

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：82626

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20106008

研究課題名（和文）3次元ナノ相分離膜構造と高感度分子認識能の動的解析

研究課題名（英文）3-Dimensional Nano Structured Interface for Detecting Carbohydrate and Protein Weak Interactions and its Dynamic Response Analysis

研究代表者

佐藤 縁（SATO YUKARI）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員

研究者番号：40357132

研究成果の概要（和文）： 生体分子を感度よく選択性よく検出するために、生体分子の持つ特異的な相互作用を利用する 경우가多く、分子認識の場であるソフトインターフェースの設計と構築、利用が大変重要である。本研究では、現行では抗原抗体反応のように利用することが難しかった糖鎖-タンパク質（レクチン）の相互作用を取り上げ、基板上に積極的にナノ相分離構造を有する分子認識界面を構築することで、弱い相互作用でも抗原抗体反応のような取り扱いができることを実証した。膜の動きに着目し、新規に非特異吸着抑制材料を採用するとともに、外部刺激による膜全体の動きを利用した高感度検出も実施した。

研究成果の概要（英文）： Carbohydrate-protein interactions are not strong but they are very important in terms of specific recognition in vital functions. Although it is very easy for thick polyvalent layers to interact with target molecules, the thickness, bulkiness, and heterogeneity of the reaction layers pose serious problems in terms of quantitative analysis and realizing rapid reactions. It will be a challenge to form a thin layer with a polyvalent recognition ability. We investigated the processing of a nanostructured recognition site for sensing lectin, Concanavalin A (Con A), by using self-assembled monolayers (SAMs) consisting of artificial carbohydrate and OH terminated filling molecules formed on a gold substrate. We prepared carbohydrate ligands for recognition of lectins/galectins and tri (ethylene glycol) terminated short alkanethiol molecules for constructing ultra thin protein resistant monolayers on a gold surface. Electrochemical active molecules were combined with carbohydrate terminated molecules, and the mixed monolayer was adopted to detect weak interaction between the carbohydrate and lectins much easily.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2010年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2011年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2012年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
総計	44,100,000	13,230,000	57,330,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：ソフト界面、分子認識、自己組織化膜、糖、レクチン、表面プラズモン共鳴、金電極

## 1. 研究開始当初の背景

固体基板表面上への有機薄膜構造体構築技術としての自己組織化単分子膜法は、1980年代より、Sagivらによりシリコン- $O$ 系の結合を利用した膜形成、続いてNuzzoとAllaraによる金-S結合を利用した膜形成が報告され、これらを契機として急速に発展し、化学的にも物理的にも安定な膜形成法として各方面に幅広く導入されてきた。末端に機能性官能基として酸化還元能、親疎水基、光応答性基などの導入も行われ、現在では簡便で安定な基板修飾方法の一つとして定着している。膜の機能評価法として、走査型トンネル顕微鏡 (STM) 観察、赤外分光法による評価、電気化学法による評価などが考案されてきたが、これらは「単一分子からなる均一系の膜」、基板も主として「金表面」上というごく限られた系の評価には有効であるという状況であった。

## 2. 研究の目的

生体分子を直接認識する人工修飾薄膜分野において、高分子膜修飾と合わせて上記自己組織化単分子膜修飾が採用されてきている。目的の生体分子を効率よく認識するためには、1) 認識部位 (膜側) - 生体分子 (検出側) との相互作用がきわめて弱い場合が多いこと、2) 夾雑物質の影響を排除する必要があること、3) 生体分子が膜構成分子に比較して非常に巨大な分子である場合が多い、等を考慮して 認識膜を構築する必要がある。

効果的な生体分子認識系の構築のために、認識部位を有する分子と非特異的な吸着を抑制する分子とでハイブリッド膜を構築し、生体分子の検出を行った。ハイブリッド単分子膜が生体分子の認識に有効であることについては研究例がいくつかあったが、単分子膜内の縦横方向においてどのように認識部位を分散させた場合により高い分子認識能を有するののかについて系統立てての研究は未だほとんどなされてい

い状況であった。基板材料の方も、非特異的な吸着が起こりにくく汎用性のあるカーボン材料等新規な材料が開発されてきているが、これを生体分子認識分子層構築の基板材料として積極的に利用している例はほとんど見られず、複合膜構造と機能発現の評価技術については金-アルカンチオール均一系単分子膜ほど進んでいない。単一分子による薄膜については各種分光手法・知見も蓄積されてきているが、複合膜の系では金-S-アルキル単分子層に用いられてきた手法そのままを採用できない場合が多く、3次元ナノ構造の有用性を動的な分子膜構造変化から明らかにしていく必要もあった。そこで、基板上への認識分子・非特異吸着抑制分子からなるハイブリッド膜が生体分子 (タンパク質) の高感度認識において有効であることを実証し、この薄膜の有するセンシング能や基本特性について詳細に検討し、新規基板材料の検討、分子認識薄膜の分子層・認識機構の新規評価法の確立等を進めていくこととした。

## 3. 研究の方法

まず、モデルレクチンである、Con A を認識する分子としてマルトシドドデカンチオール分子 (Ma1C12SH) を合成、精製して実験に用いた。このほか、疾病マーカーとして期待される、ガレクチン類 (ガレクチン-3, 4, 8 他) も使用し、これを認識するラクトシド末端アルカンチオール類なども用いた。金基板へのタンパク質の非特異的な吸着を抑制する分子として、親水性の高い分子が効率的に非特異吸着抑制能を発揮する場合が多いことから、まず各種アルキル鎖長の水酸基末端チオール類 ( $\text{HO}C_n\text{SH}$ ,  $n=2, 4, 6, 8, 12$ ) を用いた。さらに非特異吸着を防ぐ分子として、トリエチレングリコールを含む各種アルカンチオール類 ( $\text{TEG}C_n\text{SH}$   $n=2, 4, 6, 8, 11$ ) を新規に設計し、合成して用いるとともに、電気化学活性基入りのスペーサ分子として、各種鎖長のフェロセニルアルカンチオール類も

用いた。Con A の吸着量は Biacore T-100 による相互作用解析、あるいは dualSPR (NTT-AT 社製) により検出した。また、電気化学水晶振動子マイクロバランス法、電気化学手法等も取り入れ、膜の基本的性質についてもあわせて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖鎖分子-無関係分子とのハイブリッド膜 ナノ相分離膜構築によるレクチンの認識

糖とレクチン (タンパク質) の相互作用は、抗原-抗体の相互作用などと比較すると大変弱いものであり (解離定数  $KD$ : 糖-レクチン ( $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$  程度)、抗原-抗体 ( $10^{-9}$  程度))、特異性の高い相互作用であっても、これを利用しての基板での検出については非常に困難であった。このような弱い相互作用の系でも、①レクチン認識部位

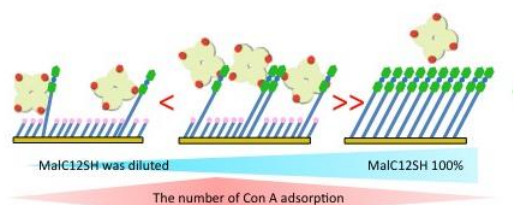


図 1. 水酸基末端チオール (スペーサー分子) とレクチン認識分子 (糖鎖) との混合膜上でのレクチン (Con A) 認識のモデル図。

(糖鎖) を膜内で認識にあずからない無関係分子 (スペーサー分子) で大きく希釈すること (5-10% 程度までの希釈)、②レクチン認識部位 (糖鎖) の周りを非特異吸着抑制能の高いスペーサー分子で緻密に埋めること、③非特異吸着抑制分子 (スペーサー分子) の基板面より垂直方向の高さは、レクチン認識部位 (糖鎖) よりも (CH<sub>2</sub>) の単位で 4-6 単位分低く設定すること、などの工夫により比較的高感度に検出できることを実証できた (図 1)。

レクチンを認識する糖鎖部分の存在割合を認識膜内でナノ構造レベルで制御することで、弱い相互作用も十分検出できることを確認した。

##### (2) 非特異的な吸着を抑制するための分子設計と利用

感度を下げる直接の原因となる、基板および認識部位以外への非特異的なタン

パク質の吸着 (ノイズ応答) をできるだけ防ぐため、スペーサー分子として当初用いていた水酸基末端チオール分子から、積極的に吸着抑制が期待できる短鎖エチレングリコール含有分子を用いることとした。エチレングリコールユニット数 3 のトリエチレングリコール基と、緻密に膜構成が可能な直鎖アルカンチオール ( $n=2, 4, 6, 8$ ) を併せ持つ分子 (TEGCnSH) を合成し、まずこの分子単独で分子層を構築し、非特異吸着抑制能を検討した。膜構成に直接関与する、アルカンチオール鎖が長くなるにつれて単位面積あたりの

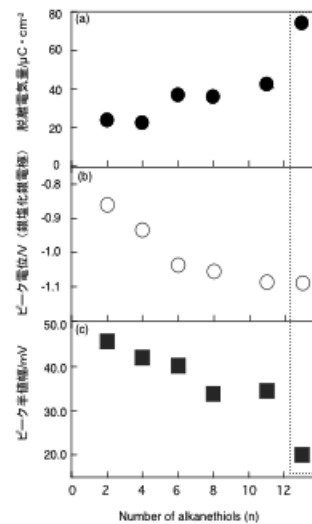


図 2. TEG チオールのモデル図 (上部) と、各種 TEGCnSH 膜の電気化学特性。(a)脱離電気量、(b)脱離電位、(c)ピーク半値幅..

吸着分子数が増加し、分子間の相互作用も強固になり、分子の吸着形態も単一になってきており、より緻密な膜構築が行われていることを確認した (図 2)。この分子は緻密に膜構築されているため、従来の高分子材料では抑えにくかった低分子量のペプチド分子 (分子量 400 程度) も、高分子量の生体分子 (分子量数十万) も僅か単分子層一層で完全に抑えられることを確認できた。

TEGCnSH 分子膜は、高分子 PEG 類 (分子量: 1000~数万等) では抑えきれなかった

ペプチド等の小さい分子も効率よく抑制できることが確認できたので、さらにこの分子膜が持つ分子ふるい的な特性に注目し、電気化学的免疫手法と組み合わせて生活習慣病マーカーであるレプチンの検出にも成功した。

### (3) 電位の有無とレクチンの認識能の変化

フェロセン基に代表される電気化学活性基を末端等に有するアルカンチオール分子は、膜形成後、電位を変化させることで膜厚や分子配向なども大きく変化するので、これをスペーサー分子として新規に利用した。糖鎖分子の周りに、非特異吸着抑制分子の代わりに、スペーサー分子としてフェロセン基含有アルカンチオール分子を配置し、電位変化で膜構造を変化させ、この現象と糖鎖で起こるレクチンとの認識の効果の関係を詳細に検討した。糖鎖分子とフェロセン基入り分子の割合を変え、各種割合でのハイブリッド膜を作製した。フェロセンが酸化される電位 (+0.5V vs Ag/AgCl) を基板に与え、Con A の吸着について検討したところ、電位印加がない場合と比較して、マルトシドの認識が十数倍に高まることが確認できた。これは、電位を与えることで膜構造が変化し、レクチンとの相互作用の応答をより検出しやすくなったものと考えられる。

以上、次の生体分子認識系として注目されている、抗原抗体反応に変わる、糖鎖-レクチン間の弱い相互作用を基板表面にて検出する手法の確立ができた。基板表面で弱い相互作用を検出する際、認識薄膜の設計と構造が重要であり、ナノ相分離薄膜を作製することで、解離定数が大幅に小さくできることを確認し、抗体での認識に近い値で検出が可能となった。さらなる高感度検出を目指して、ノイズ応答を下げるために、新規に非特異吸着抑制のための小さな分子 (TEGCnSH) を設計し、これをスペーサー分子として用いることにより、膜内で動きを確保でき、糖でのレクチン認識量が増大したほか、非特異的な吸着をわずか一分子層で完全に押さえることができることを確認できた。さらに、全く新規に電気化学手法を取り入れ、糖鎖を含む膜全体を電位変化で動かすことにより、糖鎖での

認識ポイントをより検出しやすい状態にでき、結果として従来よりもさらに1桁以上の高感度検出が実現可能となった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- (1) Y. Sato, K. Yoshioka, T. Murakami, S. Yoshimoto, and O. Niwa, "Design of Biomolecular Interface for Detecting Carbohydrate and Lectin Weak Interactions", *Langmuir*, 28, 1846-1851 (2012).
- (2) T. Nishimura, Y. Sato, M. Tanaka, R. Kurita, K. Nakamoto and O. Niwa, "Bifunctional tri(ethylene glycol) alkanethiol monolayer modified gold electrode for on chip electrochemical immunoassay of pg level leptin", *Anal. Sci.*, 27, 465-469 (*Cover & Hot article*) (2011).
- (3) T. Murakami, K. Yoshioka, Y. Sato, M. Tanaka, O. Niwa, and S. Yabuki, "Synthesis and galectin-binding activities of mercaptododecyl glycosides containing a terminal beta-galactosyl group", *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 21, 1265-1269 (2011).
- (4) M. Tanaka, T. Sawaguchi, Y. Sato, K. Yoshioka, O. Niwa, "Surface Modification of GC and HOPG with diazonium, amine, azide, and olefin derivatives", *Langmuir*, 27, 170-178 (2011).
- (5) K. Yoshioka, Y. Sato, T. Murakami, M. Tanaka, and O. Niwa, "One-step Detection of Galectins on Hybrid Monolayer Surface with Protruding Lactoside", *Anal. Chem.*, 82, 1175-1178 (2010).
- (6) K. Yoshioka, Y. Sato, M. Tanaka, T. Murakami, and O. Niwa, "Suppression of Non-specific Adsorption Using Densified Tri(ethylene glycol) Alkanethiols: Monolayer Characteristics Evaluated by Electrochemical Measurements", *Anal. Sci.*, 26, 33-37 (2010).

(7) M. Tanaka, T. Sawaguchi, Y. Sato, K. Yoshioka, and O. Niwa, "Synthesis of Phosphorylcholine-Oligoethylene Glycol-Alkene Thiol and Their Suppressive Effect on Non-Specific Adsorption of Proteins", *Tetrahedron Letters*, 50, 4092-4095 (2009).

(8) Y. Sato, K. Yoshioka, M. Tanaka, T. Murakami, M.N. Ishida, and O. Niwa, "Recognition of lectin with high S/N ratio: carbohydrate- / tri(ethylene glycol)alkanethiol co-adsorbed monolayer", *Chem. Commun.*, 4909-4911 (2008).

[学会発表] (計 22 件)

[招待講演]

- (1) Yukari Sato, "Molecular recognition on the interface of soft materials and related area", 2012 Annual meeting of Korean Society of Food Science and Technology, June 14, 2012, Daejeon Convention Center (Korea).
- (3) 佐藤 縁, "分子認識ソフト界面の構築と膜構造および機能評価に関する研究(受賞招待講演)", 電気化学会第 79 回大会, 2012 年 3 月 30 日, アクトシティ浜松(静岡県).
- (4) Yukari Sato, "Effective biomolecular recognitions on the surface modified with soft materials", Lecture Series on Surface Forces 18, November, 2, 2011, 東北大学(宮城県)
- (5) Yukari Sato, "Enhanced Recognition of Proteins and Peptides Based on Densified Hybrid Monolayers", the 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, September, 13, 2011, 朱鷺メッセ(新潟県).

[国際会議発表(招待講演以外)]

- (1) Yukari Sato, Kyoko Yoshioka, Teiichi Murakami, and Osamu Niwa, "Design of molecular recognition interface for detecting carbohydrate and lectin weak interactions", PRiME 2012 (Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science), October, 9, 2012, Hawaii Convention Center (U. S. A).
- (2) Yukari Sato, "Effective biomolecular recognitions on the surface modified with hybrid monomolecular layers", *Softinterface International*

Mini-symposium on Biomaterials Science (SIMS2012), March, 18, 2012, 筑波大学(茨城県)

[国内会議発表(招待講演以外。依頼講演を含む)]

- (1) 佐藤 縁, 中田知里, 村上悌一, 吉岡恭子, 田中睦生, 丹羽修, "電位変化を利用した糖鎖ハイブリッド膜によるレクチン類の検出", 電気化学会第 80 回記念大会, 2013 年 3 月 29 日, 東北大学(宮城県).
- (2) 佐藤 縁, 吉岡恭子, 中田知里, 村上悌一, 田中睦生, 丹羽修, "電気化学活性基を導入した自己組織化単分子層によるレクチン類の高感度検出", 第 61 回高分子討論会, 2012 年 9 月 21 日, 名古屋大学(愛知県)

[図書] (計 3 件)

- (1) 佐藤 縁 (座談会形式), 「新しい局面を迎えた 界面の分子科学」日本化学会編, 1章, 2011年, 化学同人.
- (2) 佐藤 縁, 丹羽 修 (分担執筆), 「環境分析ガイドブック」電気化学分析法 4.3章, 2010年, 丸善株式会社.
- (3) 佐藤 縁, 栗田僚二, 丹羽 修 (分担執筆), 「ソフトマター」センサー (編者 高原淳, 栗原和枝, 前田瑞夫), 4.2章, 2009年, 丸善株式会社.

[産業財産権]

○出願状況(計 5 件)

名称: タンパク質固定化表面修飾材料  
発明者: 田中睦生, 吉岡恭子, 佐藤 縁, 丹羽修, 藤巻真, 水谷亘, 吉田康一  
権利者: 産業技術総合研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-114553  
出願年月日: 平成 23 年 5 月 23 日  
国内外の別: 国内

(他 4 件)

○取得状況(計 7 件)

名称: 非特異吸着抑制材料  
発明者: 佐藤 縁, 吉岡恭子, 田中睦生, 村上悌一, 丹羽修  
権利者: 産業技術総合研究所  
種類: 特許  
番号: 4911415 (登録)  
取得年月日: 平成 24 年 1 月 27 日  
国内外の別: 国内

(他 6 件)

[その他]

[新聞報道] 佐藤 縁, 日刊工業新聞「分子認識に優れたソフト界面」2011 年 9 月 1 日.

[受賞]

(1) Hot Articles Award, Analytical Sciences, vol.27, No.5. (2011) (“Bifunctional Tri(ethylene glycol) Alkanethiol Immunoassay of pg Level Lectin”, Yukari Sato, et. al.)

(2) 2012年 電気化学会 第一回女性躍進賞 受賞「分子認識ソフト界面の構築と膜構造および機能評価に関する研究」佐藤 縁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 縁 (SATO YUKARI)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・ナノバイオデバイス研究グループ・上級主任研究員

研究者番号：40357132

(2) 研究分担者

吉岡 恭子 (YOSHIOKA KYOKO)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・ナノバイオデバイス研究グループ・主任研究員

研究者番号：50358321

田中 睦生 (TANAKA MUTSUO)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・バイオ界面研究グループ長

研究者番号：70344108