

Title	オンチップペプチドプローブ合成とin-situ非標識検出によるプログラマブルバイオセンサの開発
Author(s)	Ng, Lightson
Citation	
Issue Date	2015-06
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/12873
Rights	
Description	Supervisor:高村 禪, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏 名	LIGHTSON NG		
学 位 の 種 類	博士(マテリアルサイエンス)		
学 位 記 番 号	博材第 376 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 27 年 6 月 24 日		
論 文 題 目	Development of programmable biosensor by on-chip peptide probe synthesis and in situ label-free detection (オンチップペプチドプローブ合成と in-situ 非標識検出によるプログラマブルバイオセンサの開発)		
論 文 審 査 委 員	主査	高村 禅	北陸先端科学技術大学院大学 教授
		下田 達也	同 教授
		平塚 祐一	同 准教授
		松村 和明	同 准教授
		鈴木 正康	富山大学 教授

論文の内容の要旨

Preparing and combating against for the worst case scenario, much research has been exploited to develop an effective yet simple biosensing system. Even so, the threats to the human race and the existence of others have been increasingly dangerous and endangered. Because of these potential threats, there is a great need for a system that can quickly, reliably, and accurately detect any contaminations in the environment or in the atmosphere. Biosensors have developed in the recent few decades, but these sensors are specific only to specific target molecule. Thus, programmable biosensor is proposed to flexibly use and detect various other target molecules during on-demand situation at any place.

To realize the proposed novel idea of programmable biosensor, simple and effective microchip system to be used for synthesizing peptide is initially developed. Very simple inlet and outlet microchannel with reaction chamber on the microchip is designed. Pillar-like structures at the reaction chamber is incorporated to be more effective while synthesizing peptides on microfluidic chip. The optimal conditions for on-chip peptide synthesis is studied here and successfully estimated. The optimum coupling reaction time for the developed system is 15 min and 5 μ l/min of flow rate is the optimum flow rate. Conventionally, coupling time of peptide synthesis is usually 2-3 hours.

Through vigorous consideration, 'programmable biosensors' is proposed here to flexibly change the target analyte by changing the probe molecule based on on-site and on-demand situation. This may be achieved by synthesizing short peptide as probe molecules on-chip following traditional Fmoc-SPPS strategy. Linear hepta-peptide probe (-NH-PPGQPHH-NH₂) to be synthesised on-chip (optimized coupling time of 15min at 5 μ l/min flow rate) is proposed here in this research and successfully performed in situ detection of the target biomolecule on the same microchip. Highly specific peptide

probe containing HPQ sequence is synthesised on-chip and study the interaction of probe with streptavidin biomolecule.

A novel approach of quick and rapid synthesis of peptides on SPR gold surface is introduced in this research. In this, synthesising a short peptide on SPR sensor chip through surface modification chemically is focused. Short peptide, EYYY, a tetramer is synthesised on the modified CM5 sensor chip directly and study the interaction with an atrazine, a herbicide. Development of very sensitive and massive sample analytical device from around the world has been realised in many different fields.

Keywords: Programmable biosensor, microchip, on-chip SPPS, label-free sensor, Surface plasmon resonance

論文審査の結果の要旨

本論文は、測定対象分子を必要に応じてその場でフレキシブルに変更できるように、プローブ分子として任意の配列のペプチドをその場で合成し、これを用いて測定を行う非標識のプログラマブルバイオセンサの開発に関するものである。

第1章では、プログラマブルバイオセンサの狙いと現状の課題についてまとめ、本論文の目的を示した。

第2章では、ペプチドの合成と検出を同じ場所で実行可能な、ピラーとビーズを用いたシンプルなチップデザインを考案し、より迅速・簡便にプローブの合成を可能とした。

第3章では、2章で開発したチップを用い、HPQ配列を含むペプチドをオンチップで合成し、これを用いて蛍光標識したストレプトアビジンを選択的に測定できることを示した。これまでは親疎水性のようなマクロな性質を用いて、プログラマブルバイオセンサの概念を示した例はあったが、より多くのたんぱく質を認識できる分子の立体構造を用いたバイオセンシングがこの系で可能であることを初めて示した。

第4章は、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いた、非標識のプログラマブルバイオセンサの開発に関するものである。プログラマブルバイオセンサは、一つのセンサで、数千種類の分子を対象にすることを目的としている。標識には分子毎に異なった手順が必要なため、標識が必要な検出系は不利となる。非標識の検出系として SPR があるが、ペプチド合成に用いる強い試薬が市販の SPR 測定系にダメージを与えるため、そのままでは用いることはできなかった。そこでそのような試薬の代わりに、NHS/EDC を用いた水溶性の環境でペプチドの固相合成が可能な新たな系を考案し、ペプチド合成と SPR を両立させることに成功した。また、これにより固相合成過程を SPR でモニターすることが可能になり、より迅速で確実なペプチド合成が可能になった。この系をもちいて、異なるプローブを合成し、アトラジンと免疫グロブリン IgG の選択的な検出ができることを実証した。さらに、固相合成が可能なチップに、SPR 検出系を組み込んだ小型のプログラマブルバイオセンサ検出機を開発し、これを用いても免疫グロブリン IgG の検出

が可能なことを示した。

以上、本論文は、表面プラズモン検出とペプチド固相合成を両立させるための、様々な課題を解決し、非標識のプログラマブルバイオセンサを初めて実現したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。