

酵素の整列固定化を指向した足場分子の開発と食品分野への応用

東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科 飯嶋 益巳

【略歴】

1996 年 東京農業大学農学部醸造学科卒業

1998 年 東京農業大学大学院農学研究科醸造学専攻修士課程修了

1998 年 (社) 農林水産先端技術研究所 研究員

2001 年 (社) 北里研究所生物製剤研究所 研究員

2005 年 米国マウントサイナイ医科大学 リサーチコーディネーター

2007 年 大阪大学産業科学研究所 特任研究員

2009 年 名古屋大学大学院生命農学研究科 技術補佐員・研究員・特任助教

(この間 2011 年 博士 (農学) 学位取得)

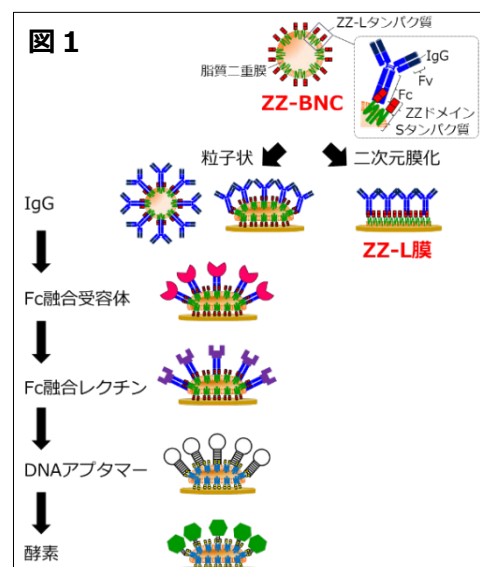
2015 年 大阪大学産業科学研究所 特任助教・特任准教授

2018 年 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 准教授 現在に至る

食品製造現場において危害分析重要管理点 (Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)) の導入が義務化となり、食物アレルギーをはじめとした毒素・農薬・細菌などの様々な危害要因を、簡単に、迅速に、感度良く測定できる技術開発が求められている。特に、酵素と基質、抗体と抗原、受容体とリガンド、レクチンと糖鎖、DNA アプタマーと DNA 結合タンパク質等の生体分子間相互作用を特異的・定量的に検出するバイオセンサーは、食品の安全性や機能性の評価、健康状態の診断等、生命科学領域において極めて重要な測定技術である。具体的な検出法には、酵素結合免疫測定法 (ELISA)、水晶共振子微量天秤法 (QCM 法)、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) 等が挙げられ、一般的にセンサー表面でバイオセンシング分子 (特に抗体 (IgG)) を固定して標的物質 (抗原) を測定する。しかし抗体は希少で高価なものも多いことから、抗体にダメージを与えず、使用量を可能な限り少なくし、無駄なく抗原抗体反応に供して、さらに高感度化を達成する技術開発が急がれている。そこで近年これらの課題を克服するために、センサー表面で IgG をクラスター化し、向きを揃えて整列提示できる「足場分子」の開発が行われている¹。しかし従来法 (クロスリンカー、自己組織化単分子膜、Protein A 等) は、化学修飾による抗体の劣化や、足場分子自身の向きを制御できず抗体を完全に整列化できないなど、バイオセンサーの機能向上に理想的な足場技術として不十分であった。

バイオセンシング分子整列提示型足場分子の開発と バイオセンシングの高感度化への応用

そこで我々は、B型肝炎ウイルス表面抗原 L タンパク質を酵母で過剰発現することにより、酵母小胞体膜由来リポソームに同タンパク質が埋め込まれて形成される、中空ナノ粒子・バイオナノカプセル (BNC)²の表層に、Protein A 由来 IgG-Fc 領域結合 ZZ ドメインを融合した ZZ-BNC³ (直径約 30 nm) を開発した (図 1)。そして、ZZ-BNC を各種バイオセンシング (ELISA^{4,6}、ウェスタンブロット法⁴、QCM 法³、SPR 法³、蛍光免疫測定法⁷) の足場分子として使用すると、従来法と比較して抗原を高感度に検出できること (例: ELISA 食物アレルギー・オボアルブミン検出の従来比最大約 20 倍)、IgG の使用量を低減できること (例: QCM 従来比約 200 分の 1)、抗体の使用制限を解消



できること（例：同一動物種・サブクラスの IgG を同時に使用可能）等を見出した。また、高速原子間力顕微鏡を用いて IgG の Fc 領域が ZZ-BNC に固定される動体の可視化に世界で初めて成功し⁸、ZZ-BNC はバイオセンサー表面で、IgG に対して化学的・物理的なダメージを与えず整列提示できる理想的な足場分子であることを実証した。一方、バイオセンシング以外への応用展開として、抗体医薬を ZZ-BNC 表層に整列提示することで、治療効果を飛躍的に向上できることを見出し⁹、医療分野における ZZ-BNC の汎用性を示した。

次に我々は、IgG 以外のバイオセンシング分子（サイトカイン受容体¹⁰、レクチン¹¹）を整列提示できる方法を見出し、サイトカインおよび糖鎖の高感度検出ならびにセンシング分子の使用量を低減できることを示した。さらに、DNA アプタマーを整列提示できる BNC を創製し、DNA 結合タンパク質の高感度検出を可能にした。

さらに最近、粒子状の ZZ-BNC の膜構造を界面活性剤で破壊して ZZ-L タンパク質を単分子化し、人工脂質二重膜に埋め込んだ二次元 ZZ-L 膜を創製した¹²。本 ZZ-L 膜は等量の ZZ-BNC 法と比べて、抗原結合量を約 6 倍上昇できること、ZZ-L タンパク質の提示密度を調節できること、センサー接触面の無駄な ZZ-L タンパク質を低減できることが判明した。ZZ-L 膜は様々な形状のセンサー表面に応用できる、ZZ-BNC よりもさらに理想的な足場分子であることが明らかとなった。

HACCP 導入に向けた食品危害因子の高感度・簡便検出法への展開

市販の食物アレルギーおよび毒素検出 ELISA キットに ZZ-BNC を添加するだけで、従来法の高感度化および抗体使用量を低減できることを見出した。さらに、固相化食物アレルギーを検出するイムノスティック法を構築し、ZZ-BNC を使用すると発色強度が約 10 倍増強し、約 1 時間での簡易検査法として有効なことを見出した。これらは、酵素標識検出抗体が ZZ-BNC 表層でクラスター化および整列化する効果と示唆された。現在、ZZ-BNC および ZZ-L 膜を様々な抗原検出の測定系に応用し、HACCP の現場で、簡単に、迅速に、感度良く測定できる実用化キットの開発を目指している。

今後の展望

BNC 技術を基本骨格として酵素を整列提示できる足場分子を開発し、特に食品産業におけるバイオセンシングの機能向上、バイオリアクター等の物質変換や物質生産の効率化に貢献したいと考えている。

1. Iijima, M. et al. Biosens. Bioelectron. 89, 810–821 (2017).
2. Kuroda, S. et al. J. Biol. Chem. 267, 1953–1961 (1992).
3. Iijima, M. et al. Biomaterials 32, 1455–1464 (2011).
4. Iijima, M. et al. Anal. Biochem. 396, 257–261 (2010).
5. Iijima, M. et al. Biosci. Biotech. Biochem. 77, 843–846 (2013).
6. Iijima, M. et al. Analyst 138, 3470–3477 (2013).
7. Iijima, M. et al. Biomaterials 32, 9011–9020 (2011).
8. Iijima, M. et al. Sci. Rep. 2, 790 (2012).
9. Iijima, M. et al. Acta Biomater. 86, 373–280 (2019).
10. Iijima, M. et al. Biotechnol. J. 11, 805–813 (2016).
11. Iijima, M. et al. Biosci Biotechnol Biochem. 84, 1775–1779 (2020).
12. Iijima, M. et al. Biosens. Bioelectron. 150, 111860 (2020).

謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所生体分子反応科学研究分野および東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科において行われたものであり、大阪大学 黒田俊一教授、東京農業大学 中山 勉教授、共同研究者の皆様、研究室の方々に深謝申し上げます。