

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310125

研究課題名(和文)生物毒素に対する分子認識素子の創製と効果的な除染法の開発

研究課題名(英文)Creation of molecular recognition tool against biological toxins and development of effective decontamination techniques

研究代表者

瀬戸 康雄 (Seto, Yasuo)

科学警察研究所・法科学第三部・部長

研究者番号：10154668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物毒素と結合する分子認識素子の性能評価法として、表面プラズモン共鳴分析(SPR)法およびエレクトロスプレーイオン化質量分析法を開発した。候補素子の調製に関しては、ファージディスプレイ法により黄色ブドウ球菌腸毒素B(SEB)に結合する人工抗体を、有機合成によるアジ化トリエチレングリコール還元末端修飾ラクトース誘導体を作製した。SEBとその市販抗体を用いて、SPR法により解離定数・結合最大量を求め、最適の抗体を選択した。クリックケミストリー法を用いた糖導入法を開発し、ラクトース誘導体をシリカモノリス担体に導入した。そして、作製した糖固定化モノリスチップを用いて、リシンの吸着除染能力を検証した。

研究成果の概要(英文)：As evaluation method for molecular recognition tool against biological toxins, surface plasmon resonance (SPR) analytical method and electrospray ionization spectrometry have been developed. As for preparation of candidate molecular recognition tool, artificial antibody against Staphylococcal enterotoxin B (SEB) has been created using phage display method, and also lactose derivatives which reduction terminal are combined with triethylene glycol azide has been synthesized. The most suitable candidate of the commercial antibody preparation against SEB has been selected by measurement of binding affinity and capacity using SPR. Lactose derivatives have been immobilized into monolithic silica by click chemistry-mediated sugar introduction method. The prepared sugar-immobilized monolithic silica tip has been verified for decontamination power capturing ricin.

研究分野：法科学、分析化学、法中毒学、危機管理学、計測科学

キーワード：テロ対策 分子認識 機器分析 生物毒素

## 1. 研究開始当初の背景

微量で人体に毒性を示す生物毒素(蛋白質)は食品への直接混入や生成菌の汚染により食中毒は多発しており、加えてバイオテロの発生も危惧される。その対策として、早期に生物毒素を検出する、その汚染を除去することが最重要であり、食品衛生分野では免疫化学法による検査が実施され、テロ現場では免疫ストリップ法による検知が行われている。一方、汚染現場の除染には、汚染表面を洗い流す方法、フィルターに吸着させる方法、次亜塩素酸などの除染剤で無毒化する方法などが用いられているが、現場で大量に残された生物毒素含有の汚染水をどう処理するか、毒素以外の妨害物でフィルターが根詰まりする、高毒性な除染剤は人体・環境に危険であるなど、満足のいくものではなく、抜本的な解決法として有効な除染法の構築が望まれる。すなわち、除染技術に関しては学術的な取り組みがなされておらず、生物毒素などの危険物の除染法を研究・開発することは大規模な汚染事案に際して被害の最小化に資するものである。

我々は、平成18年度から3ヶ年計画で科学技術振興調整費重要課題解決型研究として産学官体制でサリンや炭疽菌などの生物化学剤の効果的な現場除染法の開発研究を実施してきた。本提案では、対象を蛋白質性の生物毒素に絞り、先行研究で得られた成果(植物毒リシンの除染法開発;黄色ブドウ球菌腸毒素B(SEB)に対する分子認識素子創製)を基に研究を推進するものである。最適な分子認識素子を絞れる評価法を確立し、有用な素子を創製して、現場除染法の発展的な開発につなげる。

## 2. 研究の目的

(1) 危険物が用いられるテロ現場での対処に、分子認識の導入という特異的・選択的アプローチの有効性を検証する。そのために、生物毒素に対する分子認識素子の最適化のための評価法を確立する。分子認識素子の選別には、標的分子を結合した担体への候補物質ライブラリー群の吸着による篩い分け、バイオアッセイ、生理活性測定、DNAゲルシフトアッセイ、免疫化学法などによる絞り込みが行われる。しかし、標的分子に分子認識素子が結合しても応答しない、標的分子と分子認識素子の複合体は明確な分離挙動を示さない、標的分子が担体ヘランダムに結合して立体障害により真の結合現象が得られない、標的分子が担体へ結合すると3次元構造が変化して正確な結合が再現できないなど、現状の技術に関しては分子認識素子を正確に効率よく選別できるかは不確定である。そこで、機器分析を用いて、自由溶液中での標的分子と分子認識素子との非共有結合性複合体を検出する技術を確立する。すなわち、(1)マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)やエレクトロスプレーイオン

(ESI)化などのソフトイオン化を用いた質量分析(MS)法、(2)キャピラリー電気泳動(CE:泳動緩衝液中での複合体の分離・検出)、(3)表面プラズモン共鳴(SPR)分析(センサー結合標的分子へのリガンドの可逆的結合測定)の評価有用性を検証する。

(2)用いる分子認識素子としては、安定供給が可能であり、比較的構造が安定なリガンドを選択する。先行研究での検討結果に基づいて、糖鎖誘導体(生物毒素の多くが標的細胞膜上の糖鎖を認識する)および抗体様人工蛋白質(動物免疫で得られる抗体をコンパクト化したもの)を選択する。また、吸着素材として、最近分離素材として注目され実用・実践例が多いシリカモノリスを選択し、高速通水と固定相内部の空間の自由な立体制御を可能にする。まず、ラクトース系の糖鎖を還元末端とした誘導体、ファージディスプレイ法で調製した抗体様人工蛋白質各レパートリー群を各々植物毒リシン用およびSEB用の分子認識素子の候補として、先行研究で実施した固相吸着法の代わりに、機器分析法による評価法で最適リガンド(分子認識素子)を選択・創製し、選択した分子認識素子をシリカモノリス固定相に結合させた吸着材を試作し、除染剤としての性能検証が成績から、本戦略の有効性を確認する。そして、対象の生物毒素を猛毒なBTX、食中毒事例の多い腸管出血性大腸菌O157などが生産するペロ毒素、コレラ毒素に拡大して、除染有効性を確認し、本戦略の汎用性を証明する。

## 3. 研究の方法

標的の生物毒素として、リシンおよびSEB(シグマ製)を用いた。リシンは、ホーネンコーポレーションより供与されたもの、または唐胡麻より精製したのを用いた。化学兵器禁止法に基づき、経済産業省より製造、使用を承認されている。

MALDI-飛行時間型(TOF)MSは、アプライドバイオシステムズ製Voyager DE STR装置により、窒素337nmレーザー、25kV加速電圧、ポジティブ極性、リニアモードで測定し、マトリックスとして10mg/mLシナピン酸トリフルオロ酢酸溶液(アセトニトリル-水=3:7)を用いた。ESI-MSは、ブルカー製Impact HD型四重極TOF MS装置により、イオン化ESI、ポジティブ極性、キャピラリー電圧4500Vで測定した。試料溶液をアプライシ、ワイエムシー製YMC GEL Diol(12nm S, 5µm, 10×1mm)に通過後、MS装置に導入した。CEは、アジレントテクノロジー製HP<sup>30</sup>型CE装置により、キャピラリー:溶融シリカ(50µm×104cm)バッファー:ホウ酸など各種、30kVポジティブ印加、280nm吸収検出で測定した。SPRは、GEヘルスケア製Biacore T-100により、所定の操作でCMセンサーチップに毒素または抗体を固定化してアナライトを測定した。

糖鎖誘導体は、酵素反応または有機反応を活用し化学合成により調製した。抗 SEB 抗体は市販品を用い、抗体様人工蛋白質の創製は、ファージディスプレイ法（ニューイングランドバイオラボ製 Ph.D-7 および Ph.D-12 ライブラリー使用）を活用した。吸着素材として、協力機関ジーエルサイエンス(株)の作製したシリカモノリスを用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 分子認識素子の性能評価法の確立：CE 法（ゾーン電気泳動）を検討したところ、通常のゾーン電気泳動条件においてリシンと糖鎖誘導体リガンドとの分離が観察されたが、ピークがブロードとなった。紫外線吸収検出においては抗体、毒素 SEB、複合体ともに感度が低いために現時点で解析が不可能であることが判明し、本法採用を断念した。

次に、ソフトイオン化 MS 法による毒物とリガンドとの非共有結合複合体の検出を検討した。MALDI-TOF-MS では、SEB および抗体由来の分子ピーク以外に複合体由来の非常に低いピークが認められた。同位体ヘテロと MS 分解能の限界から、SEB、リシンともに単一ピークながらブロードであり、低分子化合物との複合体の解析はリシンにおいては難しい。強度の関係で本法採用を断念した。

ESI-MS 装置により、リシン、SEB は 34 価を中央とした多価イオン群を与え、deconvolution 処理により一本のピークを示したが、リシンは複雑な多価イオン群を与え、deconvolution 処理が不可能であり、糖鎖ヘテロを解消する必要性が示された。ESI-タンデム MS (Q-TOF) 装置を用いて、SEB と市販抗 SEB モノクローナル抗体混合物を分析したところ、SEB および抗体由来ならびに非共有結合複合体の MS 検出で特徴的な多価イオンピークがクロマト分離され観察された。本法では、市販抗体試料に緩衝液が含有され、ESI を顕著に妨害し不検出となるために、抗体と SEB 混合試料をゲル濾過カラムでオンライン脱塩前処理を行っている。

SPR 法では、SEB を固定化したカルボキシメチルデキストランセンサーチップに、市販抗 SEB 抗体 53981 をアプライしたところ、明確な結合が観察された。また、抗体を固定化したチップに SEB をアプライしたところ、明確な結合が観察された。センサグラム解析により、 $k_a$  (1/Ms)、 $k_d$  (1/s) (両者から  $KD$  (M) が得られる)、 $R_{max}$  (RU) が計算され、 $KD$  値、 $R_{max}$  値から結合親和性、結合容量を評価する。リンカーの長さが異なる C1、CM3、CM5、CM7 センサーチップを固定化チップとして、抗 SEB マウスモノクローナル抗体（アブカム製 ab190465）を固定化したセンサーチップに SEB をアプライし、また反対に SEB を固定化したセンサーチップに抗体をアプライして得られるセンサグラムを解析したところ、短いリンカーの C1 チップの場合、固定化方式により  $KD$  値、 $R_{max}$  値に大きな差が認められ

なく、 $R_{max}$  値は数十 U であった。リンカーが長い CM3、CM5、CM7 のチップの場合、 $R_{max}$  値は数百 U 以上と高く、アナライト重量に反して抗体を固定化した場合の方が高かった。 $KD$  値は、SEB を固定化した場合の方が 100 倍程度以上低かった。抗体の評価に当たっては、CM5 センサーチップに固定化する方式とした。なお、毒素吸着性担体を作製するに当たって、リンカーの設計を考慮する必要があることが判明した。

(2) 候補分子認識素子の調製：ラクトース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、グルコース（対照）の還元末端をトリエチレングリコールまたはセラミド修飾した誘導体を 8 種合成し、糖鎖リガンドとして用いた。ラクトース、ガラクトースの還元末端誘導体（セラミド型）をチップ上に固定して局在 SPR 法または SPR 法で結合能を評価したところ、リシン擬剤の RCA120 に強い結合を認めた。同様に、リシンに対しても強い結合を認めた。

ファージディスプレイ法を活用して、SEB 結合性抗体様人工蛋白質である、単鎖可変領域断片 (scFv)、Fab 断片を調製し、SEB を共有結合させた CM3 センサーチップにアプライしたところ、明確な SPR 結合が観察された。

(3) 候補分子認識素子の選択：SPR 法で市販抗リシン抗体を固定化した CM5 センサーチップに SEB (濃度数点) をアプライし、また反対に SEB を固定化したチップに市販抗体 (濃度数点) をアプライして得られたセンサグラムを解析し、 $KD$  値、 $R_{max}$  値を求めた。Abcam 製などのマウスモノクローナル抗体 8 種、Abcam 製のウサギポリクローナル抗体 2 種の抗体標品を用いたところ、個々の抗体の種類により、 $KD$  値、 $R_{max}$  値に違いが認められた。3 種の抗体において、固定化方式により  $KD$  値、 $R_{max}$  値に差が認められなかった。6 種の抗体において、抗体を固定化して SEB をアプライした方式が低い  $KD$  値、高い  $R_{max}$  値を示した。これは、固定化の立体障害性を示している。解析結果を総合して比較したところ、抗体 ab686、GTX20686、ab8311 は  $R_{max}$  値が低くリガンドとして不適であり、GTX26065 は  $KD$  値が高く使用優先順位が低く、ab36471、ab15898、GTX39114、ab190465、2S4-S222 は  $KD$  値が低く  $R_{max}$  が高く、リガンドとして有望であった。

(4) 特異的除染法の開発：毒素認識素子である合成糖誘導体をシリカモノリス担体に固定化した。シリカモノリス担体表面のカルボン酸に、還元末端側にアミノ基を有する糖誘導体を用い、NHS ケミストリー法による糖固定化を行った。縮合剤の存在下、ガラクトース、ラクトース誘導体をマイクロ波照射して固定化し、糖修飾モノリスを作製した。吸着剤固定相には、カルボン酸修飾小型シリ

カモノリス担体 ( 2.8 mm×t1 mm ) を用いた。これらのチップの擬剤 RCA120 の吸着量は高いものではなかった。

そこで、糖固定化量を向上させるために、還元末端側にアジド基を有するラクトース誘導体およびガラクトース誘導体について、クリックケミストリー法を用いた糖導入法を開発した。あらかじめアルキン基を導入したカルボン酸修飾シリカモノリス担体について、マイクロ波照射下で2種類の糖誘導体を導入し、遠心チップフィルター(固定化糖 0.015 mmol ) とした。

( 5 ) 除染法開発戦略有効性の検証: ( 4 ) で調製した糖固定化シリカモノリスチップについて、リシン擬剤 RCA<sub>120</sub> を用いて吸着能を評価(素通画分のタンパク定量)したところ、いずれの糖リガンドにおいてもほぼ定量的に RCA<sub>120</sub> ( 0.015 mg ) を吸着した。次に、リシン実剤についての吸着評価(素通画分の ELISA 定量)を行ったところ、いずれの糖リガンドにおいても、0.1 mg のリシンを定量的に吸着し、0.2 mg のリシンを破過した。モノリスのスケールを上げることにより、吸着するリシン量を増加させることが可能であり、リシンの吸着除染フィルターの作製に重要な知見となった。

#### 引用文献

瀬戸 康雄、生物化学剤の除染法、薬学雑誌、129、2009、53 - 69

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

H.Kato, H.Uzawa, K.Sato, I.Ohsawa, M.Kanamori-Kataoka, Y.Takei, S.Ota, M.Furuno, Y.Nishida, Y.Seto: Preparation and evaluation of lactose-modified monoliths for the adsorption and decontamination of plant toxins and lectins, Carbohydrate Research, 346, 2011, 1820 - 1826

Y.Seto, Research and development of on-site decontamination system for biological and chemical warfare agents, Journal of Health Science, 57, 2011, 311 - 333

T.Nagatsuka, H.Uzawa, K.Sato, I.Ohsawa, Y.Seto, Y.Nishida, Glycotechnology for decontamination of biological agents: A model study using ricin and biotin-tagged synthetic glycopolymers, Applied Materials & Interfaces, 4, 2012, 832 - 837

T.Nagatsuka, H.Uzawa, K.Sato, S.Kondo, Izumi, M. K.Yokoyama, I.Ohsawa, Y.Seto, P.Neri, H.Mori, Y.Nishida, M.Saito, E.Tamiya, Localized surface plasmon resonance detection of biological toxins using cell surface oligosaccharides on glyco chips. ACS Applied Materials & Interfaces, 5, 2013, 4173 - 4180.

瀬戸 康雄、バイオテロ対策としての微生物現場制御、日本防菌黴学会誌、43、2015、191 - 200

〔学会発表〕(計 3 件)

瀬戸 康雄、バイオテロにおける現場対処、第 24 回微生物シンポジウム「微生物の進歩～その基礎から応用まで」(日本薬学会) 2012.9.3 - 4、大阪

Y.Seto, T.Ohmori, M.Kanamori-Kataoka, K.Tsuge, I.Ohsawa, S.Kishi, Y.Urushibata, K.Sato, A.Komano, H.Uzawa, T.Nagatsuka, K.Takeuchi, N.Negishi, T.Hirakawa, M.Furuno, Development of on-site decontamination technologies- Photocatalytic degradation for chemical warfare agents and molecular recognition adsorption for biological toxins, 11th Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents at Stockholm, June 3 - 5, 2013

Y.Seto, Development of on-site technologies for decontaminating chemical and biological warfare agents, CBRNe Convergence Asia at Tokyo, June 2, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称: 毒素またはウイルス含有汚染液の固相抽出方法および無毒化方法、並びにそれに用いる固相抽出用捕集剤および除染剤

発明者: 加藤治人、鶴沢浩隆、永塚健宏、瀬戸康雄、大沢勇久、佐藤啓太、駒野明香、古野正浩、武井義之、太田茂徳、西田芳弘

権利者: (独) 産業技術総合研究所、科学警察研究所、(株)ジーエルサイエンス

種類: 特許

番号：特許第5392528号  
取得年月日：平成25年10月25日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬戸 康雄 (SETO, Yasuo)  
科学警察研究所・法科学第三部・部長  
研究者番号：10154668

### (2) 研究分担者

鶴沢 浩隆 (UZAWA, Hirotaka)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所  
ナノシステム研究部門・上級主任研究員  
研究者番号：60356566

大沢 勇久 (OHSAWA, Isaku)  
科学警察研究所・法科学第三部・  
主任研究官  
研究者番号：30370886

宮口 一 (MIYAGUCHI, Hajime)  
科学警察研究所・附属鑑定所・鑑定官  
研究者番号：10370884

### (3) 連携研究者

なし