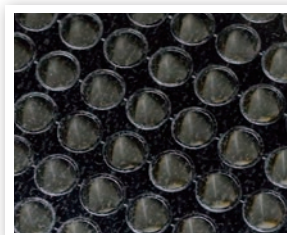


# わずか一滴の体液で診断

がんや感染症を従来の100万倍もの高感度で検出

がん細胞やウイルスにかかわるたんぱく質を、汗や血液から従来の100万倍もの高感度で検出する方法を東京大学大学院の野地博行教授らが実現した。半導体の製造技術を活用し、1センチ四方のガラス板に100万個の小さな穴をつくった。この超微細な空間に抗原抗体反応でできた分子を閉じ込めて、1個ずつ捉えられるようにした。これまで難しかった微量の物質でも検出できるため、唾液や尿からも診断できる可能性がある。さまざまな病気の早期発見につながる技術として、実用化を目指す。



## 求められる 超早期診断法の確立

冬になると必ずやってくる厄介者のインフルエンザ。感染初期は、体内のウイルス量が少ないため検出しにくく、感染しているかどうかの診断が難しい。早期発見ができれば、症状が進む前に治療ができる。そこで野地さんらは、感染初期の微量なウイルスでも検出できるように「1分子デジタルELISA法」を高感度に改良した。

ELISA法(酵素結合免疫吸着法)は、インフルエンザやエイズなどの感染症、がんや免疫疾患などの診断、妊娠検査などに使われている。身体に外から異質物(抗原)が入っていると、免疫にかかわるたんぱく質(抗体)がそれを異物と認識し、抗

原と抗体は結合して排除しようとする。この抗原抗体反応を利用して、血液などに含まれるウイルスや疾患に関連するたんぱく質(バイオマーカー)を検出し、診断や治療に使われている。

目標のたんぱく質を捉えるために、バイオマーカーに対し特定の化合物と結合する抗体を使う。抗体には酵素が付けてあり、酵素反応によって生じた生成物が発色したり発光したりするので、その光を測定すれば抗体に結合したたんぱく質を検出できる。抗体さえあればどんなバイオマーカーでも検出できる、簡便な装置になっている。

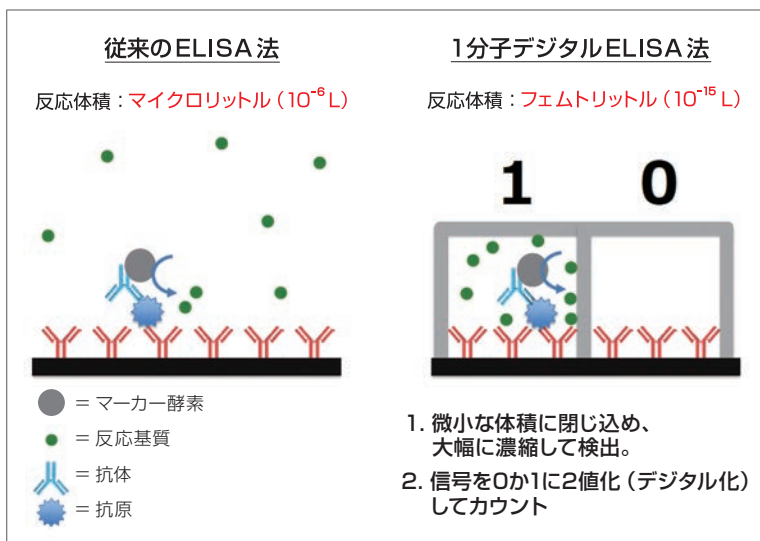
しかし、従来のELISA法は感度が十分ではなかった。1ミリリットルあたり数十ピコグラム(ピコは1兆分の1:東京ドームの中に1グラムを入れたときの濃度)程度

のバイオマーカーなら検出できるが、ウイルス感染初期では、100アトグラム(アトは100京分の1)~1フェムトグラム(フェムトは1000兆分の1)の微量検出が必要となる。これでは、ウイルスやがんの超早期発見につながらない。

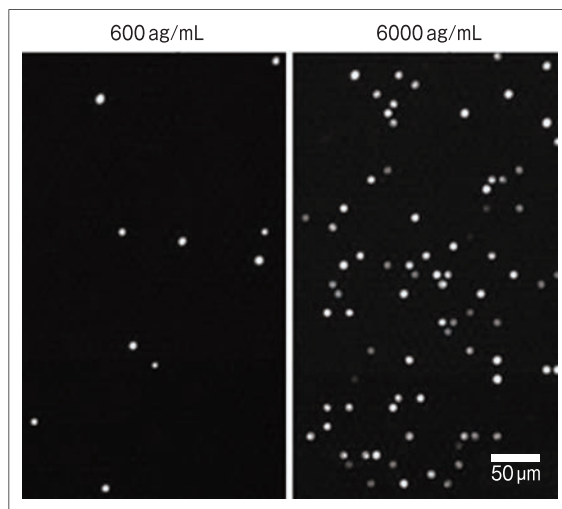
## 100万倍の高感度を実現

高感度化を可能にしたのは、反応する分子をきわめて小さい空間に閉じ込めたことによる。そのヒントは、半導体の製造技術だった。1センチメートル四方のガラス板を100万個の微細なくぼみのあるナノデバイスに工夫した。わずか数フェムトリットルの体積の水滴を100万個も同時に作る事ができる。

検出方法は、抗体のついた直径0.5ミリ以下の微細なプラスチック(マイクロ

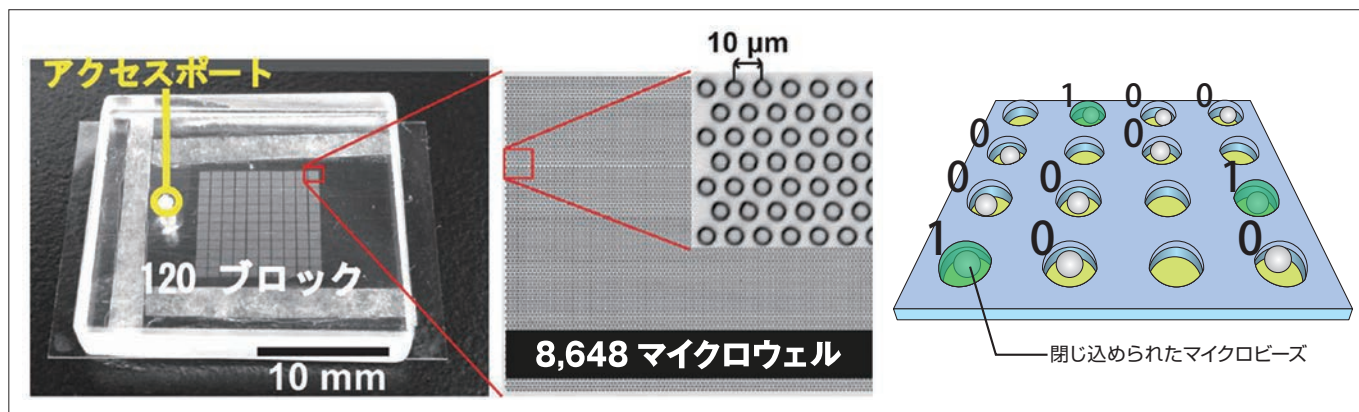


従来のELISA法では、マイクロリットルの液体中で酵素反応を行い、信号変化をアナログに測定しバイオマーカーの濃度を決定している。一方、1分子デジタルELISA法ではフェムトリットル<sup>\*</sup>の液体中で反応を行い、2値化した信号を1分子ごとにカウントしてバイオマーカーの濃度を決定する。これらにより、高感度で測定誤差の影響を受けにくい測定が可能になる。



### 前立腺がんのマーカーの検出例

ELISA法の感度評価によく使われる前立腺腫瘍マーカーを蛍光顕微鏡で観察した結果。検出下限値は、なんと60 ag/mL。これは、1mLの検体中にわずか1200分子のマーカーが存在することに相当し、従来のELISA法と比較して検出下限値を100万倍向上させた。(1ag/mLは1ミリリットルあたり1アトグラム)



### 1分子デジタルELISA法

1cm四方のスペースに100万個の微小な水滴を同時に形成するナノデバイス。この中にマイクロビーズを閉じ込めて、バイオマーカーを結合した数をカウントする。

ビーズ) にバイオマーカーと蛍光を発する生成物を生じる酵素のついた抗体を結合させ、これをナノデバイスに流し込み、1個ずつ水滴に閉じ込める。発光した1個ずつのマイクロビーズを顕微鏡で観察し、光るか光らないかを、0か1のデジタル信号に変えて検出する。

「従来の方法では数マイクロリットルの液体中で濃度が薄くて検出できません。わずか数フェムトリットルの体積に分子を閉じ込めることで、大幅に濃縮でき、微量なバイオマーカーも検出できるのです」。この方法を使えば、濃度が薄い尿や唾液でも検査が可能になるという。実際に前立腺がんのマーカーであるPSA（前立腺特異抗原）の有無を調べると、従来の100万倍薄い濃度でも検出できた。

### 分子を閉じ込めることから始まった

野地さんは、ATP（アデノシン三リン酸）合成酵素の仕組みを研究してきた。ATPは自動車であれば燃料のガソリンにあたる。筋肉の収縮など生命活動で利用されるエネルギーの貯蔵、利用にかかわり、「生体のエネルギー通貨」とも呼ばれる。

ATP合成酵素は、ATPが分解するときが発生するエネルギーを効率よく運動工

ネルギーに変換するたんぱく質で、1方向に回転する世界最小の分子モーターでもある。分子モーターは、細胞内で発生するエネルギーを機械的な動きに変えるたんぱく質で、機械にモーターが装備されているように、分子モーターも生き物の生命活動を維持するために、生体内で回り続けている。

ATP合成酵素の機能を調べるには、たんぱく質の分子1個を閉じ込めて動きを測定する反応装置が必要だと考えた。とはいえ、そこまで超微細な容器はない。「ならば自分でつくろうとしたのが1分子デジタルELISA法を開発したきっかけです」。

微細な容器は、半導体製造に用いられるマイクロナノ加工技術でつくれる。半導

体加工の研究者と反応装置を開発しているうちに、微細な容器に分子を閉じ込めて生物検定すれば、溶液が濃縮されて検出感度が上がるのではないかとひらめいた。2005年に論文発表するとともに特許を申請した。

しかし大学の担当者に相談すると、「アイデアの可能性はわかるが、すぐに実用化には結び付きそうにない」と経費もかかる特許の所有を断られてしまった。しかたなく共同研究者らとポケットマネーを出し合って特許を維持することにした。しかし、誰かが実用化してくれるだろうと期待をしたものの結局7年間、何の問い合わせもなかった。「このアイデアはこうすれば役立つ、ということを見せる



### 野地 博行

のじ・ひろゆき

東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻教授

1993年、東京工業大学生命理工学部卒業。97年、同大学総合理工学研究科博士課程修了。博士（理学）。2000年、JSTさきがけ研究員。01年、東京大学生産技術研究所助教授。05年、大阪大学産業科学研究所教授。10年から現職。

しかない」とCRESTに応募し、2010年から1分子デジタルELISA法の開発を始めた。

## 将来まで役に立つ研究をしたい

東京工業大学の研究員時代は基礎研究一筋だった。応用研究に目を向けたのは東京大学の生産技術研究所に移ってから。周囲は工学系の研究者ばかりだった。基礎研究は自然界の真理を追求するものだが、工学系は実用化が目的で応用研究が中心になる。「環境の違いに戸惑いましたが、やがて、お互いに目指すところは共通だと気がつきました。それは、将来まで人の役に立つ研究をしたいということです」と話す。異分野の同僚たちと議論を重ねていくうちに、研究に対してこれまでと違った視点で見ることができるようになった。

「基礎と応用を特別に意識しているつもりはなく、研究で得られた知見をいろ

ろな視点で展開しているだけです。1分子デジタルELISA法の開発も、必要に迫られたからです」。

ELISA法については、低コストで診断・検査できるポータブルな装置への改良やソフトウェアの開発など、実用化に向けた研究を急ピッチで進めている。昨年度からJST 先端計測分析技術・機器開発プログラムにも関わるようになった。製薬会社との共同開発が始まり、研究室には企業のメンバーが駐在している。全自動の免疫測定法と組み合わせることで、超高感度な自動デジタルELISA 検査システムを開発する。現在の診断に用いられている一般的な免疫測定法に比べ、約1万倍以上も感度が向上する。疾病や感染症の超早期診断に加え、医療費負担も減らせることは間違いない。

「地道な研究と実験の繰り返しは大学だけではできません。共同研究はサンプルやデータのやり取りだけになりがちですが、プロセスを知ることによってアイデアが生まれることもあります。ですから人の行き来を大切にしています」。

## 分子モーターから人工細胞へ

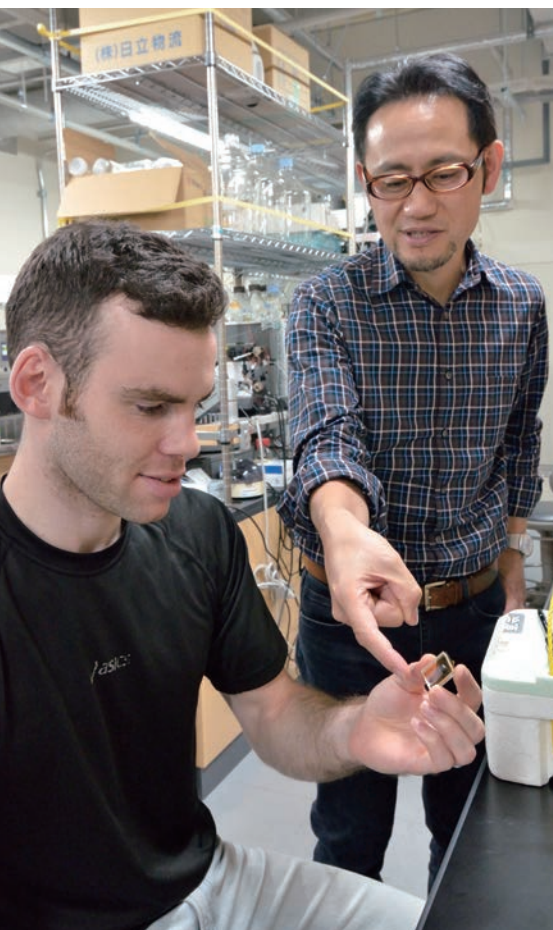
夢は、ATPで自由に制御できる人工分子マシンをつくることだという。これまでATP合成酵素を解析しその仕組みを探ってきたが、いよいよ人工的に改変して機能を制御する段階に研究が進んだ。ATP合成酵素には2つの回転モーターがある。1つはATPをエネルギー源として

回転するが、もう1つは細胞膜の間のイオンの流れをエネルギーにして回転している。ATPを分解する方を逆方向に無理やり回転させると、分解生成物からATPを合成することができるのではないかと考えた。実際にイオンの流れを使うのは難しいため、光のエネルギーを利用してモーターを逆回転させ、ATP以外にもいろいろな化合物をつくろうと試みている。

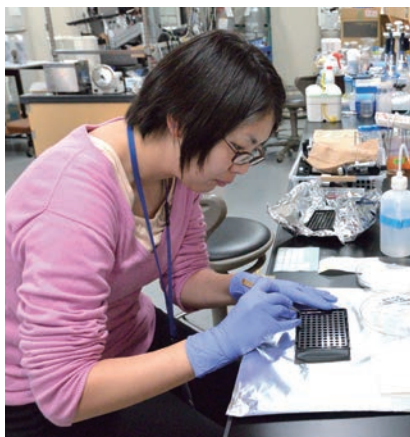
ナノサイズの実験にはさまざまな困難がある。対象が小さすぎて、リアルタイムに観察できる手段がなかった。そこで「1分子モーションキャプチャー法」を開発した。これは、分子のエネルギー変換のふるまいを顕微鏡で観察するもので、1ナノメートルの人工分子の回転運動を目印となる大きなビーズをつけて1個ずつ「見て、触る」ことに初めて成功した。

「将来的には、自分でデザインしたたんぱく質を使って、分子マシンをどんどん改変していきたい。それにはCRESTで開発した装置が有効です」と続ける。装置には、改変した分子を1度に100万個も閉じ込められるため、そこから機能の良いものを効率的に選ぶことができる。

ナノデバイスの微細なくぼみは、ちょうど細胞と同じくらいの大さになっている。この中に遺伝子など細胞の中身を再現したら、人工細胞をつくることができるのではないかとひらめいた。分子モーターの仕組みを知る重要な研究基盤になる。将来的には分子マシンの性能を強化し、世の中にない分子をつくり出したいという。



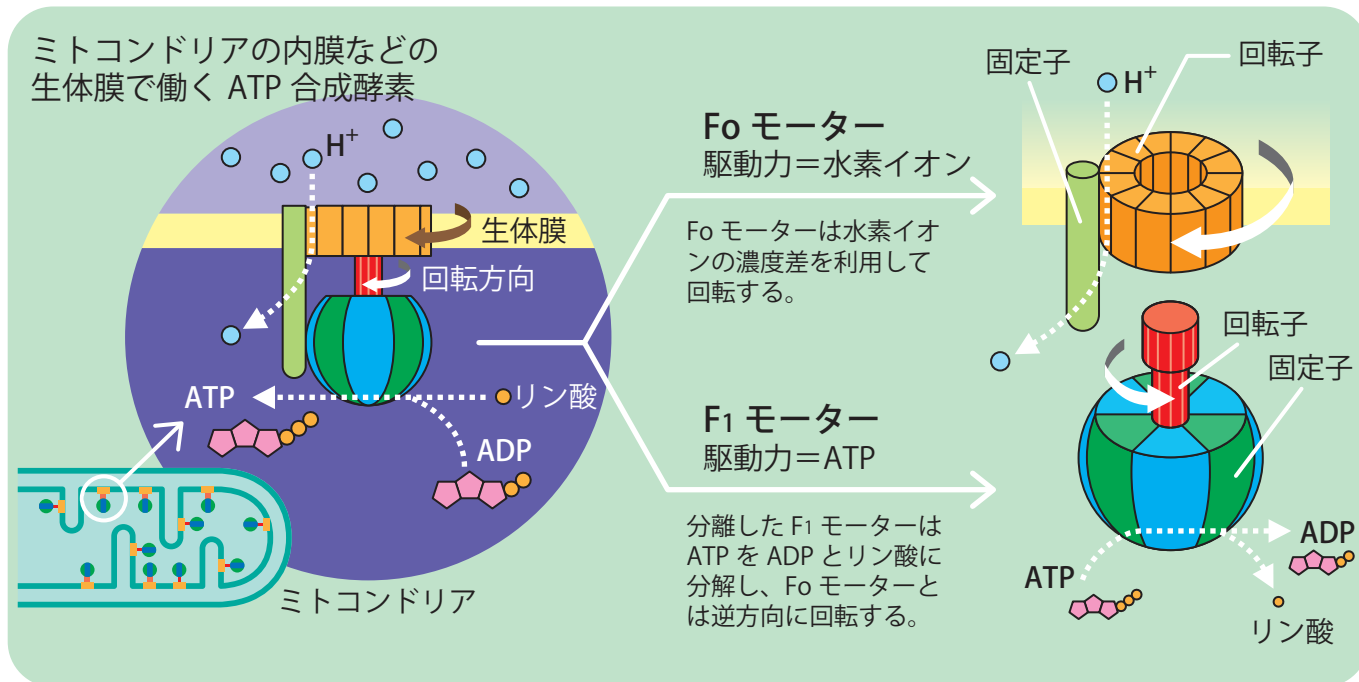
イギリスからの研究員のオリバーさんが持っているのが開発したナノデバイスだ。



汎用性のある枠に96個のナノデバイスを取りつけるアボットジャパンの小林さん。やがて量産化されるまでは、すべてが手作りだ。



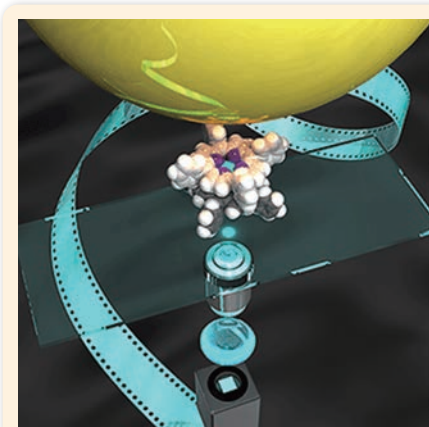
実験の内容を確認する技術スタッフの山内里紗さん。物質によって蛍光の色はさまざまだが、不思議な美しさがある。



### ATP合成酵素の仕組み

直径・高さ10ナノメートル程度の2つの回転モーター (F1、Fo) が結合してできている。生体膜から突き出した部分がF1で、ATPをADPとリン酸に加水分解して回転する。一方、Foは膜に埋まっている部分で水素イオンの流れを利用して回転する。この2つのモーターは、互いの回転子と固定子とで結合して1つのATP合成酵素となるが、それぞれの回転方向は互いに逆向きである。細胞内では、強力な膜電位で動き始めたFoモーターが、F1を逆向きに強制回転しATP合成反応を進める。一方、膜電位が足りないときは、F1モーターがATPを加水分解してFoを逆回転させ水素イオンの能動輸送を行う。ミトコンドリアのATP合成酵素はバクテリアの細胞膜にあるものと似ており、ミトコンドリアが共生した頃には既にATP合成酵素があったことがわかる。この小さな酵素は少なくとも20億年はくると回り続けていることになる。

(図版：JT生命誌研究館 季刊『生命誌』43号「まわる分子との対話—ATP合成酵素のしくみを探る」を参考に作成)



### 1分子モーションキャプチャー法の概念図

分子の機械的な運動を可視化する手法を目印 (黄色) をつけた大きさ1ナノメートルの人工分子マシンに応用し、その回転運動を「見て、触る」ことに成功した。

## 面白いことを追求する

野地さんが研究者を目指したのは、小学生の頃に読んだ科学漫画の影響がある。主人公の博士が自然界の秘密をさぐるストーリーが楽しくて、科学者に興味を持った。特に印象に残っているのが、海から生命が誕生したというコアセルベートの話だった。有機化合物が集まってできる液状の小粒で、原始細胞体のモデルの1つだ。かつて、ソ連の生化学者のアレクサンドル・オーバーリンは、コアセルベートから最初の生命が誕生したという説を出した。

「いろいろな研究に首を突っ込こんでいるようですが、不思議なことに全部つながっています。自分が面白いと思うものを追求してきたら、それが少しずつコアセルベートに近づいてきました。子どもの頃の気持ちの研究の根底にあるのではうね」と笑う。

研究のモットーは「面白いと思ったこ

とをすること。集中力も高まります。たとえ回り道になっても、面白いこと、興味を持つことの研究は、結局、問題突破につながります。若い人たちにも目先にとらわれず、興味のあることをどんどん進めていってほしいと思います」と締めくくった。



つくり付けの白木の本棚や家具が並ぶラボ。企業や他の研究室からの出入りも多いため、コミュニケーションが活発になる空間づくりを目指している。中でも野地さんのお気に入りには休憩室の大きな1枚板のテーブル。木の温もりに包まれる中で、議論も膨らみアイデアが生まれるそうだ。