

表面プラズモン共鳴イメージング (SPRi) を 利用したバイオマーカーの検出

Biomarker Discovery using Surface Plasmon Resonance Imaging

Elodie LY-MORIN

Sophie BELLON

Géraldine MÉLIZZI

Chiraz FRYDMAN

翻訳

野口 慎太郎

Shintaro NOGUCHI

表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) とは、分子間の相互作用 (結合) をラベルフリーで観察できる原理である。この原理を用いることにより、分子間相互作用の動的プロセス (結合定数および解離定数)、結合親和性、分析対象の濃度に関する情報を得ることができる。本論文では、ハイスループット測定のための SPR イメージング (SPRi) の原理とその応用例として乳癌のバイオマーカーとなる可能性のある物質の検出および特性把握について説明する。

Surface Plasmon Resonance (SPR) is an optical technique used to follow molecular interactions (binding) in real time without labeling. It provides information on kinetic processes (association and dissociation rates), binding affinity, analyte concentration and real time molecule detection. This article describes the principle of SPR imaging for high-throughput measurements. An example of a clinical application for the capture and characterization of a potential biomarker of breast cancer is illustrated.

はじめに

表面プラズモン共鳴 (SPR) は、生体分子の相互作用をリアルタイムで観察する目的で活用されている原理である。その原理は、プリズム表面に金薄膜を蒸着したセンサー (バイオチップ) 上に、固定化されている分子 (リガンド) とバイオチップ表面を通過する分子 (アナライト) が、相互作用することによって生じる、バイオチップ表面近傍の屈折率の変化を検出することである。分子間相互作用を蛍光プローブ等のラベルなしで、追跡することができる特徴を持つ。また、リアルタイムに相互作用を観察することによって、各種パラメーター (結合定数、解離定数、親和性/結合活性など) の評価が可能になる。

表面プラズモン共鳴の物理的原理

SPRを理解するには、まず最初に、エバネッセント波の概念を知る必要がある。ここで、2種類の媒質1と2の界面を考え、媒質1の屈折率を n_1 、媒質2の屈折率を n_2 ($n_1 > n_2$) とする。ここに媒質1側から光が入射した場合、入射角が臨界角よりも大きいと、入射光は媒質1と2の界面で全反射し、媒質2の表面に、電磁波であるエバネッセント波が発生する。エバネッセント波は、その強度が界面までの距離に対して指数関数的に減衰する非伝搬波であり、界面近傍 (入射光の波長程度の範囲) にのみ留まるため、屈折率、膜厚、または

表面での分子吸着の変化など、媒質の境界面で発生する物理現象をリアルタイムに測定する有効なツールとなる。ガラスと液体の間に金の薄膜層があると、金の表面プラズモン (= 電子の集団振動) が光に強く反応し、表面プラズモン波を発生する。表面プラズモンは、光が全反射する状況では、エバネッセント波と組み合わせり共鳴する。表面プラズモンの共鳴に至る条件は、入射光の波長、偏光状態、入射角により異なり、金属層の特性および表面の上にある媒質によっても異なる。

SPR信号測定の仕組み

Figure 1に示すように、バイオチップ下部のプリズム部分に (臨界角以上の範囲で) 入射角を変えながら光を照射し、反射光の強度を測定すると強度が最小になるポイントが見られる。この曲線はプラズモン曲線と呼ばれ、強度が最も小さくなる角度は共鳴角度 (Resonance Angle) と呼ばれている。

共鳴角度は表面の金属およびそこに固定化された物質 (リガンド) に固有のもので、バイオチップ上のリガンドを変える、またはリガンドと他の分子が結合するなどの変化によって屈折率、プラズモン曲線が変化し、それに伴い共鳴角度も変化する。プラズモン曲線や共鳴角度の変化を経時的に検出することによって、金表面で生じる物理化学的変

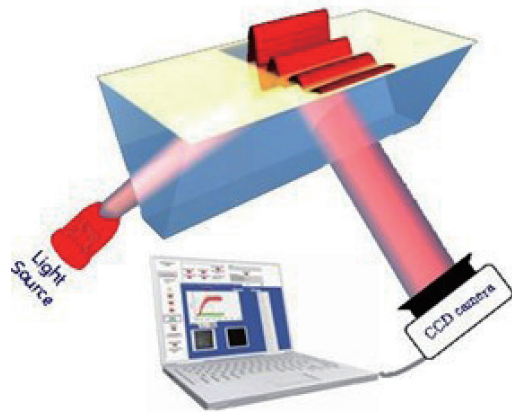


Figure 1 バイオチップの概略図とプラズモン曲線

化, 例えば, 分子間相互作用をリアルタイムでモニタリングすることができる。SPRを利用するバイオセンサーが信号として用いている物理量は, 以下のいずれかである。

- 共鳴角度の値の時間による変化($\Delta \theta$)
- 特定の角度における反射率の時間による変化(ΔR)

後述するHORIBA Jobin Yvon社製のOpenPlexは ΔR を信号として用いている。

表面プラズモン共鳴イメージング法と装置構成, 測定の流れ

HORIBA Jobin Yvon社製のOpenPlexは, SPRにイメージング機能を加えたもので, SPRイメージング(SPRi)法と呼ばれる原理に基づくものである。本装置は, ラベルフリーで生体分子間相互作用を検出できるSPRの長所に, マイクロアレイが持つハイスループットな処理能力(同時多検体測定: Multiplex)を一体化し, さらに, 個々の相互作用を可視化できるイメージング機能まで付加したものである。装置の構成概略をFigure 2に示す。

バイオチップはプリズム結合型(Figure 1)のものをを用いており, 入射光(平行光)はプリズムを通過してチップ表面全体に照射され, 反射した光はCCD検出器で検出される。CCD

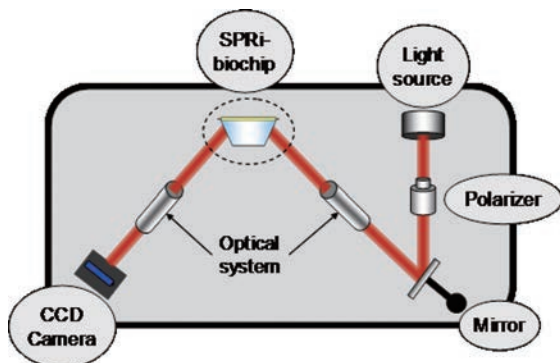
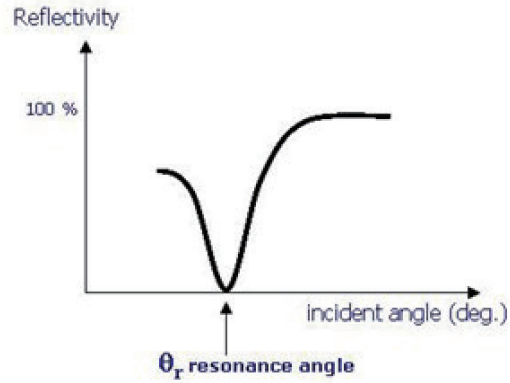


Figure 2 SPRiシステムの構成



の各ピクセルはチップ上の所定の位置に対応しており, 2Dスキャンは不要である。本装置では, 数十から数百の相互作用を同時に検出することが可能で, それらは相互作用した部分だけが明るく変化した画像として観察される。(Figure 3の4段目)

また, 可動部は走査ミラーのみという独自の光学構成によってシンプルな構成と精密なイメージング機能を両立している。(走査ミラーを動作させて入射角を変え, プラズモン曲線を得る。)測定時には得られたプラズモン曲線から作用角(Working Angle)と呼ばれる角度(Figure 3の2段目)を設定する。本装置では, 同時多検体測定を実現するため, 特定の角度における反射率の時間変化(ΔR)を信号としており, 作用角はプラズモン曲線の変化が最大になる角度を選択することによって高感度に相互作用を測定することができる。

以下に測定のフローを示す(Figure 3のA~D)。

- ステップA: バイオチップ表面にリガンドを固定化する。
- ステップB: アナライトがフローセルに入ると分子の結合が起こる。これにより, プラズモン曲線の変化と反射率の変動が起こる。反応速度曲線は, 時間により変化する反射率の変動を示している。この現象は画像としても観察でき, 明るいスポット(Figure 3の4段目)はバイオチップ上で相互作用している領域を示している。
- ステップC: アナライトがフローセルから出ると, 相互作用していたアナライトが解離する。これにより, 再びプラズモン曲線の変化と反射率の変動が起こる。この際の画像では明るいスポットが暗くなるのが観察される。
- ステップD: アナライトが完全に解離する(再生溶液を使用する場合もある)と, プラズモン曲線および反応速度曲線は元の状態へ戻り, 画像も再びもとの暗い状態に戻る。

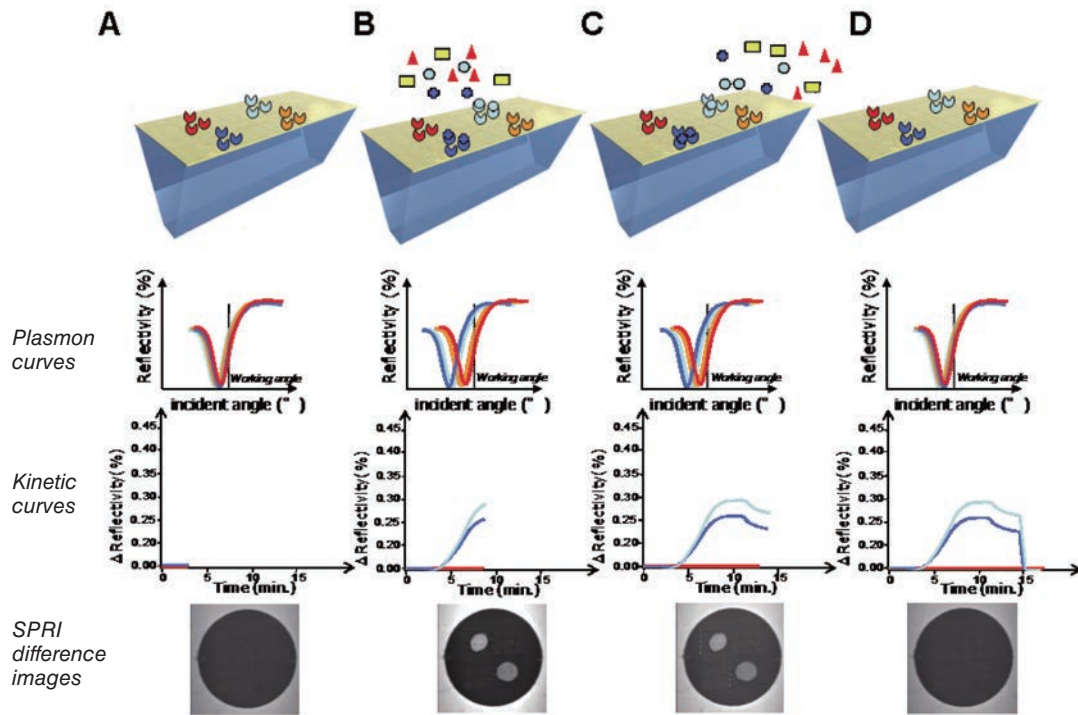


Figure 3 SPRiによる生体分子の相互作用のモニタリング

OpenPlexと質量分析計のカップリング

SPRバイオセンサーとマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)を一体化することは、生物体液中のバイオマーカー検出における革新的なアプローチの一つと考えられる。これにより、SPR法で捕捉された分析物を同定し、その分子量とペプチド配列から、特性を把握することができる。SPR-MSは、対象となるタンパク質の検出、定量、構造特性把握に関する、新たな手段を提供するものである。将来的には、同種のバイオマーカー内でのさらに、細かな種類を見極めることに役立つ可能性がある。しかし、既存のSPR装置には、多くの場合、ESI-MS(エレクトロスプレーイオン化質量分析)またはMALDI-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析)と組み合わせるには多くの課題があった。その課題とは、分析時間が長い、同時多検体測定ができない、試料溶出時の汚染、感度低下といったものである^[1]。これらの欠点のため、診断分野におけるSPR-MSの開発は遅れていた。それらの課題を解決し、SPR-MSという革新的な組合せを実現するため、OpenPlexはバイオスライド(SPRi-Slide™)を用いることによって、相互作用している物質を溶出することなく、そのまま簡単にスライド上で酵素分解、マトリックス付加して質量分析計へ導入できるように工夫されている(Figure 4)。

以下にスライド(SPRi-Slide™)上で直接MS分析を行った例^[2]を説明する。

バイオマーカーの捕捉と同定

SPRiとMSイメージングの一体化の有用性検証のため、組換え型タンパク質LAG3を血漿内で検出することに取り組んだ。LAG3は乳癌のバイオマーカーである可能性のある蛋白質である^[3]。バイオスライド(SPRi-Slide™)はLAG3に対するマウス抗体(IgG2A)を質量分析専用の表面化学反応(NHS反応)により固定化した後、非特異的結合を防ぐため、表面をラット血清アルブミン(RSA)を用いて飽和化(Saturation)したものをを用いた。アナライト溶液は血漿中にLAG3を添加した溶液を用い、IgG2Aとの特異的結合を検出し、イメージング画像も合わせて得た。SPRi法により、数フェムトモル/mm²のLAG3タンパク質が捕捉された。このバイオスライド上で酵素分解およびマトリックス付加した後、MALDI-MS Imager (Bruker Daltonics社製 Ultraflex)を用いて分析し、LAG3およびRSAのMSピークの分布を示すことにより、SPRi-Slide™上の検体に対して直接LAG3スポットのMS画像を作成することができた(Figure 5)。

この応用例は、SPRイメージングとMSイメージング(MSi)を一体化する技術の先駆となるものである。これは、臨床的バイオマーカーの捕捉、配列、分子量に関する空間分解情報が得られる可能性を示唆している。

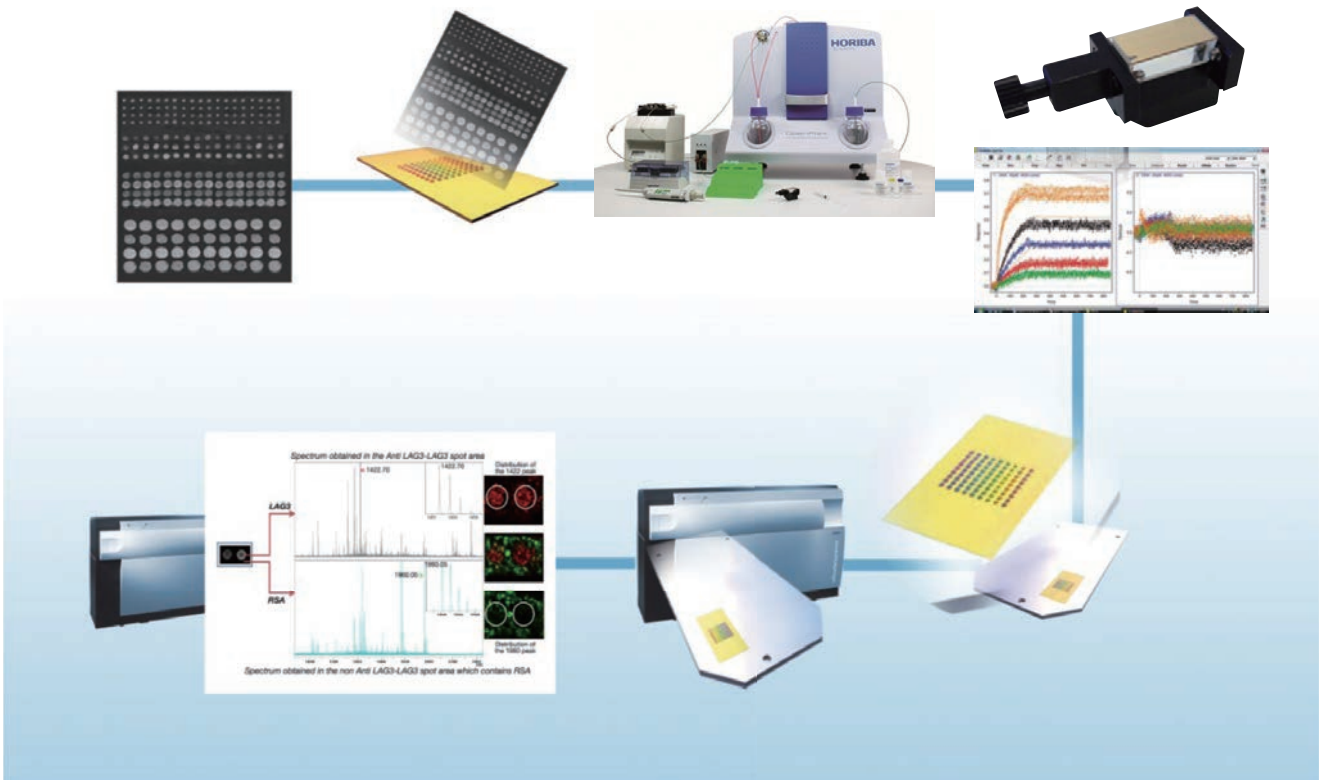


Figure 4 SPRIとMALDI-MSの一体化

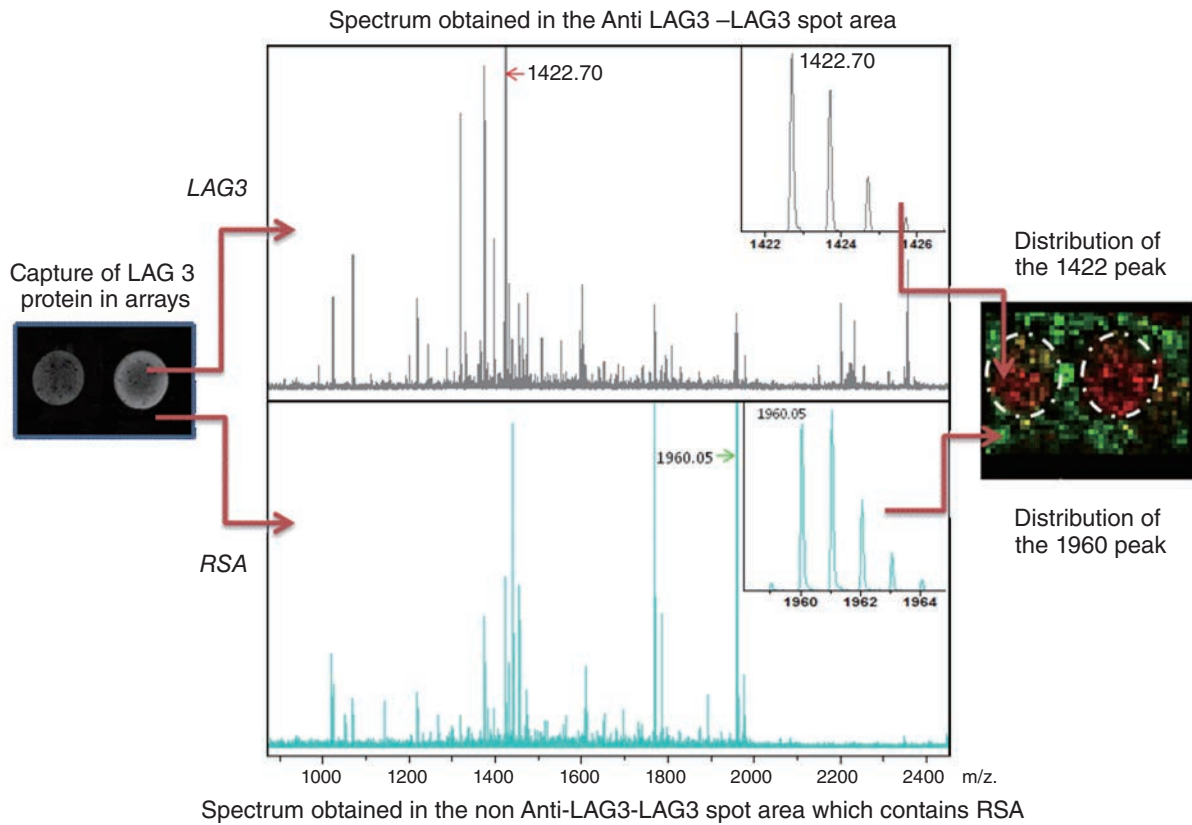


Figure 5 ヒト血漿中(範囲: 10 nM)でのLAG3タンパク質(乳癌マーカーである可能性がある)のチップ上での検出, 同定, イメージング

おわりに

OpenPlexを使用することによって、最大数百の分子間相互作用をラベルフリーで高感度にハイスループットで検出できる。これは、ワークフローの高速化、最適化プロセス(スクリーニング)におけるランニングコスト削減につながることを意味している。また、設計上のフレキシビリティが高く、容易に質量分析計など他原理の装置と組合せることができる。今回示した質量分析計との組合せ例は、その特徴を顕著に示すアプリケーションであり、バイオマーカー同定の有効なツールとなる可能性を示唆している。

参考文献

- [1] Boireau and al.(2009)Revisited BIA-MS combination: Entire "on-a-chip" processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosensors and Bioelectronics* 24: 1121-1127
- [2] Bellon and al (2009)Hyphenation of Surface Plasmon Resonance Imaging to Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry by On-Chip Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Anal. Chem.* 81: 7695-7702
- [3] Triebel and al(2006)A soluble lymphocyte activation gene-3 (sLAG-3)protein as a prognostic factor in human breast cancer expressing estrogen or progesterone receptors. *Cancer Letters.* 235(1):147-53.



Elodie LY-MORIN

Bio Sales Engineer
HORIBA Jobin Yvon SAS
Ph. D



Sophie BELLON

Bio Application Lab Manager
HORIBA Jobin Yvon SAS
Ph. D



Géraldine MÉLIZZI

R&D Project Manager
HORIBA Jobin Yvon SAS



Chiraz FRYDMAN

Product Manager
HORIBA Jobin Yvon SAS
Ph. D

翻訳

野口 慎太郎

Shintaro NOGUCHI

株式会社 堀場製作所
開発本部 先行開発センター