イオンビーム照射を用いた生体高分子の結合性に関する研究

氏　　　名	佐藤　一雅
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第９３２号
学位授与の日付	平成１９年３月２２日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第４条第１項）
学位授与の題目	イオンビーム照射を用いた生体高分子の結合性に関する研究
論文審査委員（主査）	山越　憲一（自然科学研究科・教授）
論文審査委員（副主査）	髙田　重男（医学系研究科・教授），清水　宣明（自然計測応用研究センター・教授），田中　志信（自然計測応用研究センター・助教授），鈴木　嘉昭（(独) 理化学研究所・先任研究員）

ABSTRACT

Immobilized proteins on solid surfaces were modified using an ion beam for fabrication of protein chips and biosensors. The ion implantation is a unique method of modifying surface structures and properties of materials. We conducted micro-patterning experiment on the immobilized protein (avidin) on silicon wafer surface by using ion beam irradiation with metal masks. He^+ and Kr^+ ion implantation into the samples were performed. Fluorescently labeled biotin was found to bind only to un-implanted area. Fluorescence study indicated that affinity binding of avidin-biotin was decreased by ion beam irradiation. Surface analysis, SEM, AFM, FT-IR-ATR, Raman spectra and XPS studies indicated that original structure ob biopolymer was destroyed and amorphous carbon was strongly induced. Micro-patterned avidin surface should have utility in a wide variety of applications including DNA, antibody array and protein chips. The technique should be widely applied to other micro-patterned biochips and biosensors.

1. はじめに

DNA、タンパク質などの生体高分子の特異的相互作用を同時並行的に検出、解析するバイオチップは、ポストゲノム時代の生命現象解明に大きな役割を果たすと同時に、テーラーメイド医療やポイントオブケア診断の実現でも期待されている。バイオチップに関連する技術的課題のうち、検出したい生体高分子と特異的相互作用をもつ多種多様なプローブ物質を、ガラスなどの支持体に規則正しく高密度に固定する技術は非常に重要である。支持体表面の状態や固定化された生体高分子の状態を表面処理によって適切に制御できる技術が確立できれば、バイオチップの発展に大きく寄与すると考えられる。イオンビーム照射は、表面改質手段として他にない特徴を有しており、注目すべき技術である。本研究では、このような背景からイオンビーム照射をタンパク質に適用することで、バイオチップなどに応用できる新たな表面改質技術の可能性を探索した。

2. 研究の内容

イオンビーム照射技術は、基質の性質を変化させずに表層部分のみを改質す

る方法で、改質を目的とする材料に、さまざまなイオンを真空中（10^{-4}Pa以下）で数十kVから数MVに加速して添加する方法である。イオンが材料表層に照射された場合、その効果は照射損傷効果、添加効果に大きく二分される。照射損傷効果は標的材料の構造制御に利用され、添加効果は化合物形成などに主に利用されている。基材に高エネルギーで打ち込まれたイオンは原子（核阻止能）および電子（電子阻止能）との衝突を繰り返して、やがて静止する。低エネルギー領域でのイオン注入では、弾性衝突である核衝突機構が主体で原子衝突による原子変位とそれに続く熱緩和過程がエネルギー損失の主因であり、分子鎖の基本骨格には本質的な変化はなく、不純物ドーピングに効果的である。一方、高エネルギー領域では、非弾性衝突である電子励起機構が主体で、イオンと価電子との相互作用によりエネルギーを失う。このエネルギーを失う過程で分子鎖の切断や架橋、分解、炭素化などの高分子の物理的、化学的性質を大きく変える不可逆的変化を引き起こす。イオンビーム照射技術の特色としては、もちいるイオンと対象とする材料の選択の自由度がたかいこと、また、添加するイオンの純度が高く、その侵入の深さや量の制御性に優れていることなどがあげられる。

本研究では、イオンビーム照射の生体高分子、特にタンパク質にあたえる影響を調べ、イオンビーム照射によって生体高分子の結合性が制御できることを検証するため、以下の実験と解析をおこなった。

イオンビーム照射実験には、タンパク質の一種であるアビジンをシリコン基板表面で固定した試料をもちいた。アビジンはビタミンの一種であるビオチンと強力な特異的相互作用をするタンパク質で、本研究ではこのアビジン－ビオチンの結合活性を検討の対象とした。

3. 実験と結果

3.1 微細パターン化

イオンビーム照射による損傷効果によって、タンパク質などの生体高分子を選択的に破壊すれば、基板に固定した生体高分子をパターン化することが可能である。さらに、イオンビームは直進性が非常に高いため、微細なパターンを形成することもできる。以上のことから、バイオチップへの応用を念頭に、タンパク質の一種であるアビジンを固定した基板に、パターン化マスクを用いてイオンビーム照射をおこない、微細パターン化をおこなった。

He^+、Ne^+、Ar^+、Kr^+イオンをアビジン固定シリコン基板に加速エネルギー150keVでパターン化照射した実験の結果、タンパク質へのイオンビーム照射によって、アビジン－ビオチンの特異的結合部位の活性を制御することが可能であることが分かった。この活性を消失させるために必要な照射量は 1×10^{13}ions/cm^{2}程度で、照射時間も数十秒と短時間で済むことがわかった。

3.2 制御性の確認

イオンビーム照射は用いるイオンやエネルギー、照射量を幅広く制御できるため、適切な照射条件を用いれば、タンパク質の基本的な構造には大きな変化

を与えずに、コンフォメーションのわずかな変化だけをもたらすような作用を与えることができると予想される。この予想のもとに、イオンビーム照射によってタンパク質の特異的相互作用の活性の度合いが制御できるかを、アビジン－ビオチン結合について確認した。

He^+、Kr^+イオンをアビジン固定シリコン基板に加速エネルギー150keVで照射線量を 1×10^{11} ions/cm^{2}から 1×10^{15} ions/cm^{2}まで変化させてイオンビーム照射した実験から、イオン種、照射線量によって、アビジン－ビオチンの特異的結合の活性がほとんど変化しない条件から、特異的結合の活性だけが抑えられる条件、さらにアビジンが熱変性する条件までが観察された（Fig. 1)。また、イオン照射量とアビジン分子の基板上の固定密度から見積もったアビジン 1 分子に衝突、通過するイオンの数は、射線量 1×10^{11} ions/cm^{2}のとき約 0.03 個、射線量 1×10^{15} ions/cm^{2}のとき約 300 個と見積もられる。アビジン分子はイオン 1 個が衝突、通過すれば、タンパク質の高次構造に変化を生じて、アビジン－ビオチン結合の活性が消失すると考えられる。以上より、イオンビーム照射の制御によるタンパク質活性の定量的制御が可能であることがわかった。

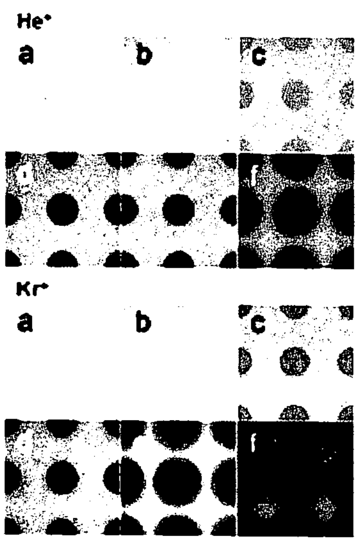

Fig. 1　未照射(a)およびHe^+, Kr^+イオンを加速エネルギー150keV, 1×10^{11}(b), 1×10^{12}(c), 1×10^{13}(d), 1×10^{14}(d), 1×10^{15}(f) ions/cm^{2}で微細パターン化照射した試料の蛍光標識顕微鏡写真

3.3 表面解析

イオンビーム照射されたタンパク質固定基板を、走査電子顕微鏡と原子間力プローブ顕微鏡(AFM)による表面形状の観察、および、接触角測定、赤外分光全反射(FT-IR-ATR)法、ラマン分光法、X 線光電子分光(XPS)法によって解析し、イオンビーム照射の生体高分子にたいする影響を評価した。

He^+、Kr^+イオンをアビジン固定シリコン基板に加速エネルギー150keVでイオンビーム照射し、照射前後の試料表面の状態を表面解析した結果から、アビジンとアビジンを基板に固定するためのシラン層でそれぞれで、高分子構造の分解と炭素化が進行していることが確認された。また、これらの影響によって、表面は疎水化されること、および、表面にナノメートルレベルの形状変化が起きていることが確認された。

4. 考察とまとめ

実験の結果からアビジン固定シリコン基板へのイオンビーム照射では、照射量の増加とともに以下のような過程が進行していると考えられる。

1) イオンの電子阻止能による高分子構造の破壊
照射量の少ない段階では､イオンの電子阻止能による高分子構造の破壊の効果のほうが支配的である。この効果は、アビジンおよび、アビジンをシリコン基板に固定するためのシラン層の双方におよぶ。アビジンにおいては､タンパク質の高次構造が変化し、ビオチンとの特異的結合の活性が消失する。シラン層においてはポリマー架橋が切断されることによって膜構造が脆弱になる。

2) イオンの核阻止能による熱損傷
照射量が増えてくると､イオンの核阻止能による熱緩和過程で生じる熱による損傷効果のほうが支配的になる。この効果は、アビジンおよび､アビジンをシリコン基板に固定するためのシラン層の双方におよぶ。損傷効果によって、アビジン、シラン層ともに炭素化（非晶質カーボン化）する。また､アビジンに含まれる窒素も窒素酸化物（NOx）に変性していく。熱の発生は、アビジンに対してタンパク質の熱変性作用もおよぼし､熱の影響によってもビオチンとの特異的結合の活性が消失する。

以上の結果から、タンパク質固定シリコン基板の微細パターン化は可能で、また、イオンビーム照射のイオン種、加速エネルギー、照射量を適切に制御することで、タンパク質の特異的結合の活性を制御することも可能なことが確認できた。

本研究の結果は、イオンビーム照射によって生体高分子の結合性が制御できることをしめしており、イオンビーム照射によって微細パターン化したアビジン固定シリコン基板の表面が、アビジンービオチン複合体を利用したバイオチップに応用可能であることを示唆している。また、アビジン以外のタンパク質やその他の生体高分子に対しても、イオンビーム照射によって、それらの相互作用を制御できる可能性が非常に高い。本研究の成果によって、これまで主に化学的方法に頼っていたバイオチップにおける表面処理に、より制御性と再現性のある物理的な手法が導入できたことは、より高機能なバイオチップが開発できる可能性を期待させるものである。

学位論文審査結果の要旨

平成１９年２月２日に第１回学位論文審査委員会を開催し、提出された学位論文及び関係資料について詳細に検討した。更に平成１９年２月２日に行われた口頭発表後、第２回学位論文審査委員会を開催し、慎重に協議した結果、以下の通り判定した。

本論文は、DNA チップやタンパクチップと呼ばれる生体高分子の特異的相互作用を検出するバイオチップの製作において、支持体表面に固定化された生体高分子の状態を表面処理によって適切に制御できる技術を確立することを目的とし、イオンビーム照射技術を表面改質手法として用いて、生体高分子の結合性を制御しようと試みた研究である。従来の化学的表面処理は、生体高分子を支持体に固定することが主な目的であり、再現性にも問題が残されていた。そこで、制御性や再現性に優れているイオンビーム照射をタンパク質を固定した基板に行うという新たな手法を提案し、実験により基板の微細パターン化が可能であり、タンパク質の特異的相互作用の度合いが制御できることを確認している。さらに、さまざまな表面解析によって試料表面の状態変化を解析し、生体高分子にイオンビーム照射を行った場合の影響を詳細に評価している。

以上のように、本研究は近年注目されているバイオチップに対する機能性の付与と制御性に優れた新たな表面改質手法を開発したものであり、生命工学、医療の分野に多大に寄与できるものである。よって、本論文は博士（学術）に値するものと判定する。