

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20750057

研究課題名（和文）細菌性毒素の新規磁気分離－電気化学センシングシステムの開発

研究課題名（英文）Electrochemical sensing for bacterial toxins using magnetic microbeads

研究代表者

倉光 英樹 (Kuramitz Hideki)

富山大学・大学院理工学研究部（理学）・准教授

研究者番号：70397165

研究成果の概要（和文）：一連の分析過程において試薬の添加を一切必要としない、迅速・簡便かつ、磁気分離・高濃縮分析が可能なタンパク質の電気化学アッセイの開発に成功した。本法は、電極活性とタンパク質認識能を有する磁性マイクロ粒子に、分析対象であるタンパク質が結合した際に得られる応答変化からタンパク質を定量する方法である。代表的な細菌性毒素タンパク質であるコレラ毒素アッセイへの応用を達成した。

研究成果の概要（英文）：The electrochemical analytical method for protein without addition of any reagents were developed. The protein as an analyte can be highly concentrated by magnetic recovery which contributes high sensitively for the assay. The changes in electrochemical response of the magnetic micro-beads modified an electroactive compound and protein recognition molecule were observed by binding the target protein. The application for cholera toxin assay has also been achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：毒素タンパク質，電気化学検出，磁性マイクロ粒子，電極活性物質，対流ボルタメトリー，磁気分離

1. 研究開始当初の背景

水系感染症の流行は既に過去のものと思われがちである。しかし、最近の SARS や鳥インフルエンザなどの流行が示すように、感染症が消滅することは無く、水系においても新興、再興の感染症に対して油断はできない。

現に、コレラなどの細菌性感染症が地球温暖化に伴い再流行・拡大することが懸念されており、疾患原因となる細菌そのものや、それらが生産する毒素のリスク管理が社会的に重要な課題となっている。予測困難な感染症による被害を未然に防ぐ対策として、飲料水

や食品に含まれる細菌性毒素の早期発見は有効な手段であり、細菌性毒素のアッセイは我々の生命や健康を維持する上で重要な役割を担っている。従って、より利便性の高い細菌性毒素の新規分析法の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、酵素免疫定量法 (ELISA) などの従来法よりも、簡便・迅速で、利便性の高い新しい細菌性毒素タンパク質の電気化学的スクリーニング試験の開発を行う。当該研究を遂行するために、細菌性毒素と親和性を有するリガンド分子と、電極活性物質を表面に修飾した磁性マイクロ粒子 (直径 ca. 0.1 ~ 3 μm) を作製する。この機能化磁性マイクロ粒子を利用し、試料中に含まれる細菌性毒素の磁気分離・高濃縮を伴う、酵素を利用しない、新しい電気化学センシングシステムの開発を目指す。マイクロ粒子を試料中に均一分散させ、細菌性毒素タンパク質を効率よく捕集し、磁力により分離・高濃縮する。磁性マイクロ粒子に結合した毒素は、粒子表面に修飾した電極活性物質から得られる応答変化をモニタリングすることにより検出する。すなわち、毒素タンパク質とスフィンゴ糖脂質との特異的な結合により引き起こされる、電極活性物質のタンパク質分子内への取り込みや、微粒子の凝集による、電流応答の減少を検出原理とする。当該研究で開発する分析法の最も大きな特徴は、分離・濃縮・検出の一連の分析過程において、試薬の使用が一切不要な点である。従って、ELISA などの既存法と比較して飛躍的な簡便・迅速化が期待でき、利便性の高い細菌性毒素の試験法となり得る。

3. 研究の方法

(1) 電極活性物質とリガンドを修飾させた機能性磁性マイクロ粒子を作製した。直径 1.0 μm のフェライト粒子表面にリガンドと電極活性物質を化学結合法により修飾した。磁性マイクロ粒子同士の凝集を防ぐために種々のブロッキング剤を検討した。粒子表面に電極活性物質である PQQ とリガンドであるビオチンまたはラクトースを直列に修飾させた磁性マイクロ粒子を調製し、電気化学的応答特性とタンパク質 (アビジン、またはコレラ毒素) との結合性評価した。また、粒子表面に修飾した各分子を定量し、作成した機能性磁性マイクロ粒子のキャラクタリゼーションを行った。

(2) 機能性磁性マイクロ粒子の電気化学的測定法を検討した。本法では、磁性マイクロ粒子の表面に修飾した電極活性物質からの応答を利用してタンパク質を検出するため、電極活性物質の拡散定数を著しく低下させてしまうことになる。従って、溶存

の電極活性化学種を測定するための一般的な電気化学セルを用いた方法では、十分な感度を得ることができなかった。そこで、回転ディスク電極 (RDE) を用いた液滴測定法によりこの問題の克服を試みた。試料溶液から磁気分離により回収したマイクロ粒子を、20~40 μL の懸濁液とし、疎水化処理した基板と作用電極とで挟み込み、液滴として保持したうえで電極に回転をかけた。約 4000 rpm 以下の回転速度であれば液滴は弾け飛ばずに、電極表面に保持された。測定に用いる磁性マイクロ粒子数、回転速度、電気化学的測定モードなど種々の条件を検討した。

(3) 磁気分離・高濃縮がどの程度の試料容量にまで適用可能であるかを検討した。磁気トラップとして希土類磁石を用い、遠心分離器で試料溶液中に分散させた磁性マイクロ粒子を回収し、システムの高感度化を検討した。

4. 研究成果

アミノ基を表面に有する磁性粒子 (直径 1 μm) にアミド結合を介して電極活性物質 (PQQ) を修飾させ、更にビオチン、或いはラクトースを結合させた機能性磁性粒子を調整した。磁石を包埋させた回転ディスク電極を用い、機能性磁性粒子の電極応答を測定した結果、磁石を包埋させていない電極と比較して約 5 倍の電流応答が得られた。これは、機能性磁性粒子が回転電極表面に磁気濃縮されたためであると考えられる。40 μL の液滴に分散させた磁性粒子は電極を回転させることにより迅速に回収され、定量的な応答を与えた。機能性磁性粒子を 200 μL のアビジン水溶液に懸濁させた後に、その応答を測定したところ、試料溶液中のアビジン濃度の増加に伴い応答の減少が得られた。この現象は、機能性磁性粒子表面の PQQ 分子がビオチンと共にアビジンによって被覆されることに起因すると考えられる。更に、ビオチンの代わりにラクトースを修飾した機能性磁性粒子を用いて、コレラ毒素と γ -グロブリンによる応答変化を測定した結果、コレラ毒素と反応させた場合では応答の減少が得られたのに対して、 γ -グロブリンと反応させても応答に変化はみられなかった。従って、ラクトースを修飾した機能性粒子はコレラ毒素と特異的に結合することでシグナルの変化をもたらすことが明らかとなった。さらに、試料溶液の容量を大きくして、磁気分離・高濃縮によるシステムの高感度化を検討した結果、10 mL の試料溶液からは磁性粒子が定量的に回収可能であることが明らかとなった。

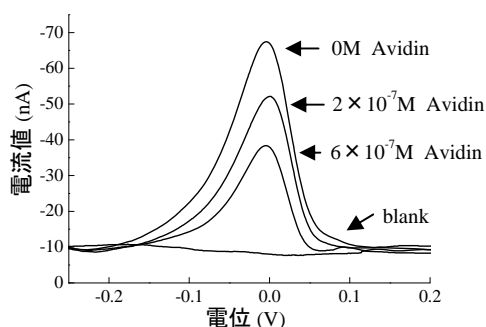


図. アビジン結合時の電流応答の変化

本研究では、一連の検出過程において試薬の添加を一切必要としない、迅速かつ簡便なタンパク質アッセイの開発に成功し、代表的な細菌性毒素タンパク質であるコレラ毒素アッセイへの応用を達成した。

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 13 件)

- ① K. Sugawara, A. Yugami, N. Terui, and H. Kuramitz, *Analytical Sciences*, **2009**, *25*, 1365-1368.
 - ② K. Sugawara, A. Yugami, and H. Kuramitz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, *395*, 767-772.
 - ③ 倉光英樹, 佐澤和人, 七山泰昭, 工藤千春, 川上貴教, 波多宣子, 田口 茂, *水環境学会誌*, **2009**, Vol. 32, No. 6, 309-314.
 - ④ H. Kuramitz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, *394*, 61-69.
 - ⑤ K. Sugawara, M. Kawai, G. Hirabayashi, and H. Kuramitz, *Analytical Sciences*, **2009**, *25*, 105-108.
 - ⑥ H. Kuramitz, A. Piruska, H. B. Halsall, C. J. Seliskar, and W. R. Heineman., *Analytical Chemistry*, **2008**, *80*, 9642-9648.
 - ⑦ K. Murai, M. Okano, H. Kuramitz, N. Hata, T. Kawakami, and S. Taguchi., *Analytical Sciences*, **2008**, *24*, 1455-1459.
 - ⑧ K. Murai, M. Okano, H. Kuramitz, N. Hata, T. Kawakami, and S. Taguchi., *Water Science and Technology*, **2008**, *58*, 1055-1060.
 - ⑨ M. Nakayama, N. Hata, H. Kuramitz, and S. Taguchi., *Journal of Environmental Chemistry*, **2008**, *18*(3), 353-360.
 - ⑩ N. Hata, S. Hieda, M. Yamada, R. Yasui, H. Kuramitz, and S. Taguchi., *Analytical Sciences*, **2008**, *24*, 925-928.
 - ⑪ K. Sugawara, A. Senbongi, N. Kamiya, G. Hirabayashi, and H. Kuramitz., *Analytical Sciences*, **2008**, *24*, 717-720.
 - ⑫ K. Sugawara, A. Terauchi, N. Kamiya, G. Hirabayashi, and H. Kuramitz., *Analytical Sciences*, **2008**, *24*, 583-587.
 - ⑬ 関山沙織, 倉光英樹, 波多宣子, 田口 茂., *分析化学*, **2008**, *57*, 613-618.
- [学会発表] (計 35 件)
- ① H. Kuramitz, M. Takeuchi, K. Sazawa, M. Ikeuchi, N. Hata, S. Taguchi, 10th Asian Conference on Analytical Sciences 2009 (ASIANALYSIS X), 11-13, Aug., 2009, KL, Malaysia, BEF32.
 - ② H. Kuramitz, Y. Nanayama, K. Sazawa, N. Hata, and S. Taguchi, Asia Young Analytical Chemist Session (AYACS) 2009, 10, Aug., 2009, KL, Malaysia, AYACS13.
 - ③ 福島正巳・石田洋輔・重松聡子・倉光英樹, 第 25 回日本腐植物質学会講演会, 2009, 11 月 25 日～26 日, 姫路県立大学 (姫路市), s-9.
 - ④ 原夕貴・倉光英樹・波多宣子・田口茂, 第 25 回日本腐植物質学会講演会, 2009, 11 月 25 日～26 日, 姫路県立大学 (姫路市), s-19.
 - ⑤ 王文婧・倉光英樹・波多宣子・田口茂, 第 40 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2009 年 11 月 7 日～8 日, 岐阜大学 (岐阜市), 2D14.
 - ⑥ 倉光英樹, 第 40 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2009 年 11 月 7 日～8 日, 岐阜大学 (岐阜市), 1D05.
 - ⑦ 波多宣子・安井理恵・橋本真之介・倉光英樹・田口茂, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日～26 日, 北海道大学 (札幌市), D3026.
 - ⑧ 中川和也・波多宣子・倉光英樹・田口茂・千葉元, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日～26 日, 北海道大学 (札幌市), A2009.
 - ⑨ 由上麻子・高橋哲史・照井教文・倉光英樹・菅原一晴, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日～26 日, 北海道大学 (札幌市), B3001.
 - ⑩ 佐澤和人・倉光英樹・波多宣子・田口茂, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日～26 日, 北海道大学 (札幌市), Y1133.
 - ⑪ 橋本真之介・安井理恵・波多宣子・倉光英樹・田口茂, 第 28 回分析化学中部夏期セミナー, 2009 年 8 月 18 日～19 日, サンレイク美浜 (静岡県浜松市), P07.
 - ⑫ 佐澤和人・七山泰昭・倉光英樹・波多宣子・田口茂, 第 28 回分析化学中部夏期セミナー, 2009 年 8 月 18 日～19 日, サンレイク美浜 (静岡県浜松市), P06.
 - ⑬ 波多宣子・安井理恵・寺島俊平・倉光英樹・田口茂, 第 70 回分析化学討論会, 2009, 5 月, 和歌山, P1026.
 - ⑭ 菅原一晴・由上麻子・照井教文・倉光英

樹, 第 70 回分析化学討論会, 2009, 5 月, 和歌山, D1012.

- ⑮ 佐澤和人・倉光英樹・菅原一晴・波多宣子・田口茂, 第 70 回分析化学討論会, 2009, 5 月, 和歌山, E2013.
- ⑯ 村居景太・倉光英樹・波多宣子・田口茂, 日本化学会第 89 春季年会, 2009, 3 月, 東京, 2H3-16.
- ⑰ 工藤千春・倉光英樹・波多宣子・田口茂, 平成 20 年度日本水環境学会中部支部学術集会, 2008, 12 月, 富山, P24.
- ⑱ 佐澤和人・倉光英樹・波多宣子・田口茂, 平成 20 年度日本水環境学会中部支部学術集会, 2008, 12 月, 富山, P23.
- ⑲ 中川和也・波多宣子・倉光英樹・田口茂・千葉 元, 平成 20 年度日本水環境学会中部支部学術集会, 2008, 12 月, 富山, P22.
- ⑳ 村居景太・新美紗恵子・倉光英樹・波多宣子・田口茂・川崎清人・木戸瑞佳, 平成 20 年度日本水環境学会中部支部学術集会, 2008, 12 月, 富山, P21.

など

[図書] (計 2 件)

- ① 倉光英樹 (共著) 第 11 章 水環境の汚染「自然と経済から見つめる北東アジアの環境」和田直也, 今村弘子編著, 富山大学出版会, 頁 201-221, **2009**.
- ② 倉光英樹 (共著) 第 14 章 環境修復「自然と経済から見つめる北東アジアの環境」和田直也, 今村弘子編著, 富山大学出版会, 頁 267-285, **2009**.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉光 英樹 (Kuramitz Hideki)
富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・
准教授
研究者番号: 70397165

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

