとしており、個々の結合について詳細な解析を行うことができない。このような量的評価によるバイオセンシングの場合、夾雑分子の誤認識によるノイズの影響が無視できなくなるため、高感度化に限界がある。個々の結合に対して質的な評価を行うことで標的分子によるシグナルと夾雑分子によるノイズを識別することでバイオセンシングのさらなる高感度化が可能になると考えられる。また、既存のバイオセンシング技術の高感度だけでなく、PSA のサブフォーム解析による前立腺がんの高精度スクリーニング等、結合の質的な評価を行うこと全く新しい測定原理を基にしたバイオセンシング技術の開発が期待できる。

論文審査結果の要旨

本論文は、主として生体分子の計測における評価指標として、生体分子同士の相互作用を引張力という力学的な数値を新規に適用する試みが纏められており、ナノメートルスケールにおける機械的な評価手法の開発並びに、ナノ力学現象の探求が著されている。

序章では生体分子間相互作用の捉え方を説明し、主に表面プラズモン共鳴法による従来の生体分子間相互作用の概念やこの問題点について述べている。さらに本研究にとっての先行研究として原子間力顕微鏡による生体分子間相互作用計測の研究を紹介し、本手法における技術的課題を述べ、本研究の位置付けを説明している。

第1章では序章において述べた課題を解決する手法として、遠心力による生体分子間相互作用解析手法を提案し、この実証研究の成果を述べている。測定系における生体分子間相互作用の特異性を検討した上で、力学計測を試み、この結果が先行研究において報告されている結果との比較によって妥当であると結論しており、原理の実証に成功したものである。

第2章および第3章では第1章で実現した測定技術をさらに改良すべく、よりハイスループットな力学測定を実現できる測定系の開発について述べている。この実現のために、生体分子を固定化した基板を開発し、この表面で一度に多数の相互作用を計測できることを見出している。また、自動的なハイスループット計測の要素技術として、遠心力印加のための機構や、粒子付着数の解析アルゴリズムの開発に取り組み、数百以上の相互作用を一括測定可能な計測システムを実現している。

第4章では、分子レベルの結合状態の第2章および第3章の計測において見られた、非特異的相互作用の解明に取り組んだ成果が述べられている。まず、非特異的相互作用の原因として静電相互作用に着目して表面電位測定を行い、これと力学計測の結果から表面電位が非特異的な相互作用の主要因ではないことを結論している。さらに溶液中の塩強度の影響について検討を行い、超純水中においては非特異的な相互作用が無くなることを見出した。この現象をDLVO理論を基礎理論として説明し、さらにHEPESを緩衝液として用いることで、塩強度と非特異的な相互作用の定量的な計測を実現し、非特異的相互作用と塩強度の相関を実験により明らかにした。

第5章では、粒子と基板間における生体分子相互作用系の一般的な設計戦略を構築するため、粒子径と非特異的相互作用との関係について調査し、この結果をDLVO理論を基礎として考察している。また、ブラウン運動の解析により粒子と基盤との相互作用状態を解析する手法を独自に開発し、粒子と基板表面との相互作用時間と非特異的相互作用の発生頻度の関係の解明に取り組んでいる。この結果から、粒子の付着確率の相互作用時間へ

の依存性は低く、個々の粒子の付着特性が現象を支配することを見出している。
第6章は総括として本論文全体を俯瞰し、本研究の意義について確認している。

以上に述べたとおり、本論文は申請者が山梨大学大学院に在学中に行った優れた研究をまとめたものであり、博士の学位を授与するに相応しいものであると判断した。