

ノート

動的光散乱装置を用いたバイオセンシングシステムの開発

中川 朋恵*¹⁾ 紋川 亮*¹⁾ 神谷奈津美*²⁾ 角森史昭*³⁾ 鍵 裕之*³⁾

Development of Biosensing System Using Dynamic Light Scattering

Tomoe Nakagawa*¹⁾, Akira Monkawa*¹⁾, Natsumi Kamiya*²⁾, Fumiaki Tsunomori*³⁾, Hiroyuki Kagi*³⁾

キーワード: 動的光散乱, バイオセンシングシステム

Keywords: Dynamic Light Scattering, Biosensing System

1. はじめに

動的光散乱法は、生体高分子やコロイド等、ナノメートルからサブマイクロスケールにわたる幅広い大きさの微粒子の構造を知る上で、非常に有力な手法である。また、非接触かつリアルタイム測定が可能であるという特性を有している。筆者らは、現在、これらの特性を利用したバイオセンサーシステムの開発を目指し、研究を進めている。

市販の動的光散乱装置は、様々な粒子を幅広く測定することを主目的としているため、比較的大型で汎用性の高い仕様となっている。そこで、対象を生体物質に絞って最適化を行い、小型で簡便なバイオセンシングシステムを構築することを最終的な目標とした。その第一歩として本研究では、最適条件の検討を行うための試作機として、希望する条件に合わせて光源、検出角度、検出器、ソフトウェア等を自由にカスタマイズ可能な装置を作製した。また本装置を用いて実際に生体物質であるタンパク質の測定を行い、バイオセンシングへの応用可能性を検討した。

2. 動的散乱測定装置の試作

2.1 動的光散乱測定装置の概要 測定に用いた動的光散乱測定装置は、東京大学鍵研究室と共同で試作した。図1に装置の概略図を示す。レーザー光源は、出力 50 mW、波長 632.8 nm の He-Ne レーザーを用いた。試料セルは、PYREX 製の NMR 管(直径 10 mm)を用いた。散乱光は、直径 150 μ m のピンホールを通し、アバランシェフォトダイオードによって検出した。ピンホール、レンズ、アバランシェフォトダイオードは、同一レールの上に設置し、サンプルホルダーを中心にレールごと回転できるように設計されている。ハードウェアコリレータを用いて、散乱光の自己相関関数および散乱光強度の時間変化を取得した。

2.2 動的光散乱測定装置を用いた粒子サイズの解析 散乱強度データは、500 ms ごとに取り込んだ。得られた自己相関関数は指数関数的な減衰曲線になる。本研究では、得られた減衰曲線をキュムラント法で平均粒子径 d (流体力学的径)および多分散指数を求めた。粒子径分布はヒストグラム法で求めた。

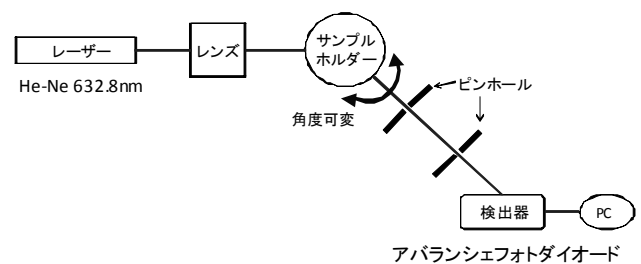


図1. 動的光散乱測定装置の概略図

2.3 装置の性能評価 装置の性能評価には、標準ポリスチレン粒子(Duke Scientific Co.)および α -シクロデキストリン分子(Sigma-Aldrich Co.)を用いた。標準ポリスチレン粒子は、粒子径をそれぞれ 21 ± 1.5 nm, 33 ± 1.4 nm, 40 ± 1.8 nm, 50 ± 2.0 nm, 199 ± 6 nm に調整した球状樹脂である。 α -シクロデキストリンは、分子式 $(C_6H_{10}O_5)_6 = 972.85$ で、外径は約 14.6 Å、高さは約 7 Åで、内部に内径 4.5 Å深さ 6.7 Åの空洞を持ったドーナツ状の構造の分子である。測定により求めた粒子径と実際の粒子径を比較したグラフを図2に示す。このグラフにプロットされたそれぞれのデータは、高い直線性を有しており、試作した装置から得られたデータが実際の粒子径の大きさと高い相関関係があることを示している。さらに、直径約 1.5 nm のシクロデキストリン分子の測定と粒径算出も可能であることを示している。

3. 動的光散乱測定装置を用いた生体物質の測定

3.1 角度依存性 試作された動的光散乱測定装置を用いて粒子径と検出角度の相関関係を明らかにした。散乱強度の角度依存性は、入射光に対し、レールの角度を 30° 、

*¹⁾ バイオ応用技術グループ*²⁾ 防衛大学校*³⁾ 東京大学大学院理学系研究科

60°, 90° と回転させ、タンパク質であるフィブリノーゲンの散乱強度変化を測定した。測定結果を図 3 に示す。得られた自己相関関数は、いずれの測定角度においても指数関数的な減衰曲線になっている。減衰が始まってから完全に減衰するまでの自己相関関数の差は、測定角度が小さくなるにつれ大きくなる。この自己相関関数の差が大きい方が解析精度が高くなるため、フィブリノーゲンの測定には、測定角度が小さい方がより精度の高い粒子径解析が可能である。動的散乱の場合、大きな粒子は小角の散乱光が大きくなり、小さな粒子は広角の散乱光の強度の割合が高くなる。そのため、単一角度的みで測定した場合、誤差が大きくなる可能性がある。そこで、角度を変えて測定することにより、精度の高い粒子径を求めることが可能である。

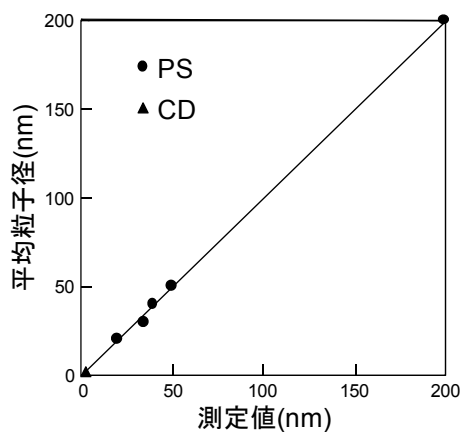


図 2. 測定により求めた粒子径と実際の粒子径の比較

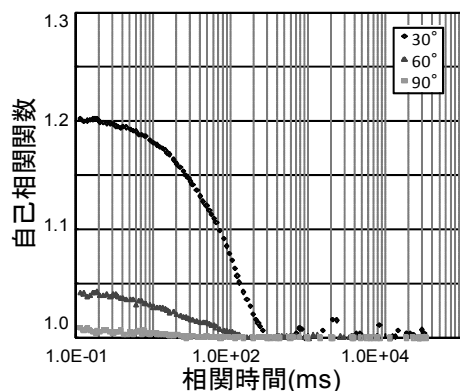


図 3. フィブリノーゲンの粒子径と検出角度の相関関係

3. 2 生体物質の測定 試作した動的散乱測定装置を用いて、本研究の目的である生体物質の検出を試みた。生体物質の測定には、タンパク質である牛血清アルブミンとフィブリノーゲンを用いた。これらのタンパク質は、1 mg/ml の濃度になるよう水に溶解させ、検出角度 30° で測定した。図 4 に測定から求めた牛血清アルブミンとフィブリノーゲンの粒径分布を示す。両者とも、0 nm から 30 nm の間のみ粒径分布のピークが観察された。これは、測定したタンパク質が、凝集していないことを示唆する。測定結果から求めた牛血清アルブミンの粒子サイズは、約 6.9 nm であっ

た。牛血清アルブミンは、分子量 66.5 kDa で主に 3 つのドメインと 6 つのサブドメインから構成されている。溶液中での形状は、楕円体であり、分子サイズは、4.0 nm × 4.0 nm × 14.0 nm⁽¹⁾ である。本結果は、牛血清アルブミンが楕円体であることを考慮すると、実際の分子サイズと一致する。一方、フィブリノーゲンの測定結果は、約 21.7 nm であった。フィブリノーゲンは、分子量 340 kDa で 3 種類、合計 6 本のポリペプチド鎖が連結された直鎖構造を持つ。分子サイズは、約 45 nm × 9.0 nm × 7.0 nm⁽²⁾ であり、分子構造を考慮に入れると、測定値と一致する。

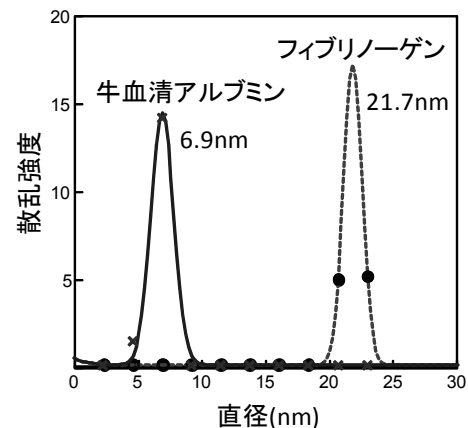


図 4. 牛血清アルブミンとフィブリノーゲンの粒径分布

4. まとめ

本研究では、生体関連分子認識用の測定装置として、検出角度可変機能を付与した動的散乱装置を試作した。角度を変化させつつ、生体物質の最適検出条件を検討した結果、生体物質であるウシ血清アルブミンおよびフィブリノーゲンの検出に成功した。本研究の結果、試作した動的散乱測定装置は、サイズの異なる生体分子の識別が可能である。これは、生体分子の認識に用いられる抗原抗体法により、認識前後の体積変化をモニタリングすることで、目的とする生体物質の有無をセンシングできることを示している。本装置を実際のセンシングに用いるためには、安価にすることが絶対条件である。そのために安価なレーザーや検出器を用いて感度良くセンシングできるシステムの構築が必要である。今後は、試作した装置をもとに、バイオセンシングに特化した低価格な装置へと改良を進め、企業への技術移転を目指す予定である。

(平成 23 年 5 月 23 日受付, 平成 23 年 8 月 4 日再受付)

文 献

- (1) R. J. Rapola and T. A. Horbett, The effects of concentration and adsorption time on the elutability of adsorbed proteins in surfactant solutions of varying structures and concentrations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 136, 480-492 (1990).
- (2) J. H. Brown, N. Volkman, G. Jun, A.H. Henschen-Edman, C. Cohen, The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 85-90 (2000).