

液中動作 FM-AFM による IgG 抗体分子への抗原吸着評価

Antigen binding to IgG self-assembly investigated by FM-AFM in liquids

京大院工¹, パナソニック(株)², 京大白眉セ³°木南 裕陽¹, 井戸 慎一郎¹, 木宮 宏和², 小林 圭^{1,3}, 山田 啓文¹Dept. of Electronic Sci. & Eng., Kyoto Univ.¹, Panasonic Corp.², The Hakubi Center, Kyoto Univ.³°H.Kominami¹, S. Ido¹, H.Kimiya², K. Kobayashi^{1,3}, H. Yamada¹

E-mail: h.kominami@piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp

【はじめに】原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy: AFM) は測定環境に対する構造・物性評価法として既に幅広く用いられている。われわれは近年、周波数変調 AFM (FM-AFM) を用いた液中環境下での生体分子のナノスケール分解能イメージングを実現し、plasmid DNA の 2 重螺旋構造の可視化[1]や、2 次元結晶化したマウス由来のモノクローナル抗体 (図 1, Immunoglobulin G: IgG) の高分解能観察[2]に成功している。前回の報告では 2 次元結晶化した抗体分子が特定の抗原との認識機能を保持していることを評価した結果について報告した[3]。今回は、2 次元結晶化した抗体への抗原の吸着サイトを液中 FM-AFM 観察により詳細に評価した。また、上記抗体とは異なる抗原決定基をもつ抗体分子を用いることにより、2 次元結晶化を抑制して 6 量体状態にある抗体と抗原との吸着状態についても観察を試みたので、その結果について報告する。

【実験方法と結果】試料として、ヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin: HSA) を抗原とするマウス由来のモノクローナル抗体 (anti-HSA IgG1, 約 0.3 μ M) を用いた。今回の実験では、2 次元結晶状態にある抗体と、結晶状態にない抗体 (6 量体) を比較するために、従来の抗体に加えて、抗原決定基の異なる結晶度の低い抗体も使用した (ただし HSA 抗原性である点は同じ)。へき開したマイカ基板上へ抗体分子を滴下し、5 分間静置した後に観察溶液を用いて 5 回リンスを行い、抗体分子の基板への吸着を行った。次に、抗原性分子を滴下し、再び 5 分間静置した後に 5 回リンスを行うことで非特異吸着している余剰な抗原性分子を取り除き、液中 FM-AFM 観察を行った。観察溶液には 50 mM $MgCl_2$ を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) を使用した。図 2 に抗体分子が (特異) 吸着した抗体分子 2 次元結晶の FM-AFM 像を示す。基板全体にわたって、多少の欠陥・歪みがあるものの、抗体分子が 2 次元結晶化していることが分かり、吸着した抗原は輝点として観察された。輝点の大きさにばらつきが見られるのは抗原が凝集しているためと考えられる。抗原吸着箇所を Fab 領域 (○)、Fc 領域 (△)、それ以外 (□) に分類すると、明らかに Fab への吸着が多いことが確認できた。一方、図 3 は、結晶度の低い抗体を用いた場合の 6 量体状態にある抗体分子への抗原分子の吸着像である。3 つの 6 量体が見られるが、左上の 6 量体の外枠部分 (Fab 領域) への抗原の吸着が観察された。

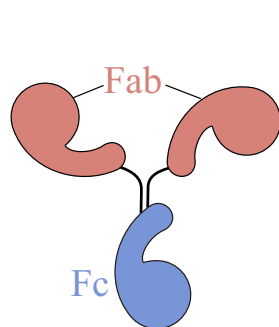


図 1: IgG 単量体のモデル 図 (Fab: Fragment antigen-binding, Fc: Fragment crystallizable).

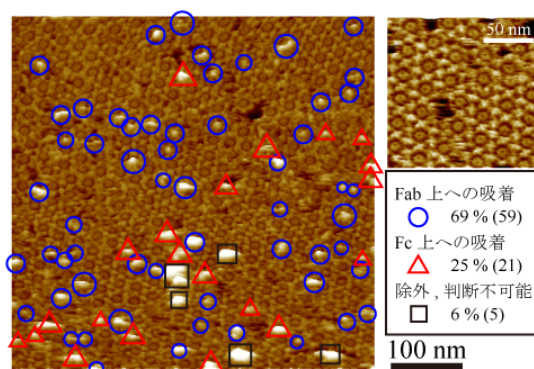


図 2: 抗原を吸着させた後の 2 次元結晶化した抗体分子の液中 FM-AFM 像。Fab 上、Fc 上、それ以外への吸着を円、三角形、四角形で示した。括弧内は個数を示す。(50 mM $MgCl_2$, 10 mM リン酸緩衝液中観察)。右上図: 抗原吸着前の 2 次元結晶化した抗体分子の液中 FM-AFM 像。

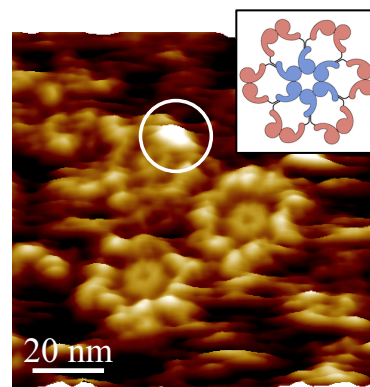


図 3: HSA を抗原とする 6 量体化した抗体分子の液中 FM-AFM 像 (50 mM $MgCl_2$, 10 mM リン酸緩衝液中観察)。インセット: IgG 分子 6 量体のモデル 図。

[1]S.Ido et al, ACS Nano 7, 1817 (2013). [2]S.Ido et al, Nature Mater., in press (2014).

[3]木南他, 2013年秋季 第74回応用物理学会学術講演会, 17a-C6-7.