

平成21年5月1日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19550078  
 研究課題名（和文）マイクロビーズを用いたタンパク質-糖質間結合の電気化学的研究  
 研究課題名（英文）Electrochemical studies of protein-sugar binding using microbeads  
 研究代表者  
 菅原 一晴（SUGAWARA KAZUHARU）  
 群馬大学・教育学部・准教授  
 研究者番号：30271753

研究成果の概要：本研究では、擬似細胞表面で起こる生体分子間の結合をモニタリングし、生体分子をセンシングする電気化学的システムを構築した。具体的には、擬似細胞をデザインするアプローチとして、直径が数 $\mu\text{m}$ 程度であるマイクロビーズ表面にタンパク質や糖鎖の修飾を試みた。これらのビーズを用いることで酵素や分子認識タンパクを固定することができ、電極活性物質をプローブとすることでタンパク質-糖質間結合を評価する手法を開発した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：磁気ビーズ、糖質、レクチン、電気化学、酵素アッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

(1)細胞膜表面には種々の糖鎖やレセプタが存在し、抗体やホルモンなどを認識する。このようなタンパク質-糖鎖間結合は、生体内で起こる抗原抗体反応やホルモン分泌などの様々な生理学的プロセスに関与している。また、細菌やウイルスも細胞膜表面の特定の糖鎖を認識し宿主に感染することが知られている。そのためタンパク質とそのリガンドとの結合を評価する研究が数多く報告されている。その手法としては、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法、核磁気共

鳴法が広く用いられている。近年では、分子量数万を超えるタンパク質の測定にも対応したFAC-MS やMALDL-TOFMSが使われており、その進歩はめざましい。固体表面におけるタンパク質-リガンド間結合の研究に関しては、表面プラズモン共鳴法が注目を浴びている。一方で、電気化学的手法はタンパク質-リガンド間の相互作用を評価するにあたり非常に有力な手法である。この手法のメリットは、微量の試料でも測定が可能であること、コストパフォーマンスが高いこと、測定時間が短いことなどである。これまでに申請者は、

電極活性物質でラベル化したリガンドをプローブとしてタンパク質-リガンド間結合を評価する方法を提案してきた。特に、アビジン-ビオチン系を中心とした研究を行い、生体高分子膜を利用したセンサも開発してきた。

(2) タンパク質-リガンド間結合に関する評価法としては、マイクロビーズと蛍光試薬あるいは化学発光試薬などを組み合わせた方法が多々見られる。Heineman のグループは、磁性ビーズ表面での抗原抗体反応を酵素反応によりモニタリングする電気化学的手法を試みている。しかしながら、ウイルスや細胞に粒径のほぼ等しい磁性ビーズの表面に糖質を修飾し、電気化学的手法を用いてタンパク質-糖質間結合を解析する研究例は少ない。そのため、この結合を電気化学的にモニタリングするシステムの開発が求められている。本研究では、スパーサーを介して糖質あるいは電極活性物質と糖質を修飾したビーズを用いてタンパク質-糖質間結合を評価する方法を確立する。タンパク質の電極活性部位被覆による電極応答の変化に基づいた評価法は、タンパク質に結合していないプローブの分離を必要としないメリットをもつ。加えて、マイクロビーズを擬似細胞や細菌と見立ててタンパク質-糖鎖間の結合を評価する手法は、感染症の危険性を排除しつつその結合におよぼす糖鎖構造の影響を評価できるものと考えられる。さらに、細胞膜の表面に存在する糖鎖の構造は年齢、疾病によって変化することから、臨床検査における疾病のスクリーニングを行う際の有力な手法の一つとなる。一方、炭素粉末に対して糖質結合シリカビーズあるいはキチン、そしてバインダを混合して作製するカーボンペースト電極は、その調製法が非常に簡便である。加えて、電極表面の再生が容易であり再現性もすぐれている。従って、高選択的な糖質のセンシングが予期される。以上、ここで提案するマイクロビーズおよび電極活性プローブを用いるタンパク質-糖質間結合の評価法は新規性が高く、細胞表面で起こる生体分子間結合への幅広い応用が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、先の研究成果を踏まえ擬似細胞表面で起こる生体分子間の結合をモニタリングし、生体分子をセンシングするシステムの構築をはかる。擬似細胞をデザインするアプローチとしては脂質二分子膜や Langmuir-Blodgett 膜を利用するものが一般的である。それに対して、マイクロビーズは直径が数  $\mu\text{m}$  程度であり、その表面にタンパク質やリガンドの修飾が可能であるため、

1 個の細胞のモデルとして見なすことができる。加えて、酵素や抗体を固定化する支持体あるいは細菌の分離に有用であり、その汎用性も高い。それゆえ、マイクロビーズならびに電極活性物質をプローブとして用い、タンパク質-糖質間結合を評価する研究を展開することとした。以下に、研究を進める上での 5 つのコンセプトを述べる。

(1) 擬似細胞に見立てたマイクロ磁性ビーズにアルキル鎖を介して糖質を修飾し、その糖質に選択的に結合するタンパク質をビーズ表面に固定化する。対応する糖質を電極活性物質でラベル化したプローブを用いてビーズ表面で起こるタンパク質-糖質間結合のモニタリングを行う。

(2) 電極活性物質であるチオニンと糖質とを修飾した磁性ビーズを用いて、糖質と特定のレクチンとの結合を簡便にモニタリングする手法を開発する。

(3) 糖質結合シリカビーズ、炭素粉末そしてバインダ(有機溶媒)を混合したカーボンペースト電極を作製する。次に、シリカビーズ表面に存在する糖質との結合を利用し電極表面上にタンパク質を修飾する。この際、電極活性物質でラベル化した糖質を用いて、タンパク質-糖質間結合におよぼすバインダの効果を明確にする。

(4) 生体高分子ビーズを修飾したカーボンペースト電極表面に酵素を静電的に固定化し、電極応答に影響する炭素粉末の粒径についての考察を行う。その炭素粉末はグラッシーカーボン粒子を用い、10-100  $\mu\text{m}$  程度の粒径を選択する。

(5) 磁性ビーズにグルコース (Glc) を基本骨格とする糖鎖を修飾し、電気化学的にビーズで起こるタンパク質との結合をモニタリングする。この手法は、ビーズ表面への糖鎖の固定に際し、特別なスパーサーを必要としないという特長を持つ。その評価にあたっては、ラベル化したグルコースを用い、セロビオース (Glc)<sub>2</sub> からセロヘキソース (Glc)<sub>6</sub> までのタンパク質に対する結合力を比較し、糖質構造から生じる結合力の差違を見出す。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖質修飾マイクロ磁性ビーズ表面でのタンパク質と糖鎖との結合に関する評価法の開発

細胞膜表面に存在する糖質とタンパク質の結合を電気化学的にモニタリングする手法を開発するために、**アミノ基を有するマイクロ磁性ビーズ**に架橋剤を介して糖質を導入する。その結合を評価するプローブには、対応する構造をもつ糖質を電極活性物質でラベル化した試薬を用いる。架橋剤には、ビス[スルフォスクシンイミジル] スペレート

選択し、ビーズ表面にグルコサミン部位を修飾する。また、電極活性物質であるドウノマイシンとグルコサミンとをシッフ塩基反応で結合させたラベル化グルコサミンを調製する。分子認識タンパク質としては、インスリンレセプタの精製やニューロンのトレーシングに有用な小麦由来のレクチン(Wheat Germ agglutinin:WGA)に着目する。WGAはグルコサミン部位を認識するため、ビーズ表面へのWGAの固定化が可能となる。種々のWGA量を固定化した修飾ビーズと一定量のラベル化グルコサミンとを混合すると、**ビーズ表面への固定に使われなかったWGAのグルコサミンへの結合サイトにラベル化グルコサミンが取り込まれる。**WGAによる電極活性部位の被覆に基づいて電流値が減少するので、2段階の反応によりビーズ表面に結合したWGAの量を見積もることができる。タンパク質-糖質間結合を評価するにあたり、ビーズの大きさや糖質の修飾率が重要視される。それゆえ、磁性ビーズの粒径を**0.1-数・μmの範囲で変化させ、Rondle-Morgan法により糖質の固定化量も測定する。**

#### **(2) 電極活性物質/糖質修飾マイクロ磁性ビーズを用いたタンパク質-糖質間結合のモニタリング**

電極活性物質であるチオニンと糖質とを修飾した磁性ビーズを用いて、糖質と特定のレクチンとの結合を簡便にモニタリングする手法を開発する。(1)のコンセプトを基礎にマイクロ磁性ビーズ表面に架橋剤を介して電極活性物質と糖質とを修飾する。この手法をとることで、(1)で必要とされる**2段階の反応を1段階の反応にすることができる。**研究対象としては細胞表面の糖鎖末端に多く存在するグルコースやマンノース残基を磁性ビーズにそれぞれ修飾しWGAやタチナタ豆由来のレクチンであるコンカナバリンA(Con A)との結合を選択する。修飾方法は、アミノ基が導入された磁性ビーズと架橋剤であるビス[スルフォスクシンイミジル]スベレートとを混合する。次に、**アミノ基を2つ有するチオニンの一方のアミノ基を架橋剤に結合させる。**その後、もう一方のアミノ基と糖質とのシッフ塩基反応によりチオニン/糖質修飾磁性ビーズを得る。そして、調製したビーズを用いビーズ表面で起こるレクチンと糖質との結合を評価する。

#### **(3) 糖質結合シリカビーズ修飾カーボンペースト電極によるレクチンのボルタンメトリック挙動**

ガラクトース結合シリカビーズを修飾したカーボンペースト電極表面で選択的に起こる大豆由来レクチン(Soybean agglutinin:SBA)-ガラクトース間結合とSBAの電極への**非特異的吸着性の影響を明らかにする。**申請者は、これまでにマンノース結合シリカビ

ーズ修飾カーボンペースト電極表面でのCon Aとの結合を電極活性物質でラベル化したマンノースを用いて評価した。その結果、**Con Aは疎水性が高いため未修飾電極への非特異的吸着が観察された。**それに対して、**親水性が高いSBAとガラクトース結合シリカビーズ修飾電極とを溶液中でインキュベートとし、SBAを含まない溶液中に電極を移しラベル化ガラクトースを反応させ電極応答を測定する。**未修飾電極に対してSBAの非特異的吸着が抑制され、修飾電極表面に選択的にSBAが結合するならば、SBAに対するフリーガラクトースとラベル化ガラクトースとの競争反応に基づいたフリーガラクトースの高選択的なセンシングが達成される。

#### **(4) 修飾グラッシーカーボンペースト電極を用いたグルコースセンサの開発**

天然多糖類であるキチンは、N-アセチルグルコサミン残基が鎖状に重合しており、そのアセチルアミド基は酸性溶液ではプロトン化する。生体適合性の高いキチンに分子認識機能を有するタンパク質を修飾するならば、**生体分子間結合の反応場として新しい機能が付加する。**粒径の異なるグラッシーカーボン粉末(GCP)にキチン粉末と白金粉末を修飾した電極にグルコースオキシダーゼ(GOD)を固定化するならば、簡便なセンサが作製できるものである。グルコースの濃度に依存する過酸化水素の電流値を測定することでGCPの粒径に基づいた特性を容易であり、**カーボンペースト電極作製におけるGCPの選択の情報も得るものである。**

#### **(5) 糖鎖-修飾磁性ビーズ表面でのレクチン結合のボルタンメトリック挙動**

セロヘキソース-修飾磁性ビーズを使ったWGAとの結合をモニタリングするために、アミノ基を有するビーズ表面へ**セロヘキソースの修飾を行う。**また、その結合を評価するプローブとして電極活性物質でラベル化されたグルコースも調製する。その糖鎖は磁性ビーズにレクチンを結合させるためのスペーサーとして働く。ラベル化グルコースがWGAと結合する際に、ラベル化グルコースはWGAの糖質結合サイトに取り込まれる。それゆえ、電極応答はWGAの濃度の増加につれて減少する。一方で、セロヘキソース修飾ビーズに対しての結合は、WGAの糖質結合サイトがビーズ表面のセロヘキソースで占められるのでラベル化グルコースの電極応答は増加すると考えられる。すなわち、溶液中のラベル化グルコース量が増加することになる。従って、ビーズの表面に結合する糖質の量が電流値の変化から見積もることができる。さらに、**3から6糖のセロオリゴ糖をビーズ表面に固定化し一連のオリゴ糖との結合力を比較する。**WGAとセロヘキソースとの結合力はセロトリオースの結合力より大きくな

ることが予想される。このようなオリゴ糖修飾ビーズは、生体における細胞の機能や分子内結合を解明するために寄与するものである。

#### 4. 研究成果

(1) 磁性ビーズを擬似細胞とみなし、グルコサミン修飾ビーズ上での wheat germ agglutinin (WGA) の結合をボルタンメトリーにより評価した。その結合を評価するために、アミノ基を有するビーズに架橋剤を介して糖質を修飾し、電極活性物質でラベル化したグルコースを調製した。まず、WGA と修飾ビーズを溶液中でインキュベーションした後、ラベル化グルコースを加えた。その結果、ラベル化グルコースの電極活性部位は WGA に被覆されるため、**電極応答の減少**が観察された。それに対して、グルコサミンやグルコースに対して結合サイトを持たないレクチンと修飾ビーズとを混合すると、ピーク電流値の減少は認められなかった。それゆえ、**ビーズ表面上でグルコサミン部位と WGA との結合が選択的に起きていることが明らかとなった。**

(2) 植物レクチンと糖質との結合を電気化学的に評価するために、磁性ビーズを細胞に見立て、その表面に架橋剤を介して電極活性なチオニンを修飾し、チオニンとのシッフ塩基反応を用いてグルコースを固定化した。小麦由来のレクチン (WGA) はグルコースと結合することが知られており、この結合によりチオニン部位も被覆されることが予想される。それに伴いチオニン部位の電極応答が変化するため、**グルコース/チオニン修飾ビーズ表面での WGA-グルコース間結合の評価を試みた。**グルコース/チオニン修飾ビーズを含む溶液中において、電極に一定の電位をかけ測定を行うとチオニン部位に起因する還元波が現れる。この溶液に WGA を加え反応させた場合、修飾ビーズのみの電流値と比較して、得られた電流値は 30 %程度にまで減少した。また、グルコース/チオニン修飾磁性ビーズとグルコースとは結合しない大豆由来レクチンまたはコンカナバリン A を混合した場合、先に得られたピーク電流値の減少は見られなかった。一方、チオニンのみを修飾したビーズでは、WGA を共存させても電流値の減少は観察されなかった。これらの結果から、電流値の減少は WGA とグルコースの結合によって引き起こされていることが明らかである。従って、提案した手法は**細胞表面に存在する糖鎖とタンパク質との結合をモニタリングできる可能性を持っている。**

(3) ガラクトース-シリカビーズを修飾したカーボンペースト電極による、ガラクトース残基を認識する soybean agglutinin (SBA) と

の結合を電気化学的にモニタリングする手法についての研究を行った。電極活性物質でラベル化したガラクトース、SBA、ビーズ表面のマノース残基との結合は、ラベル化ガラクトースの電極応答の変化から測定された。未修飾電極を用いると、電極活性部位に起因する酸化ピークが出現する。次に SBA を伴った溶液中にその電極を浸し、SBA なしの別の溶液中にラベル化ガラクトースを加え測定を行った。ピーク電流値は、先の測定での値と比較して 95 %程度であった。**SBA は親水性が高い**ためピーク電流値の値はほとんど変化しないものと考えられる。それに対して、ガラクトース修飾電極に SBA を固定化した際に得られた電流値は、SBA を固定しない場合の電流値の約 10 %にまで減少した。この修飾電極では SBA が電極表面に修飾されたガラクトースと結合し、結合に用いられなかった結合サイトにラベル化ガラクトースが取り込まれたことがわかる。この結果は、我々がこれまでに報告したマノース修飾電極でのコンカナバリン A の挙動とは異なり **SBA の電極への非特異的吸着は抑制**されているものでありレクチンの性質に基づいていることが明らかとなった。

(4) 生体適合性が高いキチンに分子認識機能を有するタンパク質を修飾するならば、新しい機能をキチンに持たせることができる。本研究では、**このコンセプトに基づき粒径の異なるグラッシーカーボン粉末 (GCP) とキチン、白金、バインダを混合してカーボンペースト電極を作製した。**そして静電的相互作用によりグルコースオキシダーゼを電極表面に固定し、グルコースのセンシングを試みた。グルコースの添加により生成する過酸化水素応答は、GCP に対するキチンの添加量を 10% とシフタル酸ジオクチルをバインダとした場合では、GCP の粒径が 0.4-10  $\mu\text{m}$ 、10-20  $\mu\text{m}$ 、20-40  $\mu\text{m}$ 、50-80  $\mu\text{m}$  では **10-20  $\mu\text{m}$  でもっとも再現性のよい明瞭な電極応答を示した。**それゆえ、**GCP の粒径が電極応答に大きく影響**することが明らかであり、酵素センサの開発において重要な要因となる。

(5) 小麦由来レクチン (WGA) とセロヘキソースとの結合を評価するために、シッフ塩基反応によりアミノ基を有する磁性ビーズにセロヘキソースを修飾した。その糖鎖は、WGA の分子認識部ならび WGA をビーズに固定するためのスパーサーとして機能する。WGA-糖鎖間結合の評価には電極活性物質でラベル化したグルコース (LG) を使い、ボルタンメトリーによる測定を行った。LG の電流値は溶液中で WGA との結合に基づいて減少した。一方で、修飾磁性ビーズと WGA とをインキュベーションした後に LG を添加すると、電流値はビーズなしの測定に比べて増加した。その結果は、WGA-LG 間結合はビーズ上の糖鎖と WGA

との相互作用によって抑制されていることを示す。さらに、ビーズに**他のゼロオリゴ糖**を修飾してWGAに対する結合力を比較したところ、**その親和力は糖質の長さに依存**していることが見いだされた。従って、一連のビーズはタンパク質と糖鎖間の結合のモニタリングに有用であると考えられる。

#### 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7件)

- ① Sugawara, K.; Kawai, M.; Hirabayashi, G.; Kuramitz, H., Sensitivity of a Glassy Carbon Electrode Covered with a Chitin Film Improved by the Addition of Carbon Powder, Anal. Sci., 25, 105-108, 2009, 査読有り
- ② 菅原一晴、矢口千鶴、中谷祐美子、大竹里絵、稲村理沙ELISAを用いたアビジン-ビオチン誘導体間相互作用に関する研究群馬大学教育学部紀要、57、73-81、2009、査読あり
- ③ Sugawara, K.; Senbangi, A.; Kamiya, N.; Hirabayashi, G.; Kuramitz, H., Voltammetric Evaluation of the Binding between Wheat Germ Agglutinin and Thionine/Glucose-modified Magnetic Microbeads, Anal. Sci., 24, 717-720, 2008, 査読有り
- ④ Sugawara, K.; Terauchi, A.; Kamiya, N.; Hirabayashi, G.; Kuramitz, H., Voltammetric Behaviors of Wheat Germ Agglutinin on a Chitin-Modified Carbon Paste Electrode Anal. Sci., 24, 583-587, 2008, 査読有り
- ⑤ Sugawara, K.; Takayanagi, T.; Kamiya, N.; Hirabayashi, G.; Kuramitz, H. Voltammetric sensing of sugar by an electrode covered with wheat germ agglutinin/chitin film, Talanta, 71, 1637-1641, 2007, 査読有り
- ⑥ Sugawara, K.; Kamiya, N.; Hirabayashi, G.; Kuramitz, H., Voltammetric evaluation for the binding of wheat germ agglutinin to glucosamine-modified magnetic microbead, Talanta, 72, 1123-1128, 2007, 査読有り
- ⑦ 菅原一晴、加瀬健、功刀ちはる、下平明徳、神谷直人、平林譲司、ケラチン/グルコースオキシダーゼ修飾カーボンペースト電極を用いたグルコースセンサの開発、群馬大学教育学部紀要、56巻、97-103、2007、査読有り

[学会発表] (計7件)

- ① 菅原一晴、神谷直人、平林譲司、由上麻子、照井教文、キチン修飾グラッシーカーボンペースト電極を用いたグルコースセンサの試作、日本分析化学会第57年会、2008.9.10、福岡、福岡大学
- ② 由上麻子、倉光英樹、菅原一晴、セロトトラオース修飾磁性ビーズと小麦由来レクチンとの結合の電気化学的評価、日本分析化学会第57年会、2008.9.10、福岡、福岡大学
- ③ 菅原一晴、河合真志、平林譲司、神谷直人、倉光英樹、カーボン修飾キチン膜の電気化学的挙動に関する研究、第69回分析化学討論会 2008.5.16、名古屋、名古屋国際会議場
- ④ 倉光英樹、宮垣瞬、菅原一晴、波多宣子、田口茂、ダウノマイシンでラベル化したラクトースを用いたコレラ毒素の電気化学的アッセイ法の開発、第69回分析化学討論会 2008.5.15、名古屋、名古屋国際会議場
- ⑤ 菅原一晴、深町真之、神谷直人、平林譲司、糖質-シリカビーズ修飾カーボンペースト電極によるコンカナバリンA-マンノース間結合のモニタリング、日本分析化学会第56年会、2007.9.21、徳島、徳島大
- ⑥ 山沙織、波多宣子、田口茂、菅原一晴、倉光英樹、カーボンナノチューブペースト電極を用いたエストロゲン定量法の開発、日本分析化学会第56年会、2007.9.19、徳島、徳島大
- ⑦ 菅原一晴、寺内愛子、神谷直人・平林譲司・倉光英樹、小麦由来レクチン/キチン修飾カーボンペースト電極による糖質のセンシング、第68回分析化学討論会、2007.5.19、宇都宮、宇都宮大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菅原一晴 (SUGAWARA KAZUHARU)  
群馬大学・教育学部・准教授  
研究者番号：30271753

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：