

〈一般研究課題〉 連続モニタリング可能な新規環境
モニタリングシステムの開発
助成研究者 名古屋工業大学 樋口 真弘



連続モニタリング可能な新規環境 モニタリングシステムの開発

樋口 真弘
(名古屋工業大学)

Research and Development of Novel Environmental Sensing Systems Fabricated by Self-Organization

Masahiro Higuchi
(Nagoya Institute of Technology)

Abstract

We have development of novel environmental sensing tips fabricated by self-organization. Heavy metal ions and proteins were chosen as target molecules for sensing. For the heavy metal ion sensing tip, the self-assembled monolayers of polyethylene glycol (PEG) were prepared on gold deposited glass plates. We investigated the sensing abilities of the PEG monolayers for the various heavy metal ions from the changes in the dielectric constant of the PEG layer caused by multiple weak interactions between the heavy metal ion and the oxygen atoms of PEG layer. Further more, we fabricated the protein sensing tips having multi-recognition and signal transduction ability. The protein tips composed of target protein induced amphiphilic glycopeptides assemblies that act as protein binding site and ion channel in lipid bilayer membrane. The interaction between the sites of the target protein and the terminal glycol-chains of the amphiphilic peptides could induce the specific location of the amphiphilic glycopeptides rod, *i.e.*, formation of specific protein binding site on the membrane and the ion channel in the membrane. The amphiphilic glycopeptides assemblies in the membrane were fixed on an electrode to fabricate a novel sensing device for the target proteins. The recognition ability is monitored by electro-chemical signal which is generated by the ion permeability changes through the membrane on the electrode.

1. 緒言

有害物質や新種ウイルス等の迅速・簡便な環境モニタリングシステムの構築が全世界的に重要視されている。ホスト-ゲスト化学や超分子化学の手法を用いて特定の物質を高感度に認識する受容体は種々報告されているが、これらは各々の認識対象物質に対しその都度、受容体の分子設計・合成を行わなければならない、また、その検出には大掛かりな分析システムを必要とした。本研究では空港等における新規感染症の迅速な初期診断や、家庭でのパーソナルユーズの汚染物質の簡易モニタリングシステムの構築を目的とした。

特定の有害物質を高感度に認識する受容体として、Kitovらは多糖の化学合成により調製した糖クラスターを用い、ペロ毒素を特異的に結合する受容体の構築¹⁾を報告している。しかしながら、これら化学合成による受容体の構築は、各々の認識対象物質に対しその都度、その受容体の分子設計・合成を行わなければならない、迅速なセンシングシステムの構築という観点からは十分なものではない。また、その検出には大掛かりな分析システムを必要としているのが現状である。一方、Cornellら²⁾や、Vogelら³⁾は抗体を結合させたチャンネルペプチドを用い、抗原の結合によるチャンネル孔の閉塞による膜のイオン透過性の変化から、簡便に対象抗原をセンシングするシステムの構築を報告している。しかしながら、これら抗体-チャンネル複合体を用いたセンシングシステムにおいても、物質認識部に抗体を用いており、認識対象物質ごとに、認識部の変換、すなわち抗体の作成が必要であった。

本研究では、環境中の有害物質を、特殊な分析機器を用いず、簡便・迅速にモニタリング可能なセンシングチップを自己組織的に構築し、その認識能と信号発信能に関して検討した。具体的には、重金属イオンイオンの連続モニタリングを目的とした重金属イオンセンサー、及び、多種多様なウイルス検出を目標とした、認識多様性を有するタンパク質センサーの構築と、その評価を行った。

2. 多点での弱い相互作用を利用した重金属イオンセンサー

2.1. はじめに

重金属イオンの人体に与える影響は大きい。重金属イオンによる水質汚染の影響は、肝臓や腎臓障害、最近では、水銀と発達障害や自閉症との関係が注目されている。⁴⁾このような環境汚染による障害を未然に防止するために、環境中の重金属イオンを常時モニタリングするシステムの開発が求められる。既存の環境中の重金属イオン検出法は、操作が煩雑であったり、大型の測定機器が必要であったり、現場に赴かなければ測定ができないなど多くの問題が存在する。そこで本節では、重金属イオンの可逆的な連続モニタリングを目的に、金蒸着ガラス基板表面をポリエチレングリコール(PEG)層で被覆し、重金属イオンと表面PEG鎖の酸素原子との多点での弱い相互作用を用いた、重金属イオンセンシングチップの構築を検討した。同センシングチップはPEG鎖中の酸素原子と対象重金属イオンとの多点での弱い相互作用により錯体が形成され、クラウンエーテル様の包接錯体の形成が期待されるとともに、弱い相互作用を利用しているため、洗浄により、脱離・再生させることが容易となる。これにより繰り返し使用可能な河川、湖沼中の重金属イオンの常時モニタリングシステムとして期待できる。

2.2.実験方法

2.2.1.センシングチップの構築

重金属イオンセンシングチップとして用いた、PEG被覆基板は、以下に従い構築した(Scheme 1-1)。基板表面にポリエチレングリコール鎖を固定化させるため、表面にプロピオン酸の自己組織化単分子膜を形成した。ジチオプロピオン酸のエタノール溶液(6.3g / 30mL)に金蒸着基板を24時間浸漬させ、同基板の上にプロピオン酸の自己組織化単分子膜を形成した。この際、基板には、金蒸着ガラス基板及び、金蒸着水晶振動子を用いた。基板表面に固定化したプロピオン酸の末端カルボキシル基を、スクシンイミド化し、活性化した後、末端アミノ化ポリエチレングリコール(Mw = 50000)の水溶液(1.5mg / 30mL)に24時間浸漬させ、PEG被覆基板を構築した。

2.2.2.センシング能評価

対象とした重金属イオン種は、Cu、Co、Mn、Niとし、それぞれの酢酸塩を用いた。また、環境中でのこれら重金属イオンのセンシングを目的とするため、環境中に多量に含まれる1価の金属イオンとして、Na及びKの塩化物を対照金属イオンとした。

得られた、センシングチップの重金属イオンセンシング能を、表面プラズモン共鳴法を用い、各種金属イオンに対するセンシングチップの結合速度定数、解離速度定数、及び親和定数を求めた。センシングチップには、PEGを被覆した金蒸着ガラス基板を用いた。測定は、表面プラズモン共鳴バイオセンサー(日本レーザー電子(株)製 SPR670型)を用い、各種重金属イオンを含む溶液を、流速30 $\mu\text{L} / \text{min}$ でセンシングチップ表面に流し、このときの共鳴角変化から、算出した。測定温度は、室温25 $^{\circ}\text{C}$ とした。

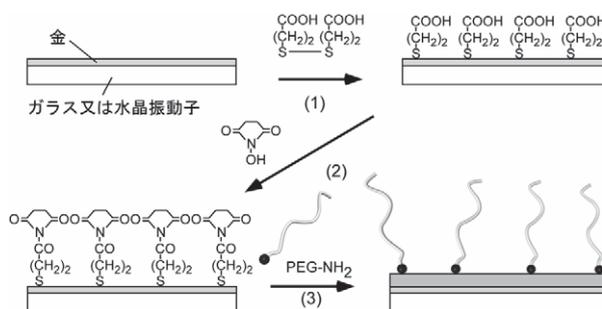
また、環境中での重金属イオンの定量を目的に、水晶振動子マイクロバランス(QCM)測定を行った。センシングチップには、PEG鎖を被覆した金蒸着水晶振動子を用いた。PEG被覆水晶振動子をテフロン製ウェル型セル(SEIKO EG&G(株)製 QA-CL4型)に装着し、水道水でセルを満たした。この溶液中に水道水に溶解させた酢酸コバルト水溶液を種々の濃度で添加していき、この際の周波数変化(Hewlett Packard Co., Ltd. 製 model 53 / 31A)から、センシングチップ表面に結合したコバルトイオンの重量を算出した。

2.3.結果と考察

2.3.1.センシングチップの重金属イオン認識能

図1-1に、PEG被覆金蒸着ガラス基板表面に、0.1mMの酢酸コバルト水溶液を流した際、及び、純水にて洗浄した際の表面プラズモン共鳴角変化量、 $\Delta\theta$ を示した。重金属イオンの添加に伴い $\Delta\theta$ の値は増加し、一定の値、 $\Delta\theta_{\text{eq}}$ (図1-1の矢印)に達した後、洗浄により減少していき、 $\Delta\theta$ は0になり、初期値を回復した。この変化は、他の重金属イオン(Cu, Mn, Ni)でも、観察さ

Scheme 1-1. 金蒸着基板表面へのPEG鎖被覆による、重金属イオンセンシングチップの構築 (1)プロピオン酸自己組織化単分子膜の形成。(2)プロピオン酸末端カルボキシル基の活性化。(3)プロピオン酸末端カルボキシル基とPEG末端アミノ基との縮合。



れ、同チップが、洗浄により再生可能であることが示された。表面プラズモン共鳴角のシフト量は、基板表面に結合した物質質量に比例するので⁵⁾、各重金属イオンに対する、平衡時の表面プラズモン共鳴角のシフト量、 $\Delta \theta_{eq}$ 、をその濃度に対しプロットし、PEG自己組織化単分子膜への吸着等温曲線を得た(図1-2)。比較のため、1価のイオンである、塩化ナトリウム及び塩化カリウムの結果も合わせて示した。Naイオン及びKイオンに関しては、この濃度域で、プラズモン共鳴角のシフト量が非常の少ないのに対し、Cu、Co、Mn、Niの重金属イオンでは有意なプラズモン共鳴角シフトが認められ、飽和型の結合等温曲線を示した。このことは、基板表面のPEG鎖中に重金属イオンに対する特異的な結合サイトが形成されたことを意味する。

そこで、1式の平衡反応を考え、図1-1の重金属イオン結合時の共鳴角の時間変化より、2式を用い、結合速度定数、 k_+ ($M^{-1} s^{-1}$)、解離速度定数、 k_- (s^{-1})、及びその比である親和定数 K (M^{-1})を算出した。ここで、 $[Metal]$ 、 $[PEG]$ 、 $[PEG-Metal]$ はそれぞれ、重金属イオン、PEG中の結合サイト、重金属イオン-PEG複合体の濃度である。

また、重金属イオン-PEG複合体の濃度、 $[PEG-Metal]$ 、は、各時間における共鳴角シフト量、 $\Delta \theta$ 、に比例し、PEG中の全結合サイトは、図1-2における共鳴角シフトの飽和値、 $\Delta \theta_{max}$ 、に比例するとした。⁶⁾

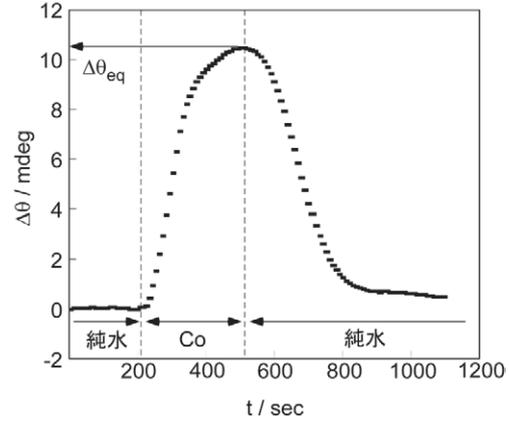


Figure 1-1. PEG被覆金蒸着ガラス基板への酢酸コバルト(0.1 mM)の結合時及び洗浄時の表面プラズモン共鳴角の変化。

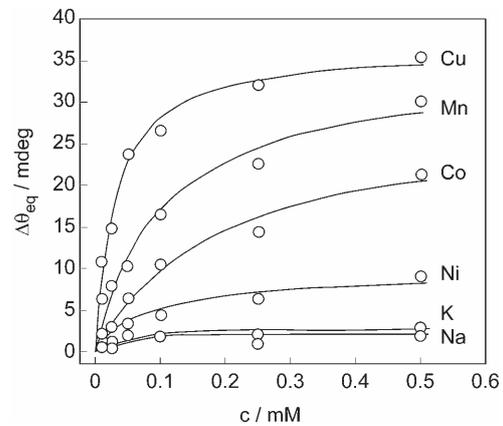


Figure 1-2. PEG被覆金蒸着ガラス基板への各種重金属イオン酢酸塩(Cu, Mn, Co, Ni)及び塩化ナトリウム、塩化カリウムの結合等温曲線。



$$\frac{d\Delta\theta}{dt} = k_+[Metal] \cdot \Delta\theta_{max} - (k_+[Metal] + k_-) \cdot \Delta\theta \quad (2)$$

$$K = k_+ / k_-$$

具体的には、図1-1の重金属イオン結合時の各時間における、共鳴角変化速度、 $d\Delta\theta/dt$ を縦軸に、その時間における共鳴角のシフト量、 $\Delta\theta$ を横軸に再プロットし、その直線の傾き、及び切片より、結合速度定数、 $k_+(M^{-1}s^{-1})$ 、解離速度定数、 $k_-(s^{-1})$ 、及びその比である親和定数 $K(M^{-1})$ を求めた。結果を表1-1にまとめた。表より、PEG層に対する親和定数は、いずれの重金属イオンに対しても、 $10^4 M^{-1}$ オーダーと、比較的高い値を示し、また、解離速度定数も $10^{-3} s^{-1}$ オーダーであり、基板表面のPEG層は、重金属イオンに対し特異的な結合サイトを形成し、さらに、結合した、重金属イオンは、洗浄により比較的たやすく脱離することが分かった。

Table 1-1. PEG 被覆金蒸着ガラス基板への各種重金属イオン酢酸塩(Cu, Mn, Co, Ni)結合速度定数, k_+ ,解離速度定数, k_- ,及び親和定数, K 。

	$k_+ / M^{-1} s^{-1}$	k_- / s^{-1}	K / M^{-1}
Cu	1.7×10^2	3.8×10^{-3}	4.5×10^4
Co	5.2×10^2	9.1×10^{-3}	5.7×10^3
Mn	5.2×10^2	5.7×10^{-3}	9.1×10^3
Ni	6.2×10^1	6.2×10^{-3}	1.0×10^3

2.3.2. 水道水中の重金属

イオンの認識

そこで、実際の環境中での重金属イオンのセンシング能を評価するために、水道水中の重金属イオンのセンシングを試みた。これは、先に、図1-2に示したように、PEG層は、1価の金属イオンに対しては、ほとんど結合能を示さないことから、実環境(水道水)での重金属イオンのセンシングが可能ではないかと考えたためである。測定は、水道水を用い、種々の濃度に調整した酢酸コバルト溶液に、PEG被覆水晶振動子を浸漬させ、平衡吸着時の周波数変化から、Sauerbrey式⁷⁾を用い、単位面積当たり結合した、酢酸コバルトの質量を求めた。結果を図1-3に示す。PEG層は、水道水中のコバルトイオンを μM オーダーの濃度(酢酸コバルト換算で、数mg/L)で濃度に対し線形的に吸着し、その実環境中でのセンシングが可能であることが示された。

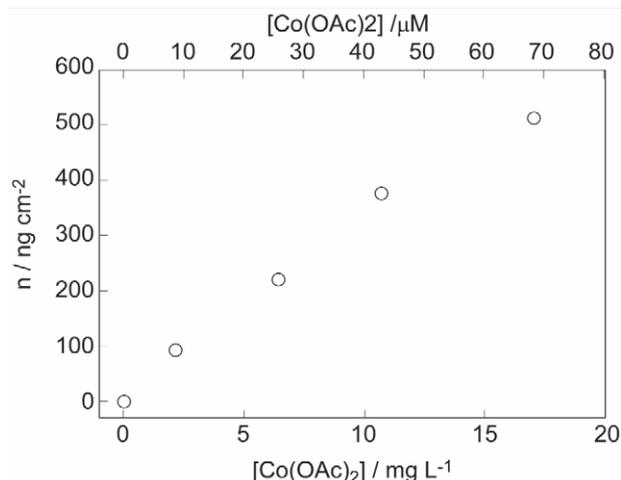


Figure 1-3. PEG 被覆金蒸着水晶振動子表面への、水道水中の溶解させた酢酸コバルトの結合量。

今後は、表面PEG鎖の密度を最適化することにより、より高いセンシング能を有する重金属イオンのセンサー構築の可能性が期待される。将来的にはフォトリソグラフィーにより形成される凹凸構造中にPEG層を形成させたセンシングチップの構築を目指す。これは重金属イオンを捕捉したPEG層の誘電率変化を構造色変化として視覚的に検出することを目的とするものである。

3. 標的タンパク質により誘起される、認識多様性を有するタンパク質センサー

3.1.はじめに

空気中には様々なウイルスが存在し、その人体への感染は世界的に深刻な問題となっている。これらウイルス及び、新型ウイルスによる疾病の早期診断のための迅速・簡便で高感度なセンシ

ングシステムの構築が全世界的に重要視されている。現在一般的なセンシングデバイスは、ELISA法に代表される人体の免疫機能と関連のある抗原と抗体の相互作用を用いた系が多く、これは高い特異的認識能を有するという利点がある半面、標的物質特有の抗体をその都度調製する必要があるため、まずは標的物質の構造を明らかにしなければデバイスを構築できない。また、認識情報を変換、発信、視覚化するためには大規模な装置や特別な施設が必要である場合が多い。そこで本節では、簡便に構築可能で、空港や家庭等で使用でき、迅速に結果を得ることの出来る高感度なセンシングデバイスの構築を目指した。

具体的には、生体機能を模倣し、物質、特にタンパク質を認識対象とし、その認識部位として糖ペプチドクラスターを、信号変換部位としてイオンチャンネル構造を、簡便な手法を用い、脂質二分子膜中に構築することを試みた。これは、標的タンパク質の糖ペプチドクラスターへの再結合に伴うチャンネル孔の閉塞を利用して、タンパク質認識情報をイオン透過性の変化という電気化学信号への変換を試みるものである。

3.2.実験方法

3.2.1.試料

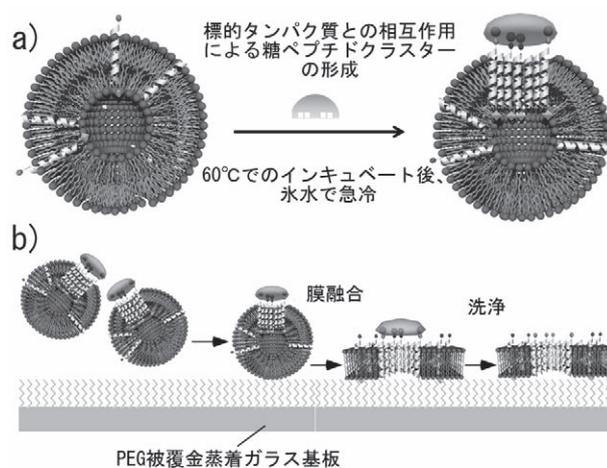
チャンネル形成能を有する両親媒性糖ペプチドは、DeGradoのアミノ酸シーケンス⁸⁾を用い、親水性のセリン(S)と疎水性のロイシン(L)より成る(L-S-S-L-L-S-L)₃(LS)を固相法により合成し、C末端にグルコース(Glc-LS)或いはガラクトース(Gal-LS)を導入した。また、糖ペプチドクラスター形成時のスペーサーとして、ロイシン21量体(Leu₂₁)も同様に合成した。

認識対象のタンパク質には、Glcを選択的に認識するコンカナバリンA(ConA)と、Galを選択的に認識するピーナッツレクチン(PNA)を用いた。また、対照タンパク質として、糖鎖と特異的な結合能を持たないタンパク質として、牛血清アルブミン(BSA)を用いた。

これら3種のペプチド(Glc-LS, Gal-LS, Leu₂₁; モル比1:1:8)と、L- α -ホスファチジルコリンジパルミトイル (DPPC)(DPPCと全ペプチドとのモル比100 : 1)をフラスコ中でクロロホルムに完全に溶解させた後、溶媒を蒸発させ、壁面に薄膜を形成させた。この薄膜を、0.1 M HEPES-Tris, pH 7.2緩衝液に水和分散させ後、超音波照射によりペプチド含有ベシクルを形成した。DPPCの終濃度は0.2wt%とした。

3.2.2.標的タンパク質との相補的相互作用による受容体構造の形成

ペプチドを含むベシクルを、そのゲル-液晶転移温度以上に加熱すると、脂質二分子膜の流動性が増し、ペプチドは容易に膜中を側方拡散する。ペプチド末端の糖鎖と特異的に相互作用するタンパク質が存在する場合、同糖ペプチドは膜中で再配列し、対象タンパク



Scheme 2-1. a):ベシクル中での標的タンパク質とペプチド末端糖鎖との相補的相互作用による、糖ペプチドクラスター形成の模式図。 b):PEG被覆金蒸着基板表面への膜融合法による、糖ペプチドクラスターを含む二分子膜の固定化。

質を特異的に認識する糖ペプチドクラスターの形成が期待できる。このことを利用し、標的タンパク質に対する認識部位として糖ペプチドクラスターの形成を試みた。PNA認識能を有する糖ペプチドクラスターの形成を以下に示す。先に形成した3種のペプチドを埋め込んだベシクル溶液に、標的タンパク質であるPNAを加え、DPPCのゲル-液晶転移温度(41℃)以上である60℃にて15分間インキュベートした後、氷水中で冷却し、ベシクル二分子膜中にPNAに固有な糖ペプチドクラスターを固定化した(Scheme 2-1a)。

3.2.3. センシングチップの構築

センシングチップの構築は以下に従って行った。1-2節で用いたPGE被覆金蒸着ガラス基板表面に、PNAに固有な糖ペプチドクラスターを含むDPPC二分子膜を膜融合法⁹⁾により、固定化した。ここで、PEG層は、チャンネルとして機能する糖ペプチドクラスターを介して透過した、イオンのリザーバーとして用いた。PNAにより誘起されたガラクトース糖ペプチドクラスター集合体を含むベシクル溶液に、上記PGE被覆金蒸着ガラス基板を浸漬させ、24時間、温和な条件下で放置することで、PEG層表面に、PNAにより誘起されたガラクトース糖ペプチドクラスターを含む二分子膜層を形成、固定化した(Scheme 2-1b)。その後、PNAを取り除く目的で、同基板を 8.33×10^{-4} Mのガラクトースを含む緩衝液で満たしたシャーレに浸し、24時間振とうさせた後、緩衝液で数回洗浄した。

3.2.4. センシング能評価

両親媒性糖ペプチドは集合体を形成する際、脂質二分子膜中でその親水部分を互いに向け合い疎水性部分を脂質側に配向させ、膜を貫く安定なチャンネルを形成する。標的タンパク質の認識情報を同タンパク質によって誘起されるチャンネル孔への、タンパク質の再結合に伴う膜を介するイオン透過性の変化として検出した。測定は、PNAにより誘起されたガラクトース糖ペプチドクラスター集合体を含むDPPC二分子膜を固定化した、PGE被覆金蒸着ガラス基板を作用電極として、三電極法を用い、一定電圧印加時(-50mV)の電流値を読み取った。電流値の減少量は、PNAの再結合に伴うチャンネル孔の閉塞として、イオン透過性の減少、すなわち電流値の減少度より、センサーとしての可能性を評価した。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 糖ペプチド末端糖鎖と標的タンパク質の相補的相互作用に基づくクラスターの形成

ペプチド末端の糖鎖とタンパク質との相補的相互作用によるクラスター形成は、ペプチドN末端に導入したピレニル基のエキシマー発光により評価した。ピレニル基は会合体を形成すると、480nm付近にエキシマー発光に基づく蛍光を発することが知られている。この性質を利用し、タンパク質添加により、膜中で形成される糖ペプチド会合体を、その末端ピレニル基のエキシマー発光強度とモノマー

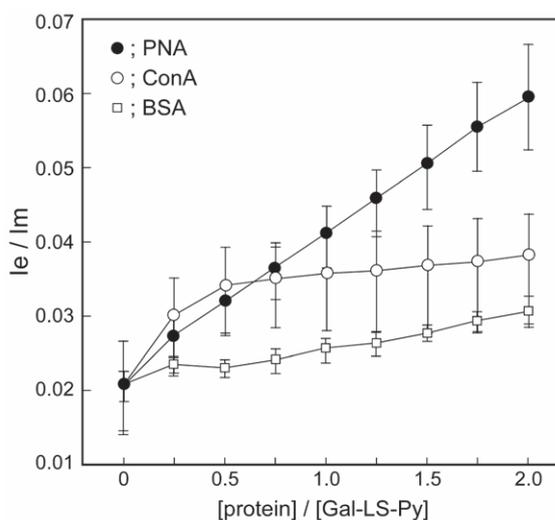


Figure 2-1. Gal-LS-Py, Glu-LS, Leu₂₁ を含む DPPC ベシクル溶液の I_e/I_m とタンパク質(PAN, ConA, BSA)添加量との関係。値は、3回の測定の平均値

発光強度の比より評価した。Galを有する両親媒性ペプチドの末端にピレニル基を導入したペプチドを含むベシクル(Gal-LS-Py, Glu-LS, Leu₂₁をモル比で1:1:8含む)溶液に、PNAをGal-LS-Pyに対し、種々のモル比で添加した場合の、376nmのピレンのモノマー発光に対する、480nmのエキシマー発光強度の比、 I_e/I_m を図2-1に示した。比較のため、Gluに対し特異的なConA及び、糖鎖とは相互作用しないBSAを添加した際の結果を併せて示す。PNA添加により I_e/I_m 値が特異的に増加しているが、ConA及びBSAを添加した場合は、その値に顕著な変化は見られなかった。この結果は、PNAにより膜中のGal-LSが会合体を形成した

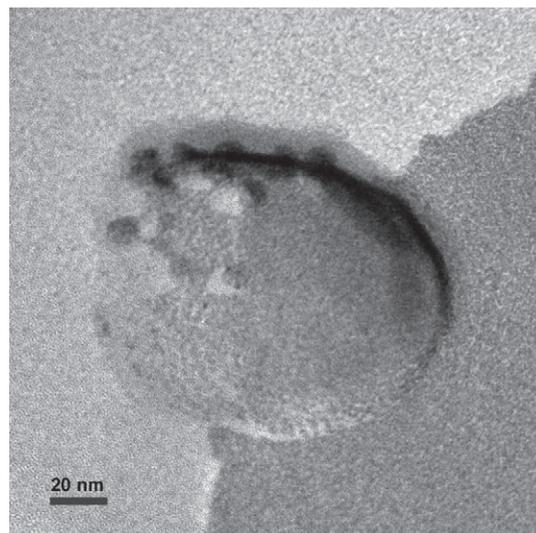


Figure 2-2. PANによりベシクル二分子膜中に形成されたGal糖ペプチドクラスターより成る膜内粒子のTEM画像。

ことを示唆するものである。そこで、膜中のペプチド集合体の形態を直接観察するために透過電子顕微鏡(日本電子(株)JEM-z2500)観察を行った。PNAをGal-LSに対しモル比で2.0添加したベシクル溶液を、凍結切断レプリカ作成装置(日本電子(株)製JEFII)を用い、ベシクルの切断面のレプリカ膜を作成し、加速電圧100kVにて、観察を行った。図2-2に示すように直径8nm程度の膜内粒子が複数観察された。以上の結果より、認識対象とするタンパク質、PNA、はベシクルに埋め込んだ両親媒性糖ペプチドの特定の末端糖鎖、Gal、と特異的に相補的相互作用することで同タンパク質を認識し、膜内でのペプチドの再配列を誘起させることでPNAに固有のGalペプチド集合体を形成することが明らかとなった。

3.3.2.両親媒性糖ペプチドクラスター固定化センシングチップのタンパク質認識能の評価

前節において、標的タンパク質,PNA,により、ベシクル二分子膜中に誘起された両親媒性糖ペプチドクラスターを、PEG被覆金蒸着ガラス基板表面に、膜融合法を用い固定化し、同タンパク質のセンシングチップを構築した。融合により、脂質二分子膜が金電極表面上を欠陥なく被覆していることを確認するため、QCM測定とサイクリックボルタンメトリー(CV)を行った。測定にはペプチドを含まないDPPCベシクル溶液に、PEG被覆金蒸着水晶振動子を浸漬し、DPPC二分子膜の膜融合を行った。QCM測定の結果より、基板上的DPPCの質量は108.50ngであった。DPPC1分子の占有面積は0.47nm²、金付着振動子の面積は19.625mm²より、DPPC二分子膜が一層で欠陥なく金付着振動子表面を被覆していると仮

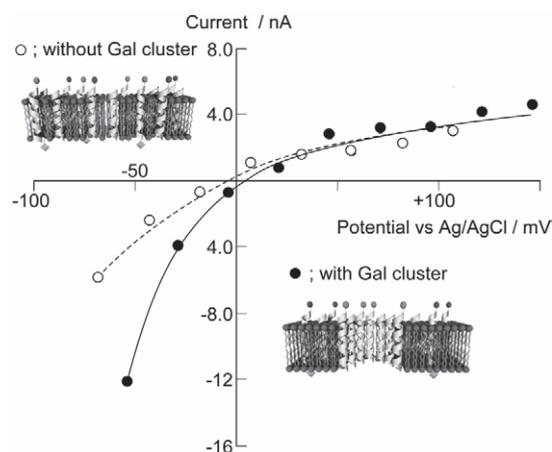


Figure 2-3. PANにより誘起されたGal糖ペプチドクラスターを含む(●; with Gal cluster)及び含まない(○; without Gal cluster) DPPC二分子膜を固定化した電極のI-V特性。

定して計算すると、101.83 ngである。以上の結果より、基板にDPPCの二分子膜層が一層に形成されていることがわかる。また、電解質にフェロシアン化カリウムを用い、同基板を作用電極とした、CVでは、酸化還元ピークが認められないことから、DPPC二分子膜はフェリシアン化物イオンほどの大きさの大きな欠陥はなく、基板表面を被覆していると考えられる。

本研究で用いた糖ペプチドのアミノ酸シーケンスには、両親媒性 α -ヘリックス構造を形成するよう分子設計されていることから、標的タンパク質により誘起された糖ペプチドクラスター中には、チャンネル様構造体の形成が期待されている。そこで、糖とタンパク質との相補的相互作用により形成する糖ペプチドクラスター中のチャンネル様構造体の活性を評価するため、膜融合法により得られた両親媒性糖ペプチドクラスター固定化センシングチップを作用極とした、電流-電圧(I-V)測定を行った。比較のため、糖ペプチドクラスターを形成させていないDPPC二分子膜を被覆した電極を作成し、同様にIV測定を行った。PNAにより誘起されたGal糖ペプチドクラスターを固定化した電極は、形成させていない電極と比較し、マイナス電位印加時に大きな電流応答を示した。これは、脂質二分子膜を貫く糖クラスター集合体中に、チャンネル様のイオン透過路が形成されており、マイナス電圧印加時に電解質中のカチオンがDPPC二分子膜中のチャンネル様の糖ペプチドクラスターを介して透過し、比較的大きな電流応答が見られたと考えられる。

これまでに、DPPC二分子膜中で、両親媒性糖ペプチドは、標的タンパク質と末端糖鎖との相補的相互作用により再配列して集合体を形成し、得られた糖ペプチドクラスターはチャンネル活性を有することを明らかにした。本節では、タンパク質認識情報を、膜を介するイオン透過性の変化に基づく電気化学情報に変換することによる、簡便・迅速なセンサーとしての機能の発現を評価した。一定電圧-50mV印加時、電解質にタンパク質を種々の濃度で添加し、糖ペプチドクラスター内のチャンネル孔を介するイオン透過性変化によって起こる、電流値の変化を読み取った。

ガラクトース糖クラスターへのPNAの再結合による電流値の変化を図2-4に示した。破線は

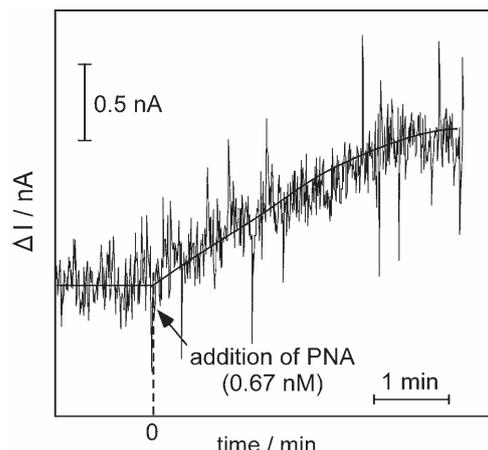


Figure 2-4. PNA で誘起したガラクトース糖クラスターを含む DPPC 二分子膜固定化電極の、PNA 添加による電流応答。PNA 添加濃度 0.67 nM、印加電圧 -50 mV。

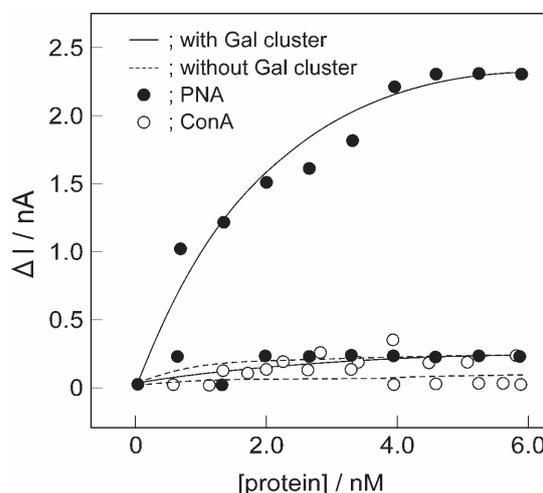
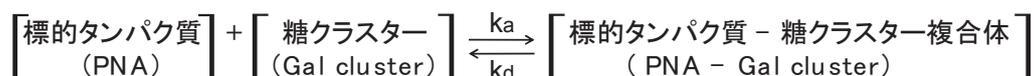


Figure 2-5. PNA により誘起されたガラクトース糖ペプチドクラスターを含む二分子膜固定化電極(実線)及び、クラスター形成前のペプチド含有 DPPC 二分子膜固定化電極(点線)の PNA (●: 標的タンパク質) 及び、ConA (○: 対照タンパク質) 添加に伴う電流応答。印加電圧 -50 mV。

PNAの添加時を示しており、PNAの添加濃度は、2.64 nMとした。PNA添加後に、電流が減少し、最終的に飽和する様子が確認された。この操作を、タンパク質濃度0から6 nMの範囲で行った。電極にはPNAに誘起された、ガラクトース糖クラスターを固定化した電極と、同種類のペプチドを含むがPNAにより糖クラスターを誘起させていない電極の2種類を用いた。結果を図2-5に示す。比較のため、対照タンパク質としてConAを添加した際の電流値変化も併せて示した。PNAに誘起された、ガラクトース糖クラスターを固定化した電極にPNAを添加した場合、PNAの再結合により、チャンネルを栓のように塞ぎ、電流値の減少が認められ、この減少量は、PNAの濃度に対し飽和する傾向を示した。一方、PNAにより誘起されたガラクトース糖ペプチドクラスターを形成させた電極に、対照タンパク質であるConAを添加した場合、及び、Gla糖クラスターを形成させていない電極に、標的タンパク質であるPNA及び、ConAを添加した場合には、いずれも電流値の減少は認められなかった。この特異で顕著な電流値の減少は、構築したデバイスが高いPNA認識能を持つことを示唆している。

標的タンパク質の糖クラスターへの再結合に伴う電流値の減少は、標的タンパク質(PNA)がガラクトース糖クラスター集合体に結合し、複合体を形成する次式の平衡反応を考え、標的タンパク質の糖クラスターへ親和定数を求め、認識能の特異性の評価を行った。ここで、kaとkdはそれぞれ、結合速度定数、解離速度定数であり、その比、ka/kdが親和定数K (M⁻¹)である。



ここでは応答電流の減少量とPNAとガラクトース糖クラスターが結合した複合体の濃度が比例すると仮定した。一般的な単糖とレクチンとの親和定数は10³から10⁴⁻¹⁰であるのに対し、本研究で構築した標的タンパク質で誘起させた糖ペプチドクラスターを固定化したデバイスは5.08 x 10⁸の親和定数を持つことから、非常に高い認識能を持つことがわかった。また抗原抗体反応の親和定数が10⁶から10⁹ということから、抗原抗体反応と同レベルの認識能を有することが示唆された。この原因には、標的タンパク質により誘起させたクラスターを用いていることから、認識部位が各標的タンパク質特有の空間配置を持ち、標的タンパク質中の多数の結合サイト (PNAの場合4個) と、糖ペプチドクラスター中の糖鎖と多点での相互作用が可能であるためと考えられる。

本研究で用いた手法では、標的タンパク質の添加により、自発的に情報の認識部位及び、変換・発信部位を形成させるため、同じ材料を用いて自己組織化的に様々なタンパク質に対応するセンシングチップの作成が可能という利点がある。また、認識部位の形成と同時に、両親媒性ペプチド部分が情報の変換・発信部位として機能するチャンネル構造を形成するため、従来、特別な施設や大型装置を必要としていた認識情報の変換も、電気化学的手法により簡便・迅速に行うことができるという利点もある。これら利点と、簡便な手法により構築可能である点から、未知の毒物やウイルスに対して簡便・迅速なセンシングデバイスとしての可能性が期待される。

4. 結言

本研究では、環境中の有害物質を、迅速、且つ、簡便に検出可能な、センシングデバイスを自己組織化手法を用いて構築した。重金属イオンのセンシングデバイスでは、感度的には、最適化の必要があるものの、実環境において、連続センシング可能な、センシングチップの構築に成功した。また、未知ウイルスの検出を目的とした、タンパク質センシングチップでは、標的タンパク質との相互作用により形成される両親媒性糖ペプチド集合体を、受容部及び情報変換部として用いることにより、抗原-抗体反応と同程度の高い認識能を有し、その認識情報を単純な電気信号として取り出すことに成功した。今後は、実際の使用を念頭に置いた、センシングチップの安定性の向上等が必要である。最後に、本研究機会を頂いた、日比科学技術振興機構ならびに、実際の実験を行っていただいた、名古屋工業大学 樋口研究室の学生諸君、特に、荒井麻央・近藤伸哉両君に、深く感謝いたします。

参考文献

- 1) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, and D. R. Bundle, *Nature*, 403, 669 (2000).
- 2) B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. G. King, D. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wieczorek, and R. J. Poce, *Nature*, 387, 580 (1997).
- 3) S. Terrettaz, W.-P. Ulrich, R. Guerrini, A. Verdini, and H. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 1740 (2001).
- 4) <http://www.synapse.ne.jp/~shinji/jyajya/wadai/suigin02.html>
- 5) C. F. Eagen and W. H. Weber, *Phys. Rev. B*, 19, 5068 (1979).
- 6) M. Higuchi, T. Koga, K. Taguchi, and T. Kinoshita, *Langmuir*, 18, 813 (2002).
- 7) B. R. Dorvel, H. M. Keizer, D. Fine, J. Vuorinen, A. Dodabalapur, and R. S. Duran, *Langmuir*, 23, 7344 (2007)
- 8) W. F. Degrado et. al., *Science*, 243, 622 (1989).
- 9) L. Zhang, M. L. Longo, and P. Stroeve, *Langmuir*, 16, 5093 (2000).
- 10) Y. Miura, *The Chemical Times*, 214, 6-11 (2009).

