

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22780107

研究課題名(和文)糖鎖アレイを指向した、糖鎖-蛋白質相互作用の電気化学的検出法

研究課題名(英文)The electrochemical detection method of the carbohydrate-protein interaction for carbohydrate microarray

研究代表者

今場 司朗 (Komba, Shiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員

研究者番号：20332273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：様々な糖リンカーを合成しレクチンとの反応を表面プラズモン共鳴法と電気信号により追跡した。S/N比が高く、再現性が良い手法を確立すべく種々検討を行った結果、11-メルカプトウンデカン酸を金表面に導入した後、4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンを導入、最後にラクトースまたはマルトースを導入することにより末端にガラクトースとグルコースを配置した新たな糖リンカーをデザインしたものが、電気測定(SWV測定)において顕著な差が認められた。これにより電気測定により糖鎖とタンパク質の結合を追跡可能な手法として確立した。

研究成果の概要(英文)：I have synthesized various sugar linkers and these were examined for recognition of lectins by the surface plasmon resonance method and an electrical signal. As a results of the various examinations, the sugar linkers that consist of 11-mercaptoundecanoic acid, 4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamine, and lactose or maltose for a terminal beta-galactose or alpha-glucose respectively were the best structure for electrical measurement (SWV measurement). I have established the technique that detect interaction between sugar and its recognizing protein (lectin etc.) by electrical measurement.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：分子認識 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

すでにDNAアレイにおいてはその結合を電気化学的に計測し、ハイブリダイズしたかどうかを検出する技術が確立し(特開2003-161730)東芝からDNAチップ製品として市場に出ている。また、プロテインアレイでも結合する蛋白質を電気化学的に検出する研究として、九州大学の村田らは電気化学活性物質の基板表面への浸透し易さにより結合した蛋白質があるかないかを電気信号として捕らえることに成功している(M. Murata et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 77, 525-529, (2004))。また、富士写真フィルムでは結合する蛋白質にフェロセンを結合させた後にアレイ上の蛋白質と結合させ、その結合を電気信号として捕らえている(特開2001-242116)。この様にDNAアレイやプロテインアレイはすでに電気化学的にその標的物質との結合を検出する技術が確立しているが、糖鎖アレイにおいては電気化学的手法による検出技術は見当たらない。それはまだ糖鎖アレイ自体が一般に広く普及していない技術で、その作製すら未だ開発段階である為である。そこで、今後発展して行くであろう糖鎖アレイにおける検出法をいち早く確立する為に、これまでに確立した電気化学的手法による検出技術を糖鎖アレイに応用し、糖鎖アレイとその認識蛋白質との結合を電気信号として捕らえる技術を開発する。

2. 研究の目的

第三の生命鎖として重要な機能を有する糖鎖であるが、依然として網羅的糖鎖構造を有する糖鎖アレイは存在しない。現存する糖鎖アレイは天然から単離した糖鎖を基板上にスポットした物がほとんどである。さらに、その検出法に関しては、標的蛋白質に蛍光ラベルするか、蛋白質を結合させた後、蛍光ラベルした抗体により検出する手法が主であり、検出に蛍光検出装置が必須である。近年、SPR(表面プラズモン共鳴)や、QCM(水晶振動子マイクロバランス)により糖と蛋白質の結合を無蛍光で検出する研究が盛んに行われているが、より簡便な糖鎖アレイ用の無蛍光検出法を考える時、電気化学的に結合を検出するのが、最も効率的で、迅速で、かつ特殊な装置が要らないため低価格化しやすいという利点があり、一般に普及させやすいと着想した。そこで本研究では糖鎖とその認識蛋白質との結合を電気化学的に検出する技術の確立を目指し、糖鎖アレイ検出技術の基礎を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

現在までに確立した糖鎖合成手法(S. Komba et al., *Tetrahedron Lett.*, 45 (13), 2759-2762, (2004), S. Komba et al., *Eur. J. Org. Chem.*, (24), 5313-5329, (2005))を用い、末端に硫黄原子を有するリンカーを持ったガラクトースならびにグルコースを合成する。ここで、リンカーとしてはポリエチレングリコールや、ペプチド、アルキル鎖を用いる。これを、

末端の硫黄原子を介して金基板に結合させ、糖鎖アレイのモデルを構築する。このモデルに対し、ガラクトースと選択的に結合するPNAレクチンと、グルコースと選択的に結合するConAレクチンを用い、それぞれの結合をSPRと、電気信号の2つで観測する。SPRでレクチンが結合しているのを観察すると同時に電気信号の変化を読み取り、タンパク質の結合を電気信号の変化で追跡可能な手法を確立する。

4. 研究成果

図1に示す様々な糖リンカーをデザインし、合成に成功した。そしてレクチンとの反応をSPRと電気信号により追跡した。

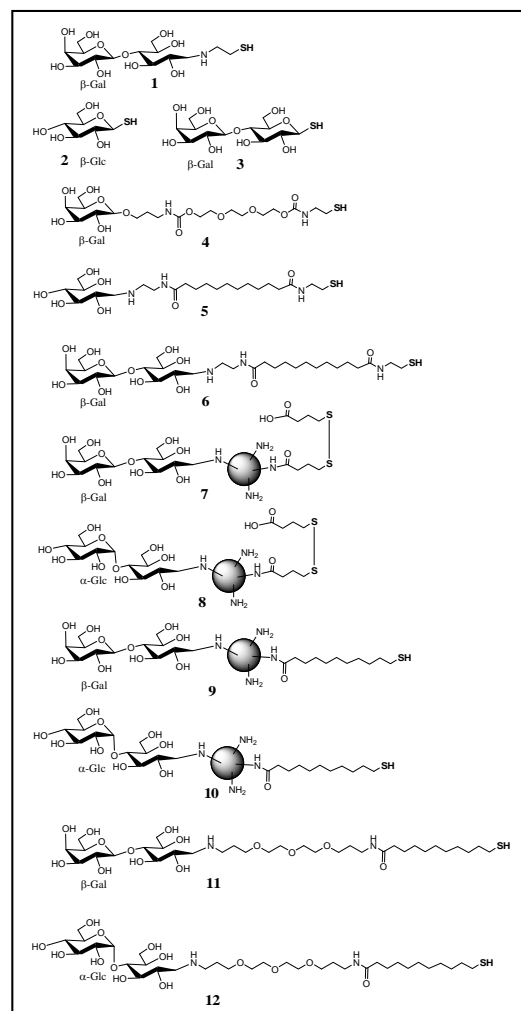


図1: 合成に成功し、金基板と結合させ検討を行った化合物一覧。末端チオール基を介して金基板と結合する。もう一方の末端にはガラクトース(Gal)とグルコース(Glc)があり、それぞれPNAレクチンとConAレクチンと選択的に結合する。

リンカーをできるだけ短くして電気が伝わり易くしようと、化合物1~3をデザインし合成した。2-アミノエタンチオールとラクトースをシアノ水素化ホウ素ナトリウムにより還元的アミノ化にて結合させ化合物1を

合成した。また、チオ酢酸とグルコース、またはラクトースを反応させ1位にSAC基を導入後アセチル基を除去することにより化合物2, 3を合成した。これらの化合物とレクチンとの反応をまずはSPRにて追跡しようとしたが、タンパク質の結合による変化を捉えることができなかった。

リンカーの親水性、疎水性の違いにより電気が伝わり易さの違いが生じるか検討するために化合物4~6をデザインし合成した。親水性リンカーとして化合物4を合成した。適切に保護されたガラクトースドナーにFmoc-Ala-olを選択的に縮合した後、脱保護により末端をアミノ基にした。金基板にリンカーとして2-アミノエタンチオール、トリエチレングリコールビス(クロロホルメート)を順に結合させた後、先ほどのアミノ末端ガラクトースを結合させ化合物4を合成した。一方疎水性リンカーとして化合物5, 6を合成した。金基板上に2-アミノエタンチオールを配置した後、ドデカンダイオニックアシルクロライド、エチレンジアミンを導入し最後にグルコース及びラクトースをシアノ水素化ホウ素ナトリウムにより還元的アミノ化にて結合させ化合物5, 6をそれぞれ合成した。これらの化合物とレクチンとの反応をまずはSPRにて追跡しようとしたがこれら化合物においてもタンパク質の結合による変化を捉えることができなかった。

リンカーを短く、しかし表面化合物の量は多くするため、化合物7, 8を合成した。4,4'-ジチオブチル酸を金基板上に導入した後カルボン酸をNHSエステルにて活性化させ、PAMAM dendrimer generation 4を導入した。このデンドリマーは1分子中に64個のアミノ基を表面に持つ球状化合物である。その後、ラクトースとマルトースをシアノ水素化ホウ素ナトリウムにより導入した。ラクトースを導入した方はガラクトースが、マルトースを導入した方はグルコースが末端に配置された化合物7, 8をそれぞれ合成した。これらの化合物とレクチンとの反応をまずはSPRにて追跡しようとしたがこれら化合物においてもタンパク質の結合による変化を捉えることができなかった。

リンカー同士の疎水結合を上げ、金基板のリンカー同士のパッキングを高めると同時に表面化合物の量を多くするために、化合物9, 10を合成した。金基板上に11-メルカプトウンデカン酸を配置し、その後カルボン酸をNHSエステルにて活性化させPAMAM dendrimer generation 4を導入した。そして、ラクトースとマルトースをシアノ水素化ホウ素ナトリウムにより導入し化合物9, 10を合成した。これらの化合物とレクチンとの反応をまずはSPRにて追跡したところ、今度はガラクトース認識レクチン(PNAレクチン)がガラクトース部位を、グルコース認識レクチン(ConAレクチン)がグルコース部位をそれぞれ濃度依存的に認識し

ている変化を捉える事に成功した。しかし、電気信号を計測したがタンパク質のあるなしで目立った違いが見られなかった。また、これら糖リンカーの合成と同時に数%の割合で酸化還元物質である11-フェロセニル-1-ウンデカンチオールを混ぜたものを作製し電気信号の違いを追跡したが違いがある時とない時があり再現性が得られなかった。リンカー同士の疎水結合能を上げ、金基板のリンカーのパッキングを高めると同時に表面は親水性にするために化合物11, 12を合成した。金基板上に11-メルカプトウンデカン酸を配置し、その後カルボン酸をNHSエステルにて活性化させ4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンを導入した。そして、ラクトースとマルトースをシアノ水素化ホウ素ナトリウムにより導入し化合物11, 12を合成した。これら化合物とレクチンとの反応をまずはSPRにて追跡した所、化合物9, 10のようなはっきりした違いが見られなかった。しかし、レクチン(PNAとConA)にマレイイミドを介して酸化還元物質であるフェロセンを導入したものを新たに作製して用いた所、電気測定において顕著な違いが観測された。特に電気測定の一つであるSWV測定時におけるip値(A)は40倍の違いがあり電気測定により糖鎖とタンパク質の結合を追跡可能な手法を確立した(図2)。

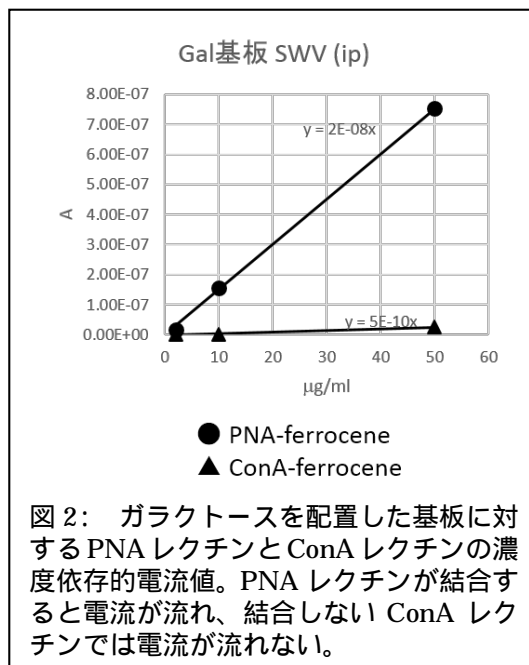


図2: ガラクトースを配置した基板に対するPNAレクチンとConAレクチンの濃度依存的電流値。PNAレクチンが結合すると電流が流れ、結合しないConAレクチンでは電流が流れない。

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4件)

今場司朗、寺内毅、町田幸子、"A regio- and stereo-selective parallel synthesis of five types of trigalactoses on a solid support as a model of a combinatorial oligosaccharide

library” *Journal of Applied Glycoscience*,
査読有, **58**(1), 2011, 1-12.

DOI:

http://dx.doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2010_006

〔学会発表〕(計 12 件)

今場司朗、“糖鎖チップの開発” 第 36 回
日本分子生物学会、2013 年 12 月 4 日、
兵庫

今場司朗、“糖鎖チップの新時代” 日本応
用糖質科学会平成 23 年度大会 (招待講
演) 2011 年 9 月 29 日、北海道

〔図書〕(計 1 件)

今場司朗、サイエンス&テクノロジー、
光学活性医薬品開発とキラルプロセス化
学技術、2011、389-399 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今場 司朗 (KOMBA, Shiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構食品総合研究所・食品バイオテクノ
ロジー研究領域・主任研究員

研究者番号：20332273