

バイオナノカプセルを用いたセンシング分子整列化技術 によるバイオセンシングの高感度化

飯嶋 益巳・黒田 俊一*

名古屋大学大学院生命農学研究科（現在 大阪大学産業科学研究所）

（2015年1月15日受付 2015年3月23日受理）

Bio-nanocapsule-based scaffold for biosensing molecules: enhancement of sensitivity by the clustering and oriented immobilization of sensing molecules

Masumi Iijima, Shun'ichi Kuroda* (*Department of Bioengineering Sciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa, Nagoya, Aichi, 464-8601 Japan*) *Seibutsu-kogaku* **93**: 248–258, 2015.

Biosensing is a state-of-the-art sensing technique that detects the interactions between biomolecules, such as antigen-antibody, ligand-receptor, and sugar chain-lectin interactions. Since the target analytes are often of higher molecular mass and their binding affinities are sometimes weak, the sensing molecules on biosensing probes should be sensitized as much as possible by displaying them in a close-packing manner and reducing steric hindrance around the analyte-binding site. It is thus believed both clustering and oriented immobilization of sensing molecules on biosensing probes are important for enhancing the sensitivity and specificity of probes. Conventionally, sensing molecules have clustered onto solid phases (*e.g.*, gold, silver, carbon nanotubes, liposomes) with scaffolds (*e.g.*, linkers, self-assembled monolayers, protein A, avidin) to improve biosensing probes. However, neither of these strategies has yet accomplished both clustering and oriented immobilization of sensing molecules. Recently, we have developed bio-nanocapsules (ZZ-BNC) of ~30-nm diameter, which display ~120 molecules of a tandem form of immunoglobulin (Ig) G Fc-binding Z domains derived from *Staphylococcus aureus* protein A, that serve as a scaffold for the clustering and oriented immobilization of IgGs and Fc-fused biosensing molecules. Here, we describe the molecular basis of ZZ-BNC-based technology, and introduce the versatility of this technology not only in immunosensors but also in other biosensors.

[**Key words**: Bio-nanocapsule, scaffold, biosensing, oriented immobilization, clustering]

はじめに

バイオセンシングは、生体分子間相互作用（例：抗体と抗原，受容体とリガンド，DNA結合タンパク質とDNAなど）を特異的に検出する技術¹⁻⁶⁾であり，医療・臨床検査，創薬，食品，環境，セキュリティなどの生命科学分野においてきわめて重要である。まず，固相上の標的物を検出・定量する液相用バイオセンシング素子

においては，センシング分子と標識物を結合し，標的物との相互作用を，発色・発光・蛍光・放射などのシグナルに変換する。次に，液相中の標的物を検出・定量する固相用バイオセンシング素子においては，固相の素子表面⁴⁻¹⁴⁾にセンシング分子を直接¹⁵⁾または足場分子¹⁶⁻²²⁾を介して固定し，標的物との相互作用を，発色・発光・蛍光・放射などのシグナルや，重量の変化，プラズモン波・エバネッセント波の発生などを電気信号に変換する

*連絡先 E-mail: skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp

(Fig. 1A上段, Table 1). そこで, 両バイオセンシング素子の感度, 特異性, ダイナミックレンジなどを向上させるためには, センシング分子と標的物が効率良く結合できるように, センシング分子をクラスター化しつつ, その配向性をナノレベルで制御して精密提示する「クラスター化とナノレベル整列化」技術の開発が重要な鍵となる²³⁾ (Fig. 1A下段).

従来のセンシング分子固定化技術

本稿では, 抗原検出のためのイムノグロブリン (immunoglobulin (Ig)) G固定化技術を例にとりながら, 従来法と比較しつつセンシング分子のクラスター化と整列化によるバイオセンシングの高感度化について概説する. IgGの構造は, 2本の重鎖 (H鎖) と2本の軽鎖 (L鎖) がジスルフィド結合してY字型の4量体を形成し, N末端部分に抗原結合部位 (Fv) をもつ上部のFab領域と下部のFc領域から構成される (Fig. 1B). また, アミノ酸配列が高い相同性を示す定常部位 (constant region (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) と, 相同性が低い可変部位 (variable region (V_H, V_L)) が存在し, C_{H2}部位に糖鎖をもつ. もっとも単純なIgGの固定化法は, IgGを直接固相上に添加し物理的吸着力 (ファンデルワールス力, 親・疎水性, 電荷など) によるものである¹⁵⁾. 本法は, IgGを未修飾のまま用いることができるが, IgGが非特異的に固定されるため配向性がランダムになりFvの標的物の認識能を十分に引き出せない. そこで, 固相上にIgGをクラスター化ならびに配向性を揃えて整列化して固定し, Fv周辺の立体障害を低減する足場技術が報告されている²³⁾.

まず, IgG全長を用いる方法として, IgG表面のフリーのNH₂基^{16-19,24,25)}, IgGのフリーのCOOH基^{26,27)}, IgGの糖鎖 (活性化した後)^{28,29)}, またはIgGのFc領域^{20-22,30-34)}をさまざまな足場分子を介して各種固相上に固定化する方法がある (Fig. 2). また, IgGをペプシンや還元剤 (2-メルカプトエタノールアミン) で断片化し

たFab^{35,36)}およびHalf IgGのSH基^{37,38)}や, 遺伝子組換え技術による単鎖抗体 (single-chain (sc) Fv) のカルボキシ末端³⁹⁻⁴⁴⁾, ラクダ科重鎖抗体の重鎖可変ドメイン

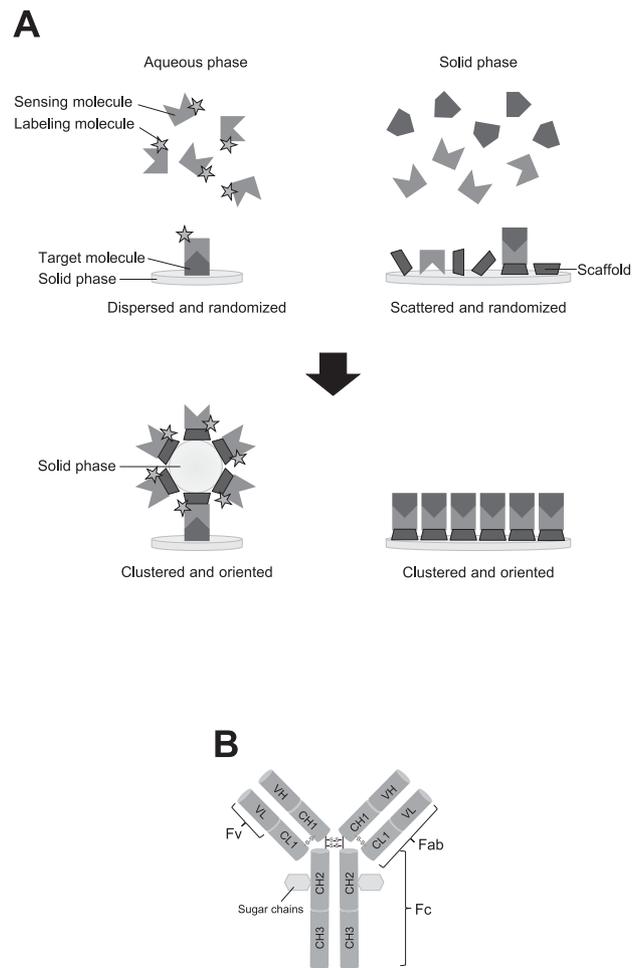


Fig. 1. (A) Effect of randomized (upper panels) or oriented (lower panels) immobilization of sensing molecules on the recognition of target molecules. Sensing molecules in aqueous phase for detecting target molecules on solid phase were indicated (left panels). Sensing molecules on solid phase for detecting target molecules in aqueous phase were indicated (right panels). (B) Y-shaped structure of IgG.

Table 1. Elements of biosensing techniques

Detection systems	Solid phases	Scaffolds	Sensing molecules	Target molecules
ELISA ¹⁾	Gold ⁴⁻⁷⁾	Cross-linkers ¹⁶⁾	IgGs	Antigens
FIA ²⁾	Silver ⁸⁾	SAMs ¹⁷⁾	Receptors	Ligands
RIA ³⁾	Semiconductor ⁹⁾	Streptavidin ¹⁸⁾	DNA-binding proteins	DNA
QCM ⁴⁾	Carbon nanotube ¹⁰⁾	DNA structures ¹⁹⁾	Aptamers	DNA/RNA
SPR ⁵⁾	Silica ^{11,12)}	Protein A ²⁰⁾	Sugars	Lectins
Ellipsometry ⁶⁾	Liposome ¹³⁾	Protein G ²¹⁾	Lectins	Sugars
	Glass ¹⁴⁾	IgG-Fc-binding peptide ²²⁾	Enzymes	Substrates

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FIA, fluoroimmunoassay; RIA, radioimmunoassay; QCM, quartz crystal microbalance; SPR, surface plasmon resonance; SAMs, self-assembled monolayers; IgGs, immunoglobulin Gs.

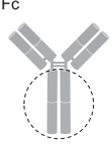
IgGs	Tethering point within IgGs	Linkers/Scaffolds	Solid phase
Intact IgG	Free NH ₂ 	Tos-linker- Glutaraldehyde-Polyethyleneimine- NHS-SAM-SH- NHS-biotin-Streptavidin-biotin-SAM-SH- NHS-maleimide-SH-ssDNA/ssDNA-SH- (Acid treatment)-NHS-Carbodiimide-	SiO ₂ ¹⁶⁾ Au ²⁴⁾ Au ¹⁷⁾ Au ¹⁸⁾ SAM/Au ¹⁹⁾ COOH-CNT/Au ²⁵⁾
	Free COOH 	(CPY)-Isobutyl Cys ester- Carbodiimide-NHS-Cysteamine-	Au ²⁶⁾ Au ²⁷⁾
	Sugar chain 	(Sodium periodate)-Hydrazide-linker- (Boronic acid)-NHS-linker-	Agarose ²⁸⁾ Au ²⁹⁾
	Fc 	Protein A- Protein A-linker- Protein G-NHS-Carbodiimide/COOH-Dex- α -Fc-peptide-NHS-SAM-SH- Protein A- α -Au peptide fused Protein G-Cys fused- ZZ- α -PS peptide- ZZ-OmpA/PEG-SH-	Au ³⁰⁾ Sephacrose ²⁰⁾ Au ²¹⁾ Au ²²⁾ Au ³¹⁾ Au ³²⁾ Hydrophilic-PS ³³⁾ Au ³⁴⁾
Fab'	SH 	- Maleimide-linker-	Au ³⁵⁾ Sephacrose ³⁶⁾
Half Ab fragment	SH 	- Maleimide-SAM-SH-	Au ³⁷⁾ Au ³⁸⁾
scFv	COOH-terminus 	Cys-fused- His-tag-fused-Ni ²⁺ /Nitrilotriacetic acid-linker- Arg-tag-fused-Negatively charged SAM-SH- Cutinase-GS linker-fused-Phosphonate and triethyleneglycol-SAM-SH- α -PS-peptide-fused- (2Lys on rodent V _L C)-NHS-biotin-Neutravidin-	Au ³⁹⁾ Au ⁴⁰⁾ Au ⁴¹⁾ Au ⁴²⁾ PS (O ₂ plasma treated) ⁴³⁾ Au ⁴⁴⁾
VHH	Free NH ₂ 	NHS-SAM-SH-	Au ⁴⁵⁾

Fig. 2. Strategies for IgG immobilization on solid phase. scFv, single-chain Fv; VHH, *Camelidae*-derived single variable domain of heavy chain of heavy chain of antibody; Tos, tosyl group; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; SAM, self-assembled monolayer; Dex, dextran; ssDNA, single strand DNA; CPY, carboxypeptidase Y; α -Fc-peptide, Fc-recognizable peptide; α -Au peptide, gold binding polypeptide; ZZ, two Fc-binding Z domains of *Staphylococcus aureus* protein A; α -PS peptide, polystyrene-binding peptide; OmpA, transmembrane domain of outer membrane protein A; PEG, polyethylene glycol; GS, glycine-serine; CNT, carbon nanotube; PS, polystyrene.

(*Camelidae*-derived single variable domain of heavy chain of heavy chain of antibody (VHH)) のフリーの NH₂基⁴⁵⁾を固定化する方法がある。しかしながら、IgG の抗原認識能を最大限に引き出すためには、未修飾の IgG を用いて、同時に固定部位を IgG 分子内の一箇所に限定する必要があるため、上述の IgG 固定化法のほとんどは不適格である。

次に、足場分子としては、簡便なクロスリンカーがあるが、IgG 結合部位の空間的配置が定まらず、IgG の配

向性がランダムになるため、Fv 周辺の立体障害が生じ抗原結合能が低減する。また、自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer (SAM)) は、自己組織化能を持ち二次元展開が可能で物理的安定性は高いが、一般的に IgG 結合に化学修飾を必要とする点が課題である。一方、Fc 結合タンパク質およびペプチドを用いて固定化する方法は、IgG を未修飾のまま固定化することができるが、ほとんどの場合、足場分子 (Fc 結合タンパク質およびペプチド) 自身の配向性を制御することが困難

であるため、完全な整列化を達成できない。以上から、IgGのクラスター化およびナノレベル整列化を同時に達成できるもっとも理想的な足場分子は、①完全長・未修飾IgGの一箇所と特異的に結合し、②IgG結合部位を整列提示し、③IgG結合部位が最密充填状態で存在し、④化学的・物理的ストレスに対して耐性であることが重要と考えられた。そのような中で、近年、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance (SPR)) の金基板上に、thioPEG (1-mercaptoundec-11-yltriethylene glycol) で人工膜を形成し、ZZctOmpA (黄色ブドウ球菌 Protein A由来IgG-Fc結合Zドメインを融合した膜タンパク質) を埋め込んで抗ヒト血清アルブミンIgGを固定化し、ヒト血清アルブミンを検出する方法が報告されたが³⁴⁾、上記条件をすべて満たすものではなかった。

バイオナノカプセル (BNC)

B型肝炎ウイルスの表面抗原Lタンパク質 (389アミノ酸 (aa)) は、N末端側よりPre-S1領域 (108 aa)、Pre-S2領域 (55 aa)、およびS領域 (226 aa) から構成され (Fig. 3A)、出芽酵母内でLタンパク質を過剰発現させて得られる直径約30 nmの中空ナノ粒子「バイオナノカプセル (bio-nanocapsule (BNC))」は、3回膜貫通型のLタンパク質約110分子が酵母小胞体膜由来リポソームに埋め込まれたプロテオリポソームである⁴⁶⁾。BNCは、エレクトロポレーション法⁴⁷⁾およびリポソーム融合法^{48,49)}によりさまざまな物質 (薬剤、遺伝子、タンパク質、化学物質など) をBNC内部に搭載可能で、Lタンパク質のPre-S1領域に存在するヒト肝臓認識部位により⁵⁰⁾、*in vitro*および*in vivo*においてヒト肝臓由来細胞または組織に物質を送達できるナノキャリアである⁴⁷⁾。近年、我々はPre-S1領域およびPre-S2領域の一部 (51-159 aa) を、Protein AのIgG-Fc結合Zドメイン (2量体 (127 aa))⁵¹⁾に置換したZZ-Lタンパク質を作製し、出芽酵母内でBNCと同様にZZタグ提示型BNC (ZZ-BNC) を発現させた^{52,53)} (Fig. 3A)。同発現酵母菌体をガラスビーズにより破砕し、抽出液を70°Cで20分間熱処理して酵母由来タンパク質を除去した後、ブタIgGアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製ZZ-BNCを得ることができた⁵⁴⁾。ZZ-BNCは一粒子あたり約120分子のZZドメインを提示しており (Fig. 3A)⁵⁴⁾、抗上皮増殖成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor (EGFR)) IgG^{52,53)}および抗CD11c IgG⁵⁵⁾をZZドメインを介してZZ-BNC上に提示することで、各種物質 (蛍光、GFP、抗原) を*in vivo*において、それぞれEGFR過剰発現組織および免疫樹状細胞へ特異的に送達することに成功した。

以上から、ZZ-BNCは粒子表層でFc部位をつなぎ止め、Fvを放射状に整列化して提示できると考えた。そこで、ZZ-BNCと各種IgGとの結合能を水晶発振子微量天秤 (quartz crystal microbalance (QCM)) により測定した結果、ZZ-BNCはセンサーチップの金基板上に約0.36 pmol/cm² (ZZ-Lタンパク質として約45 pmol/cm²) 吸着し (Fig. 3B)、ZZ-Lタンパク質1分子あたり、最大で約0.5分子の Maus 全IgGと結合することを見いだした (約60分子/ZZ-BNC 1粒子)⁵⁴⁾ (Fig. 3C)。また、ZZ-BNCとさまざまな動物種由来のIgGとの結合特性は、Protein Aと類似していた⁵⁶⁾。次に、マイカ上に固定したZZ-BNCを高速原子間力顕微鏡 (high-speed atomic force microscopy (HS-AFM))⁵⁷⁾を用いて液中観察すると、ZZ-BNCはドーム状構造を維持して存在し、半球状にZZ-Lタンパク質2量体 (直径約6 nm) 約27分子 (単量体約54分子) が間隔約2 nmを保ちながら最密充填していることを見いだした⁵⁸⁾ (Fig. 3D)。その結果、液相中のZZ-BNC 1粒子には、ZZ-Lタンパク質2量体約54分子 (単量体約108分子) が存在し、IgGが最大約216分子結合可能と見積もられた。一方、ZZ-BNCの表面積を Maus IgG3のFc領域の断面積で除すると約197分子の Maus IgG3が最密充填状態で提示可能と見積もられ、前述のZZドメイン数と考え合わせると、ZZ-BNCは理想的な足場分子と考えられた。しかし実際はZZ-BNC 1粒子が Maus 全IgGを最大で約60分子提示したことから、ブラウン運動をするIgG同士がぶつかり合ってZZ-BNC表層の全ZZドメインと相互作用できなかったことを示唆している。そのような中でも、ZZ-BNC上にFc領域を介して提示されたIgGは、抗原結合部位 (Fv領域) 周辺の立体障害は十分に低減されていると考えられた。実際に、金基板上に固定したZZ-BNCと Maus IgG3の液中での結合様式をHS-AFMによりタイムラプス観察したところ、予想通りIgG3がZZ-BNC上でFc領域を支点として回転ブラウン運動を行っていることが判明した (平均速度0.92 nm/秒、最大角度44°) (Fig. 3E)。以上から、我々はZZ-BNCがFc部位を非常に強固な力をつなぎ止め、Fv領域を放射状に整列化提示する足場分子であることを実証した。そこで、我々はZZ-BNCが各種バイオアッセイやバイオセンサーにおいて、①液相中のZZ-BNCによるIgGのクラスター化とナノレベル整列化、②固相上のZZ-BNCによるIgGのクラスター化およびナノレベル整列化、③固相上IgGの配向性評価を実現するユニークなバイオマテリアルであることを見いだしたので、次項以降に概説する (Fig. 4)。

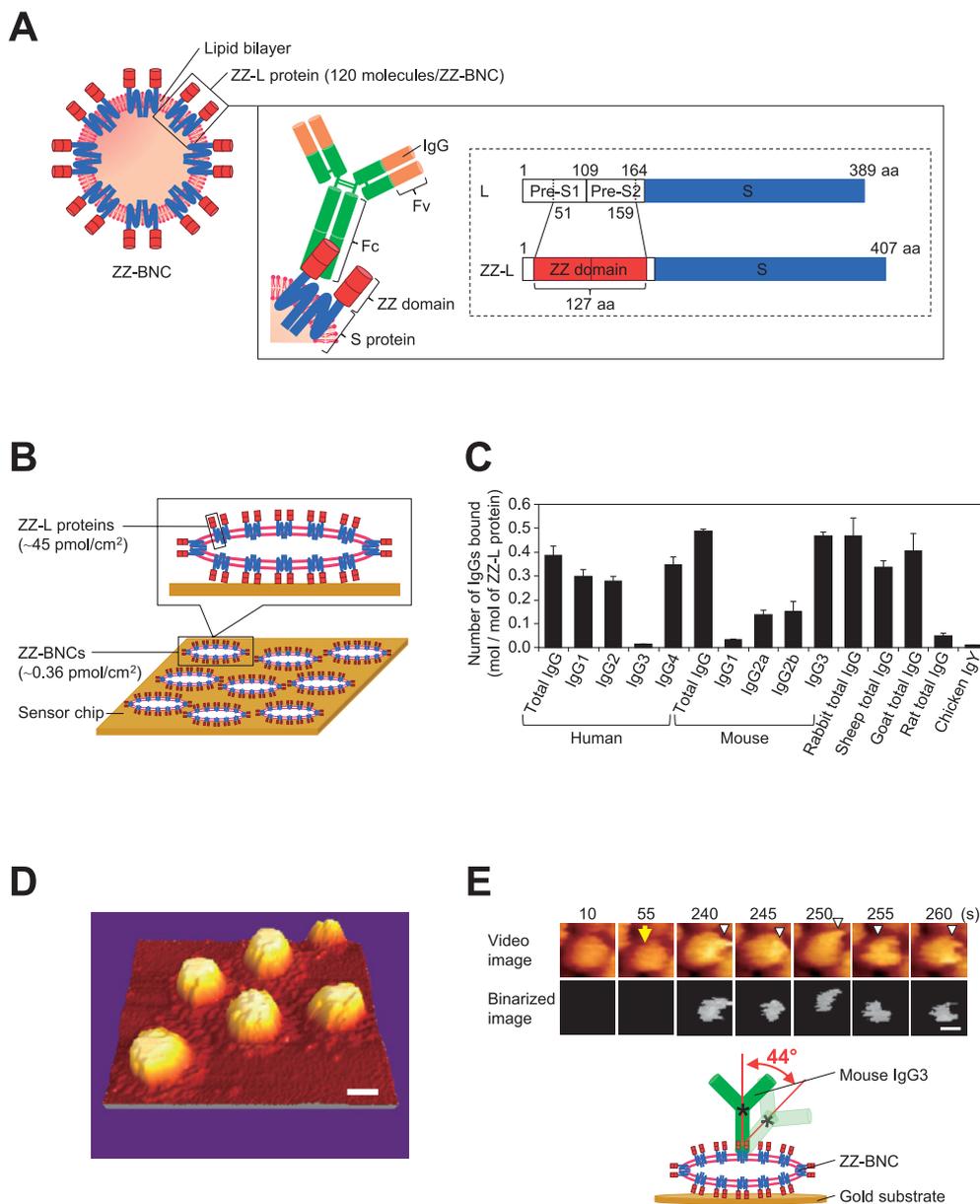


Fig. 3. Structure and properties of ZZ-BNCs. (A) Capsular structure of ZZ-BNC. Each ZZ-BNC particle consisted of ~120 ZZ-L proteins embedded in a liposome. The ZZ domain and S protein were necessary for interaction with the IgG-Fc region and particle formation, respectively. Schematic structure of original L protein and ZZ-L protein are indicated in dashed line box. (B) Schema of ZZ-BNCs and ZZ-L proteins on gold surface of sensor chip. The number of molecules of ZZ-BNCs (~0.36 pmol/cm²) and ZZ-L proteins (~45 pmol/cm²) are estimated by QCM analyses. (C) Binding capacity of the ZZ-L protein to various IgGs determined using a QCM. Results are given as means \pm SD ($n = 3$). (D) HS-AFM image of ZZ-BNCs on mica surfaces. Bar, 20 nm. (E) HS-AFM analyses of mouse IgG3 on ZZ-BNC in solution. Video images and binarized video images of the movement of mouse IgG3 on ZZ-BNC (upper panels). Yellow arrow, the addition of mouse IgG3. The locations where mouse IgG3 appeared are indicated by white arrowheads. Times after the start of observation are indicated in the upper margin. Bar, 20 nm. The postulated structure of mouse IgG3 on ZZ-BNC is indicated (lower panel). Mouse IgG3 was tightly bound to ZZ-BNC through the Fc subunit, with Fab subunits swinging outwards. IgG centers of mass are indicated with black asterisks. A maximum deflection angle of the centroidal line (44 degrees) is indicated by red lines.

液相中の ZZ-BNC による IgG のクラスター化と ナノレベル整列化

固相上抗原 (オボアルブミン (ovalbumin (OVA))) を一次抗体 (抗OVA マウス IgG1) と西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase (HRP)) 標識二次

抗体 (ウサギ抗マウス IgG) で定量する酵素結合免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) において、予め二次抗体と ZZ-BNC を混合した二次抗体-ZZ-BNC 複合体を添加すると、二次抗体のみの場合と比べて約 10 倍検出感度が上昇することを見出した⁵⁹⁾ (Fig. 5A)。また、ZZ-BNC と二次抗体間にアビジ

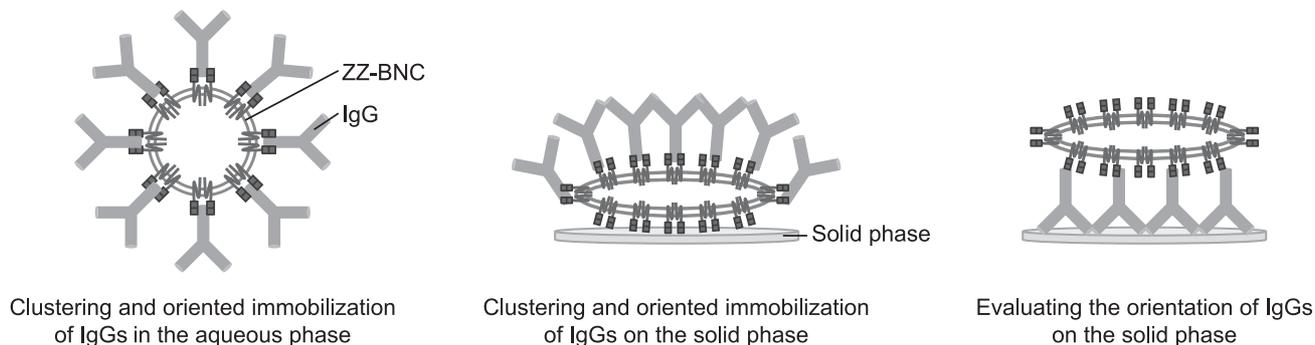


Fig. 4. Functions of ZZ-BNC in immunoassays and immunosensors.

ン-ビオチン複合体 (avidin-biotin complex (ABC)) システムを用いると、さらに感度は上昇した(約20倍). 同様に、ウェスタンブロット法においても ZZ-BNC により、固相化抗原の検出感度は約50倍上昇し、ABC システムの併用により約100倍上昇した. 一方、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase (ALP)) で標識した二次抗体の場合、ZZ-BNC による感度上昇は観察されなかった. これは、HRP 分子 (約40 kDa) と比べて、ALP 分子 (約100 kDa) が大きいことから⁶⁰⁾、二次抗体と ALP 分子をつなぐリンカー長が短く (約0.5 nm) Fc 領域周辺が高高くなり、ZZ-BNC と結合できないためと考えられた (Fig. 5B). そこで、二次抗体 - ALP 間のリンカー長を最適化 (約1.2 nm) することで、ZZ-BNC による ALP 標識二次抗体の感度上昇が達成された⁶¹⁾. 一方、長めのリンカー (約16 nm, 約40 nm) が感度低下を引き起こしたのは、リンカーに含まれる PEG 鎖による水和相が二次抗体と一次抗体との相互作用を抑制したものと考えられた.

次に、固相上の各種抗原 (アクチン, デスミン, グルタチオンSトランスフェラーゼ (glutathione S-transferase (GST)), ビメンチン) を、各種一次抗体 (抗アクチンマウス IgG2a, 抗デスミンマウス IgG2a, 抗 GSTマウス IgG2a, 抗ビメンチンマウス IgG2a) と Cy2 標識二次抗体 (ウサギ抗マウス IgG) で検出する FIA において、二次抗体の代わりに Cy2 標識 ZZ-BNC を用いると、Cy2 標識二次抗体の場合と比べて、検出感度が約10倍上昇することを見いだした⁶²⁾ (Fig. 6A). また、同一試料に含まれるさまざまな抗原の同時検出を行う場合、通常は一次抗体の動物種またはサブクラスの重複を避けて、それぞれに対応する二次抗体を探す必要があった⁶³⁾. そこで、ZZ-BNC をさまざまな蛍光色素 (Cy2, Cy3, Cy5, Cy7) で標識し、4種類の抗原 (GST, アクチン, デスミン, β -チューブリン) に対する抗体 (抗 GSTマウス IgG2a, 抗アクチンマウス IgG2a, 抗デスミ

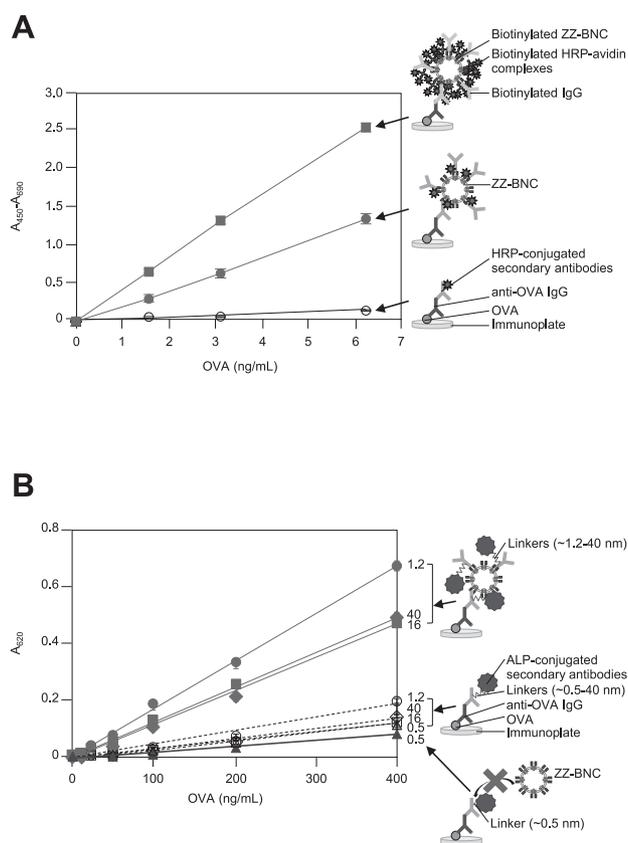


Fig. 5. ELISA using ZZ-BNCs. (A) Detection of OVA on solid phase by HRP-based ELISA systems. Conventional ELISA using an anti-OVA mouse IgG1 and an HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody (open circles); conventional ELISA in the presence of ZZ-BNCs (solid circles); conventional ELISA with the ABC system in the presence of biotinylated ZZ-BNC (solid squares). Schema for postulated immunocomplexes are shown to the right. Results are means \pm SD ($n = 8$). (B) Detection of OVA on solid phase by ALP-based ELISA systems using various ALP-conjugated IgGs in the presence of ZZ-BNCs. Triangles, ALP~0.5 nm linker-IgG; circles, ALP~1.2 nm linker-IgG; squares, ALP~16 nm linker-IgG; and diamonds, ALP~40 nm linker-IgG. Solid symbols and bold lines, with ZZ-BNCs; open symbols and broken lines, without ZZ-BNC. Schema for postulated immunocomplexes are presented on the right. Results are means \pm SD ($n = 4$).

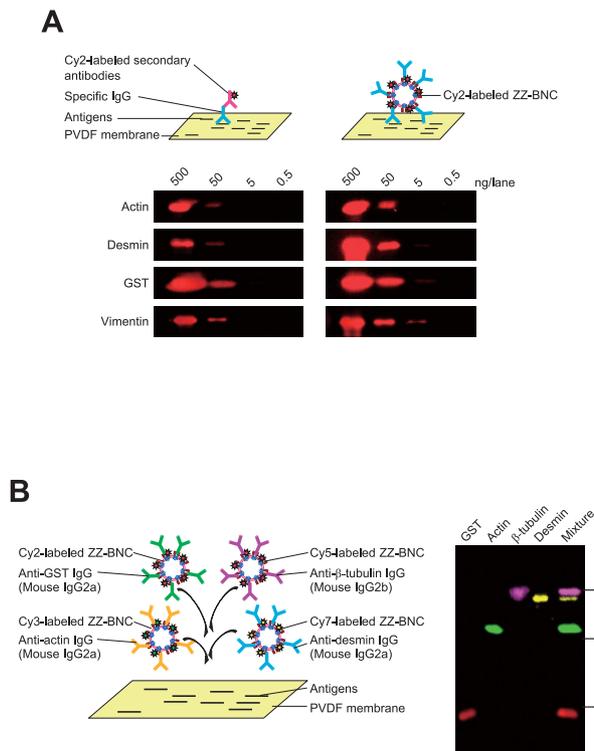


Fig. 6. Fluoroimmunoassays using ZZ-BNCs. (A) Western blot analyses using distinct fluorophore-labeling methods: conventional Cy2-labeled secondary antibody (left panel), and Cy2-labeled ZZ-BNC/IgG complex (right panel). Western blots containing 0.5–500 ng/lane of actin, desmin, GST, and vimentin were used. (B) Simultaneous immunolabeling of multiple antigens by western blot with various Cy-labeled ZZ-BNC/IgG complexes. Schema for simultaneous detection of GST, actin, β -tubulin, and desmin by a mixture of Cy2-labeled ZZ-BNC/mouse anti-GST IgG2a, Cy3-labeled ZZ-BNC/mouse anti-actin IgG2a, Cy5-labeled ZZ-BNC/mouse anti- β -tubulin IgG2b, and Cy7-labeled ZZ-BNC/mouse anti-desmin IgG2a complexes (left panel). Immunoblot of GST (lane 1, red), actin (lane 2, green), β -tubulin (lane 3, cyan), desmin (lane 4, yellow), and mixture (lane 5) (right panel). Molecular sizes (kDa) are indicated to the right.

ンマウス IgG2a, 抗 β -チューブリンマウス IgG2b) をそれぞれ提示させ、4種類の抗原を含むプロットに同時に使用したところ、各抗原を高感度かつ同時に検出することができた⁶²⁾ (Fig. 6B)。これは、ZZ-BNCが長年の免疫化学的検出における技術的課題であった使用抗体の動物種およびサブクラスに関する制限を根本的に解消できることを示している。以上より、ZZ-BNCは検出用抗体を表層にクラスター化ならびに整列化し、抗体1分子あたりの標識酵素および蛍光色素の分子数を高めることで高感度検出を可能にすると考えられた。

固相上の ZZ-BNC による IgG の クラスター化とナノレベル整列化

QCM バイオセンサーにおいて、センサーチップの金

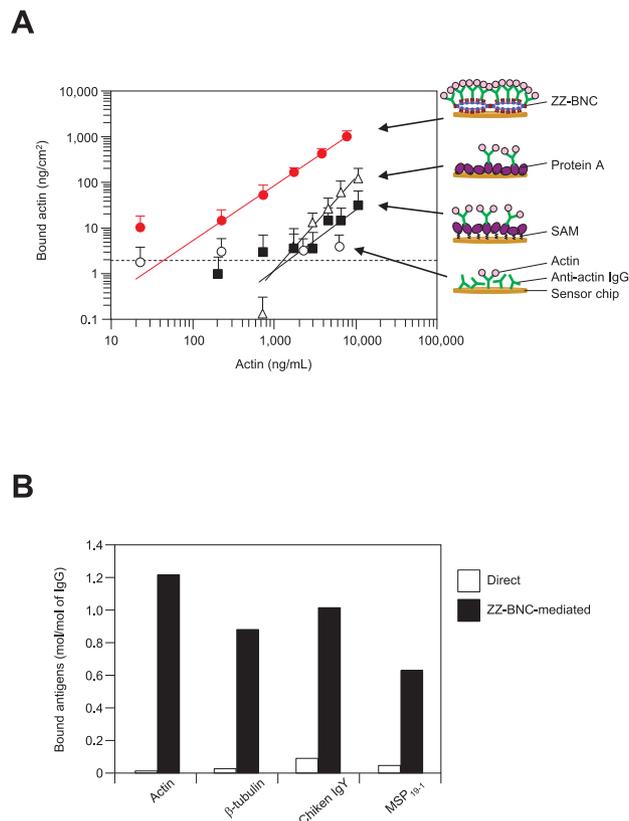


Fig. 7. Immunosensors using ZZ-BNCs. (A) Effect of anti-actin mouse IgG2a immobilization on sensitivity and actin-binding capacity. The amounts of bound actin calculated from frequency changes measured with a QCM were plotted against the concentrations of injected actin for direct (open circles), protein A-mediated (open triangles), SAM-modified protein A-mediated (solid squares), and ZZ-BNC-mediated (solid circles) immobilization methods. Limit of detection (2 ng/cm^2) is indicated by a dashed line. Approximate dynamic concentration ranges of the measured antigens are shown with lines for each immobilization pattern. Schema for postulated immunocomplexes are presented on the right. (B) The amounts of bound antigen per immobilized antibody. The antibodies used are anti-actin IgG2a, anti- β -tubulin IgG2b, anti-chicken IgY polyclonal IgG, and anti-MSP1₉ polyclonal IgG. Open bars, direct immobilization method; closed bars, ZZ-BNC-mediated immobilization method.

基板上に、IgG (抗アクチンマウス IgG2a) を直接法、Protein A を介する方法 (Protein A 法)、SAM 修飾 Protein A を介する方法 (SAM-Protein A 法)、および ZZ-BNC を介する方法 (ZZ-BNC 法) で固定化した。抗原 (アクチン) を定量したところ、ZZ-BNC 法は抗原結合量および検出感度において、それぞれ直接法の約 247 倍および約 128 倍、Protein A 法の約 8 倍および約 25 倍、SAM-Protein A 法の約 30 倍および約 31 倍と著しく上昇することを見いだした⁵⁴⁾ (Fig. 7A)。また、他の各種抗原定量系 (抗 β -チューブリンマウス IgG2b による β -チューブリン定量、抗ニワトリ IgY ウサギポリクローナル IgG によるニワトリ IgY 定量、抗 MSP1₉ ウサギ

ポリクローナルIgGによるマラリア関連タンパク質(MSP1₉)定量)においてもZZ-BNCは同様な効果を示した。特に、抗アクチンマウスIgG2aおよび抗MSP1₉ウサギポリクローナルIgGは、直接法では抗原の検出が困難であったが、ZZ-BNC法により検出可能になったことは、抗体が単独で配向性がランダムな状態よりも、ZZ-BNCが抗体をクラスター化並びに整列化することで、一抗体と一抗原の点对点の結合力よりも強力な多数の抗体と多数の抗原の面对面の結合力が得られるので、結合力の総和(Avidity)⁶⁴が上昇したと考えられた。さらに、固定化した抗アクチンマウスIgG2a 1分子に結合するアクチンのモル比を算出したところ、直接法0.01に対してZZ-BNC法1.22と約122倍上昇することを見いだした(Fig. 7B)。同様な効果は、他の各種抗原定量系でも観察された(β-チューブリン(約30倍)、ニトリリIgY(約11倍)、MSP1₉(約13倍))。この各抗体分子の抗原結合能を十分に引き出す効果は、現在までに報告されているさまざまな足場技術(プラズマ重合フィルム(PPF)修飾Protein A法(約5.35倍(対直接法))⁶⁵、SAM修飾Protein A法(約2.1倍(対直接法))⁶⁶、ナノパターンPPF修飾Protein A法(約1.2倍(対直接法))⁶⁷)よりも遥かに優れており、ZZ-BNCの整列化効果の優位性を示すものである。以上の結果は、ZZ-BNCはIgGのFc領域を表層に固定し、Fv領域を放射状に整列化させ、Fv領域周辺の立体障害が著しく改善し、IgGのクラスター化と整列化を同時に達成できる足場であることを示している。

さらに、QCMバイオセンサーにおけるZZ-BNCの抗体結合能は、酸処理(0.16 N HCl)による抗体の脱着を20回以上繰り返しても変わらなかった⁵⁴。これは、ZZ-Lタンパク質のカルボキシ末端側半分(S領域)に存在する14個のCys残基のいずれかが、金-硫黄間の強固な化学結合を形成しているためと考えられた。また、BNCの粒子構造は熱(70°C, 30分)および界面活性剤(0.2% SDS, 室温, 30分)の処理にも安定である⁶⁸。以上から、ZZ-BNCはセンサーチップの金基板上で化学的および物理的ストレスに対して耐性を示す優れた足場であることが示され、QCM以外の多様な環境下で使用される各種バイオセンサーの高感度化にも応用可能であると考えられる。

ZZ-BNCによる固定化IgGの配向性評価

バイオセンシングにおいて固相上のセンシング分子の配向性をナノレベルで制御し、最適化することは非常に重要である。通常は、標的物の結合量を最大化することにより同配向性の整列化度合いを最適化するが、実際に

固相上のセンシング分子の整列化が達成されているかは不明である。最近では、大型分析機械(AFM⁶⁹)、電子顕微鏡⁷⁰、飛行時間二次イオン質量分析計⁷¹、二面偏波式干渉計⁷²)などを用いて、基板表面の形状や固相上のIgGの配向性に依存した遊離アミノ酸の測定などにに基づき評価されているが、これらは煩雑で簡便性に乏しい。しかしながら、バイオセンシングは幅広い領域で用いられているので、センシング分子の配向性のより簡便な評価法の開発が必要である。そのような中、我々は固相上のランダムに固定化されたIgGよりも、固相上抗原により整列固定化されたIgGに対し、ZZ-BNCが高い親和性を示すことを見いだした⁷³(Fig. 8A)。これは、ZZ-BNCが固相上のIgGの配向性を簡便に評価できるユニークなプローブであることを示している。

さらに、液中の同一エピトープを複数有する抗原を検出するサンドイッチ免疫アッセイにおいて、通常は二次抗体が液中の検出用IgGのみを特異的に認識し、固相上の捕捉用IgGとは相互作用しないようにするため、捕捉用および検出用IgGを異なる動物種またはサブクラスにする必要があった⁷⁴。そこで、我々は固相上の捕捉用

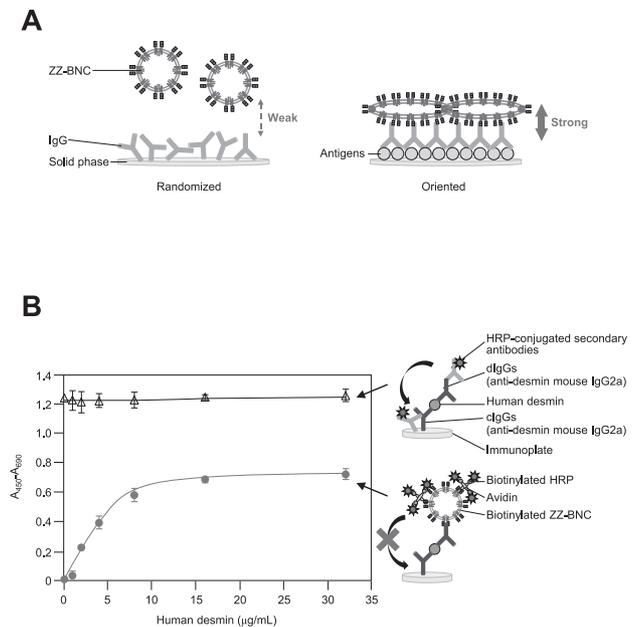


Fig. 8. Mode of function of ZZ-BNCs. (A) Postulated mechanisms for discriminating IgGs on a solid phase by ZZ-BNC. IgGs immobilized in a randomized (left panel) and oriented manner (right panel). (B) Detection of human desmin by sandwich ELISA, using an anti-human desmin monoclonal IgG2a as capture-IgG (cIgG) and detection-IgG (dIgG). Open triangles, cIgG, Ag, dIgG, and HRP-conjugated goat anti-mouse Fc-specific IgG (secondary antibody); and closed circles, cIgG, Ag, dIgG, biotinylated-ZZ-BNCs, and biotinylated-HRP-avidin complex. Schema for postulated immunocomplexes are presented to the right. Results are means \pm SD ($n = 4$).

IgGはランダムに固定化されているので、ZZ-BNCと結合しないと考えた。具体的には、抗原（デスミン（中間系フィラメント（多量体））を、捕捉用および検出用IgGに同一抗体（抗デスミンマウスモノクローナルIgG2a）を用いて検出するサンドイッチ免疫アッセイにおいて、二次抗体（HRP標識ウサギ抗マウスFc特異的ポリクローナルIgG）の代わりに、ZZ-BNCとHRPとの間にABCシステムを併用する系を検討した。その結果、二次抗体は、検出用および捕捉用IgGの両者に結合し抗原依存的な検出が不可能であったが、ZZ-BNCは固相上で「捕捉用IgG-抗原-検出用IgG複合体」を形成した検出用IgGのみと特異的に結合し、抗原依存的な検出を可能にした⁷³⁾ (Fig. 8B)。これは、捕捉用IgGに結合した抗原により検出用IgGのFcが整列化され、ZZ-BNCが特異的に結合したためと考えられた。以上の結果は、単一エピトープを有する単量体の抗原には適さないが、同一エピトープを複数有する抗原を検出するサンドイッチ免疫アッセイにおいて、同じIgGを捕捉用および検出用IgGとして同時に使用し、二次抗体の使用および各種抗体への酵素などの標識をしないで簡便かつ高感度に検出できることをZZ-BNCが初めて可能にしたことを示している。

固相上のZZ-BNCによるFc融合受容体の クラスター化とナノレベル整列化

バイオセンシングにおいて抗原抗体反応は重要な検出対象であるが、近年の生命科学の進歩によりさまざまな生体分子間相互作用（受容体とリガンド、DNA結合タンパク質とDNA、DNAアプタマーと標的分子、レクチンと糖鎖、酵素と基質）もバイオセンシングの検出対象となってきている。そこで我々は、センシング分子整列化の足場としてのZZ-BNCの汎用性を高めるために、受容体のリガンド結合部位を含む細胞外ドメインとヒトIgG1-Fcとの融合体を用いてQCMバイオセンサーの高感度化を検討した。具体的には、センサーチップの金基板上に、ヒト血管内皮増殖因子受容体（vascular epidermal growth factor receptor (VEGFR)）細胞外ドメインのカルボキシ末端側にヒトIgG1-Fcを融合したFc融合VEGFR（160 kDa）を3種類の固定化法（直接法、Protein A法、ZZ-BNC法）で固定し、リガンド（VEGF（38.2 kDa））の検出を行った（Fig. 9）。その結果、ZZ-BNC法は直接法と比べて、バイオセンサーの検出感度およびリガンド結合量が、それぞれ約35倍および約4倍上昇することを見いだした。さらに、固定化したFc融合受容体1分子へのリガンド結合量は直接法0.17分子に対してZZ-BNC法は1.3分子と約7.6倍上昇すること

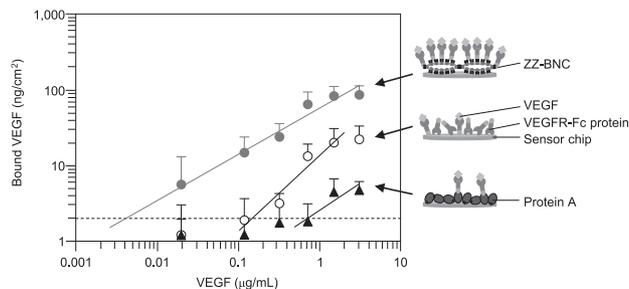


Fig. 9. Effect of ZZ-BNC-mediated immobilization on sensitivity and VEGF-binding capacity of VEGFR-Fc protein. The amounts of bound VEGF calculated from frequency changes measured using QCM were plotted against the concentrations of injected VEGF for direct (open circles), protein A-mediated (solid triangles), and ZZ-BNC-mediated (solid circles) immobilization methods. Limit of detection (2 ng/cm^2) is indicated by a dashed line. Approximate dynamic concentration ranges of measured antigens are shown with lines for each immobilization pattern. Schema for postulated immunocomplexes are presented on the right.

を見いだした。これは、ZZ-BNC上でFc融合受容体がクラスター化および整列化され、リガンド認識部位周辺の立体障害が著しく改善されたためと考えられた。また、同様な効果は他のリガンド（レプチン、プロラクチン、腫瘍壊死因子II）に対するそれぞれのFc融合受容体でも観察されたことから、本ZZ-BNC足場技術は、抗体以外のセンシング分子の整列化にも応用展開可能であることが示された（投稿準備中）。

まとめ

本稿では、ZZ-BNCのユニークな機能（IgGのクラスター化、IgGのナノレベル整列化、固定化IgGの配向性評価）による免疫センサーの高感度化を概説してきた。また、ZZ-BNCは化学的および物理的ストレスに対して非常に高い安定性を示すとともに、IgGの代わりにFc融合受容体を用いることでさまざまな生体分子間相互作用の検出にも同様な効果が期待できることも示した。今後は、さまざまなセンシング分子とZZ-Lタンパク質の配向性を維持した結合方法を開発することができれば、本ZZ-BNCによるバイオセンシング技術は格段に応用範囲が広がるものと考えられる。さらに、BNCは組換えDNA技術^{47,53,75)}や化学修飾⁷⁶⁾により外来性分子を粒子表面に整列提示したり、エレクトロポレーションやリポソーム融合によりBNC内部に各種分子を封入したりすることができることから、発色、発光、蛍光、放射などのシグナルを発するさまざまな検出用分子にも適用可能になると考えられる。以上から、ZZ-BNCによるクラスター化とナノレベル整列化技術の高い汎用性はバイオセンシング領域だけでなく、薬剤および遺伝子

送達システム領域, さらに表面科学研究領域においても貢献できると考えられる.

要 約

バイオセンシングの高感度化において, センサー表面のセンシング分子のクラスター化およびナノレベル整列化はきわめて重要であるが, 両者を同時に達成する従来技術はほとんどなかった. 筆者らは, Protein A の IgG-Fc 結合 Z ドメイン 2 量体を整列提示する改変型 B 型肝炎ウイルスの表面抗原 L タンパク質粒子 (ZZ-BNC) が IgG のクラスター化とナノレベル整列化を同時に達成できる安定性の高いユニークな足場分子であることを見だし, 各種イムノアッセイ (ELISA, ウェスタンブロット法, 蛍光免疫測定法) およびイムノセンサー (QCM, SPR) の高感度化を達成した (例: QCM による抗原検出系で, 従来比: 抗原結合量 247 倍, 検出感度 128 倍). さらに, ZZ-BNC は固相上の IgG の配向性を簡便に評価できるプローブとして機能することも見いだした. 本 ZZ-BNC 足場技術は, IgG 以外のセンシング分子 (Fc 融合受容体) にも応用可能であることから, 従来のバイオセンシングの機能 (感度・特異性) を飛躍的に改善できると考えられる.

謝 辞

本研究遂行にあたり, ご援助をいただいた, 日本学術振興会科学研究費補助金・基盤研究 (A) (25242043 (黒田)), 若手研究 (B) (25870310 (飯嶋)), 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物系特定産業技術研究支援センター (黒田), 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 (黒田), 厚生労働科学研究費補助金 (黒田) に深謝致します.

文 献

- 1) Engvall, E., Jonsson, K., and Perlmann, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 427–434 (1971).
- 2) Amina Watson, R. A., Landon, J., Shaw, E. J., and Smith, D. S.: *Clin. Chim. Acta*, **73**, 51–55 (1976).
- 3) Wide, L. and Porath, J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **130**, 257–260 (1966).
- 4) Shons, A., Dorman, F., and Najarian, J.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 565–570 (1972).
- 5) Liedberg, B., Nylander, C., and Lunström, I.: *Sens. Actuators*, **4**, 299–304 (1983).
- 6) Azzam, R. M. A., Rigby, P. G., and Krueger, J. A.: *Phys. Med. Biol.*, **22**, 422–430 (1977).
- 7) Leuversing, J. H. W., Thal, P. J. H. M., van der Waart, M., and Schuurs, A. H. W. M.: *J. Immunoassay*, **1**, 77–91 (1980).
- 8) Loyprasert, S., Thavarungkul, P., Asawatreratanakul, P., Wongkittisuksa, B., Limsakul, C., and Kanatharana, P.: *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 78–86 (2008).
- 9) Chan, W. C. W. and Nie, S.: *Science*, **281**, 2016–2018

- (1998).
- 10) O'Connor, M., Kim, S. N., Killard, A. J., Forster, R. J., Smyth, M. R., Papadimitrakopoulos, F., and Rusling, J. F.: *Analyst*, **129**, 1176–1180 (2004).
- 11) Wang, J., Liu, G., Engelhard, M. H., and Lin, Y.: *Anal. Chem.*, **78**, 6974–6979 (2006).
- 12) Bhatia, S. K., Shriver-Lake, L. C., Prior, K. J., Georger, J. H., Calvert, J. M., Bredehorst, R., and Ligler, F. S.: *Anal. Biochem.*, **178**, 408–413 (1989).
- 13) Rongen, H. A. H., van der Horst, H. M., Hugenholtz, G. W. K., Bult, A., van Bennekom, W. P., and van der Meide, P. H.: *Anal. Chim. Acta*, **287**, 191–199 (1994).
- 14) Yoshioka, M., Mukai, Y., Matsui, T., Udagawa, A., and Funakubo, H.: *J. Chromatogr.*, **566**, 361–368 (1991).
- 15) Catt, K., Niall, H. D., and Tregear, G. W.: *Nature*, **213**, 825–827 (1967).
- 16) Mandenius, C. F., Welin, S., Danielsson, B., Lundström, I., and Mosbach, K.: *Anal. Biochem.*, **137**, 106–114 (1984).
- 17) Mirsky V. M., Riepl, M., and Wolfbeis, O. S.: *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 977–989 (1997).
- 18) Schmitt, F. J., Häusslig, L., Ringsdorf, H., and Knoll, W.: *Thin Solid Films*, **210/211**, 815–817 (1992).
- 19) Boozer, C., Ladd, J., Chen, S., Yu, Q., Homola, J., Jiang, S.: *Anal. Chem.*, **76**, 6967–6972 (2004).
- 20) Gersten, D. M. and Marchalonis, J. J.: *J. Immunol. Methods*, **24**, 305–309 (1978).
- 21) Chatelier, R. C., Gengenbach, T. R., Griesser, H. J., Brigham-Burke, M., and O'Shannessy, D. J.: *Anal. Biochem.*, **229**, 112–118 (1995).
- 22) Tsai, C. W., Jheng, S. L., Chen, W. Y., and Ruaan, R. C.: *Anal. Chem.*, **86**, 2931–2938 (2014).
- 23) Trilling, A. K., Beekwilder, J., and Zuihof, H.: *Analyst*, **138**, 1619–1627 (2013).
- 24) Prusak-Sochaczewski, E., Luong, J. H., and Guilbault, G. G.: *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 173–177 (1990).
- 25) Puertas, S., de Gracia Villa, M., Mendoza, E., Jiménez-Jorquera, C., de la Fuente, J. M., Fernández-Sánchez, C., and Grazú, V.: *Biosens. Bioelectron.*, **43**, 274–280 (2013).
- 26) You, H. X., Lin, S., and Lowe, C. R.: *Micron*, **26**, 311–315 (1995).
- 27) Ferreria, N. S. and Sales, M. G. F.: *Biosens. Bioelectron.*, **53**, 193–199 (2014).
- 28) O'Shannessy, D. J. and Quarles, R. H.: *J. Appl. Biochem.*, **7**, 347–355 (1985).
- 29) Ho, J. A., Hsu, W. L., Liao, W. C., Chiu, J. K., Chen, M. L., Chang, H. C., and Li, C. C.: *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 1021–1027 (2010).
- 30) Attili, B. S. and Suleiman, A. A.: *Microchem. J.*, **54**, 174–179 (1996).
- 31) de Juan-Franco, E., Caruz, A., Pedrajas, J. R., and Lechuga, L. M.: *Analyst*, **138**, 2023–2031 (2013).
- 32) Lee, J. M., Park, H. K., Jung, Y., Kim, J. K., Jung, S. O., and Chung, B. H.: *Anal. Chem.*, **79**, 2680–2687 (2007).
- 33) Tang, J. B., Sun, X. F., Yang, H. M., Zhang, B. G., Li, Z. J., Lin, Z. J., and Gao, Z. Q.: *Anal. Chim. Acta*, **776**, 74–78 (2013).
- 34) Le Brun, A. P., Holt, S. A., Shah, D. S. H., Majkrzak, C.

- F., and Lakey, J. H.: *Biomaterials*, **32**, 3303–3311 (2011).
- 35) O'Brien, J. C., Jones, V. W., and Porter, M. D.: *Anal. Chem.*, **72**, 703–710 (2000).
 - 36) Prisyazhnoy, V. S., Fusek, M., and Alakhov, Y. B.: *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **424**, 243–253 (1988).
 - 37) Karyakin, A. A., Presnova, G. V., Rubtsova, M. Y., and Egorov, A. M.: *Anal. Chem.*, **72**, 3805–3811 (2000).
 - 38) Billah, M. M., Hodges, C. S., Hays, H. C. W., and Millner, P. A.: *Bioelectrochemistry*, **80**, 49–54 (2010).
 - 39) Backmann, N., Zahnd, C., Huber, F., Bietsch, A., Plückthun, A., Lang, H. P., Güntherodt, H. J., Hegner, M., and Gerber, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14587–14592 (2005).
 - 40) Steinhauer, C., Wingren, C., Khan, F., He, M., Taussig, M. J., and Borrebaeck, C. A. K.: *Proteomics*, **6**, 4227–4234 (2006).
 - 41) Shen, Z., Yan, H., Zhang, Y., Mernaugh, R. L., and Zeng, X.: *Anal. Chem.*, **80**, 1910–1917 (2008).
 - 42) Kwon, Y., Han, Z., Karatan, E., Mrksich, M., and Kay, B. K.: *Anal. Chem.*, **76**, 5713–5720 (2004).
 - 43) Kumada, Y., Hamasaki, K., Shiritani, Y., Nakagawa, A., Kuroki, D., Ohse, T., Choi, D. H., Katakura, Y., and Kishimoto, M.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**, 759–765 (2009).
 - 44) Shen, Z., Yan, H., Parl, F. F., Mernaugh, R. L., and Zeng, X.: *Anal. Chem.*, **79**, 1283–1289 (2007).
 - 45) Huang, L., Reekmans, G., Saerens, D., Friedt, J. M., Frederix, F., Francis, L., Muyldermans, S., Campitelli, A., and Van Hoof, C.: *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 483–490 (2005).
 - 46) Kuroda, S., Otaka, S., Miyazaki, T., Nakao, M., and Fujisawa, Y.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 1953–1961 (1992).
 - 47) Yamada, T., Iwasaki, Y., Tada, H., Iwabuki, H., Chuah, M. K., VandenDriessche, T., Fukuda, H., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 885–890 (2003).
 - 48) Jung, J., Matsuzaki, T., Tatematsu, K., Okajima, T., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: *J. Control. Release*, **126**, 255–264 (2008).
 - 49) Kasuya, T., Jung, J., Kinoshita, R., Goh, Y., Matsuzaki, T., Iijima, M., Yoshimoto, N., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: *Methods Enzymol.*, **464**, 147–166 (2009).
 - 50) Neurath, A. R., Kent, S. B. H., Strick, N., and Parker, K.: *Cell*, **46**, 429–436 (1986).
 - 51) Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahmsén, L., Elmlblad, A., Holmgren, E., Henrichson, C., Jones, T. A., and Uhlén, M.: *Protein Eng.*, **1**, 107–113 (1987).
 - 52) Tsutsui, Y., Tomizawa, K., Nagita, M., Michiue, H., Nishiki, T., Ohmori, I., Seno, M., and Matsui, H.: *J. Control. Release*, **122**, 159–164 (2007).
 - 53) Kurata, N., Shishido, T., Muraoka, M., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *J. Biochem.*, **144**, 701–707 (2008).
 - 54) Iijima, M., Kadoya, H., Hatahira, S., Hiramatsu, S., Jung, G., Martin, A., Quinn, J., Jung, J., Jeoung, S. Y., Choi, E. K., Arakawa, T., Hinako, F., Kusunoki, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: *Biomaterials*, **32**, 1455–1464 (2011).
 - 55) Matsuo, H., Yoshimoto, N., Iijima, M., Niimi, T., Jung, J., Jeong, S. Y., Choi, E. K., Sewaki, T., Arakawa, T., and Kuroda, S.: *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 3341–3350 (2012).
 - 56) Björck, L. and Kronvall, G.: *J. Immunol.*, **133**, 969–974 (1984).
 - 57) Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., and Ando, T.: *Nature*, **468**, 72–76 (2010).
 - 58) Iijima, M., Somiya, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S.: *Sci. Rep.*, **2**, 790 (2012).
 - 59) Iijima, M., Matsuzaki, T., Kadoya, H., Hatahira, S., Hiramatsu, S., Jung, G., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: *Anal. Biochem.*, **396**, 257–261 (2010).
 - 60) Porstmann, B., Porstmann, T., Nugel, E., and Evers, U.: *J. Immunol. Methods*, **79**, 27–37 (1985).
 - 61) Iijima, M., Yamamoto, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 843–846 (2013).
 - 62) Iijima, M., Matsuzaki, T., Yoshimoto, N., Niimi, T., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: *Biomaterials*, **32**, 9011–9020 (2011).
 - 63) Tidman, N., Janossy, G., Bodger, M., Granger, S., Kung, P. C., and Goldstein, G.: *Clin. Exp. Immunol.*, **45**, 457–467 (1981).
 - 64) Coe Clough, N. E. and Hauer, P. J.: *ILAR J.*, **46**, 300–306 (2005).
 - 65) Wang, H., Liu, Y., Yang, Y., Deng, T., Shen, G., and Yu, R.: *Anal. Biochem.*, **324**, 219–226 (2004).
 - 66) Briand, E., Salmain, M., Compère, C., and Pradier, C. M.: *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 2884–2890 (2007).
 - 67) Valsesia, A., Colpo, P., Mannelli, I., Mornet, S., Bretagnol, F., Ceccone, G., and Rossi, F.: *Anal. Chem.*, **80**, 1418–1424 (2008).
 - 68) Yamada, T., Iwabuki, H., Kanno, T., Tanaka, H., Kawai, T., Fukuda, H., Kondo, A., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: *Vaccine*, **19**, 3154–3163 (2001).
 - 69) Farris, L. R. and McDonald, M. J.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 2821–2829 (2011).
 - 70) Bendikov, T. A., Rabinkov, A., Karakouz, T., Vaskevich, A., and Rubinstein, I.: *Anal. Chem.*, **80**, 7487–7498 (2008).
 - 71) Cho, I. H., Park, J. W., Lee, T. G., Lee, H., and Paek, S. H.: *Analyst*, **136**, 1412–1419 (2011).
 - 72) Song, H. Y., Zhou, X., Hobbey, J., and Su, X.: *Langmuir*, **28**, 997–1004 (2012).
 - 73) Iijima, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., Maturana, A. D., and Kuroda, S.: *Analyst*, **138**, 3470–3477 (2013).
 - 74) Crowther, J. R.: *Molecular Biomethods Handbook, 2nd Edition*, (Walker, J. M. and Rapley, R.), pp. 657–682, Humana Press, Totowa, NJ (2008).
 - 75) Shishido, T., Mieda, H., Hwang, S. Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 5726–5731 (2010).
 - 76) Kasuya, T., Jung, J., Kadoya, H., Matsuzaki, T., Tatematsu, K., Okajima, T., Miyoshi, E., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: *Hum. Gene Ther.*, **19**, 887–895 (2008).