様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：８２６２６
研究種目：若手研究
研究期間：2022～2023
課題番号：２２Ｋ１４５５１

研究課題名（和文）糖鎖高分子膜のデザイン制御を用いたプラズモンバイオセンシング

研究課題名（英文）Plasmonic Biosensing using Glycopolymer layer with controlled design

研究代表者
寺田　侑平（Terada, Yuhei）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・研究員

研究者番号：８０８７０２３７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：金属表面に固定された生体分子間の結合を光学的に検出する表面プラズモン共鳴（SPR）をベースとしたセンサーの表面設計を工夫することで、SPRセンサーの検出機能の向上を試みた。標的分子を捕捉するための分子認識素子として糖鎖高分子を採用し、その長さ、糖鎖の種類、糖鎖の導入率が異なるものそれぞれに対して標的分子の検出機能を評価した。また、糖鎖高分子と生体分子の結合を網羅的に解析するバイオセンシングシステムも構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では、これまで糖鎖による認識が深く知られていない生体分子に対する糖鎖高分子の結合について調べた。糖鎖高分子がターゲットとしてきた生体分子の多くは糖鎖認識性タンパク質のレクチンであったが、レクチン以外のタンパク質や酵素などに対する糖鎖による認識の可能性を見出すことができた。今後、糖鎖高分子を用いたバイオセンサーによって検出可能な生体分子のレパートリーが増えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Improvement of Surface Plasmon Resonance (SPR) based biosensors that can detect biological interaction on a metal surface by controlling the surface design was attempted. Glycopolymer was used as a molecular recognition material to capture target molecule on the biosensor surface. Change in detection function of the SPR biosensor by controlling the polymer length, glycan type, and glycan incorporation ratio was evaluated. Biosensing system for exhaustive analysis of interaction between glycopolymers and biomolecules were also constructed.

研究分野：分析化学

キーワード：糖鎖高分子　表面プラズモン共鳴　バイオセンシング　タンパク質　分子認識

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

生体分子間の相互作用を利用して、標的とするウイルスやタンパク質など生の体分子を検出するバイオセンサーは主に二つの部位から構成される。それぞれ標的分子と結合する分子認識素子および標的分子の捕捉を電気信号に変換する検出部位である。これまでのバイオセンサー開発および改良では、主に検出部位の観点から新たな検出方法やプラットフォームを開発するのが主流であった。そこで研究代表者は分子認識素子の観点から、センサーにおいて標的分子を捉える表面の部分に固定する材料の設計を工夫することでセンサーの機能向上を試みる方法に着目した。

分子認識素子として、糖鎖高分子が魅力的であると考えた。糖鎖は細胞の表面でタンパク質を特異的に認識することが知られている。また、糖鎖は密集することでタンパク質に対して多価の結合を形成することで、その結合力を増幅させることができる。この効果は糖鎖を高分子側鎖に吊り下げた糖鎖高分子を用いることでも発揮することができ、標的に対して特異的かつ強固な結合を発揮する材料は分子認識素子として有用である。さらに近年の高分子合成技術の進歩によって nm 規模の精密な設計制御も可能となってきた。バイオセンサーの分子認識素子としてこれまでは抗体が主に用いられてきたが、センサー表面への固定化に多段階の操作を必要とし、精密な設計が困難であった。糖鎖高分子が抗体と同様に優れた分子認識を発揮することが可能になれば、抗体の代替材料として期待できる。

検出部位のプラットフォームとしては、光学的手法の表面プラズモン共鳴（SPR）センサーに着目した。金属表面に固定された分子認識素子に標的分子が結合した際に生じる、金属表面近傍の屈折率変化によって、金属表面に照射した光のスペクトルや反射率が変化する現象を利用し生体分子間の相互作用を解析することができる手法である。SPR センサーは、その特徴として金属表面に形成する分子認識素子の形態を変化させることでセンサーの検出機能も制御可能である。つまり、糖鎖高分子のように精密な設計制御が可能な材料と SPR センサーの相性は良く、これまで検出できなかった生体分子の検出も可能になると考えられる。

２．研究の目的

SPR をベースとしたバイオセンサーを用いて、その表面を精密に設計することでこれまでは検出が困難であった微小なタンパク質や酵素を検出できるように、SPR センサーの検出機能の向上を目指す。また、糖鎖による認識について情報の少ない生体分子と糖鎖高分子の相互作用についても調査を行う。そのために有効な SPR-糖鎖高分子のバイオセンシングシステムの構築も目指した。

３．研究の方法

（１）糖鎖高分子の合成

高分子主鎖の長さを制御でき、なおかつ高分子末端にチオール基を形成させることができる可逆的付加開裂連鎖移動重合を用いて、SPR センサーの金表面に直接固定化が可能な糖鎖高分子の合成を行った。高分子合成に必要な糖鎖を有するモノマーについては、受託合成にて入手した。糖鎖の種類、高分子主鎖の長さおよび高分子鎖に対する糖鎖導入率が制御された糖鎖高分子をそれぞれ合成した（図 1）。

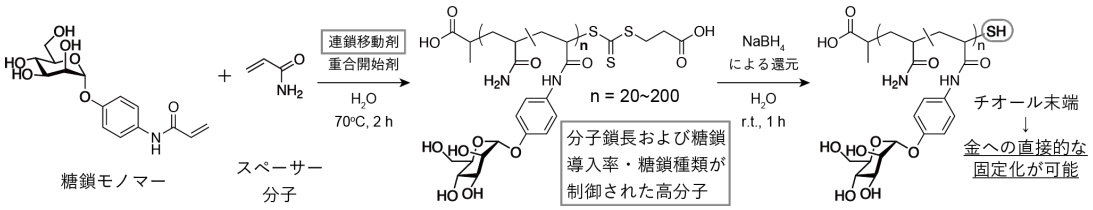

図 1. 糖鎖高分子合成（糖鎖がマンノースの場合）

（２）SPR ベースのバイオセンサーを用いた生体分子吸着の検出

まず、SPR を発揮させるための金がスパッタされたセンサーチップ上の金表面に、標的分子と結合する分子認識素子を固定化した。続いてセンサーチップ上に緩衝液を加え、センサーチップに照射した光の反射率・透過率を測定し、経時変化のモニタリングを行った。その後、センサーチップ上の金表面に標的分子が吸着する前後の反射率または透過率を測定し、その変化量からセンサーチップの金表面上に固定化された分子認識素子に対する標的分子の結合を検出・解析した。

４．研究成果

（１）糖鎖高分子の合成

糖鎖含有モノマー、アクリルアミド、重合開始剤、可逆的付加開裂連鎖移動重合のための連鎖移動剤をそれぞれ種々の仕込み比で水に溶解させ、オイルバス中において 70 度で 2 時間反応させることで合成を行った。まずはマンノースという糖鎖をベースに、高分子主鎖の長さが 20～200 量体のものを合成した。また、高分子主鎖の長さが 100 量体のものをベースにマンノースの高分子鎖に対する導入率が 30～100%の糖鎖高分子もそれぞれ合成した。さらに、高分子主鎖の長さが 50 量体のものをベースに糖鎖の種類がそれぞれグルコース、ガラクトース、N-アセチルノイラミン酸の糖鎖高分子も合成した。各モノマーの高分子への転換率については核磁気共鳴装置を用いて解析した。いずれの高分子においても転換率が 95%以上であり、重合が正しく進行したことが示唆された。

（２）局在型表面プラズモン共鳴を用いた細胞分泌タンパク質の検出

センサーチップ上の金属部分をナノ構造にすることで、局在型表面プラズモン共鳴（LSPR）を発揮させることができる。LSPR は通常の SPR に比べて光学系を簡便化することができ、装置の小型化や汎用性の向上に有用である。本系では、樹脂フィルムに対して多孔質のアルミ鋳型を熱インプリントで押し付けることによって、ピラー型のナノ構造（ナノピラー）を有するセンサーチップを作成した。作製したチップは、LSPR によって照射した光の透過率スペクトルのシフトから標的分子の吸着を検出することができる[1]。さらに、熱インプリントを施すことによってマイクロウェルを形成させ、センサーチップ上に細胞を捕捉することも可能になった。

捕捉した細胞から分泌される微小なタンパク質の、マイクロウェル周囲のナノピラー構造に対する吸着を直接検出することができた。タンパク質を過剰に分泌する細胞と通常細胞で比較した場合、タンパク質を過剰に分泌する細胞でのみ LSPR による信号変化を得ることができた。つまり、タンパク質特異的な検出を達成したことが示唆された。今後、ナノピラーの表面設計をより細かく制御することにより、さらなる検出機能の向上が期待される。

（３）SPR イメージングを用いたバイオセンシングシステムの構築および未知タンパク質の検出

糖鎖高分子と生体分子の相互作用について網羅的に解析するために、SPR イメージングを採用した。ガラス基板上に直径 1 ㎜程度の金スポットが並んだセンサーチップ上に合成した種々の糖鎖高分子を末端のチオール基によって固定化することで、糖鎖高分子アレイを作製した。そこに標的分子の溶液を加えた際に生じる、センサーチップに照射された光の反射率変化からそれぞれの金スポット固定された糖鎖高分子に対する標的分子の吸着を測定した。

まず、マンノースを認識するタンパク質の Concanavalin A（ConA）を標的分子として、それぞれ糖鎖の種類がマンノース、グルコース、ガラクトース、*N*-アセチルノイラミン酸の長さ 50 量体の糖鎖高分子に対して ConA 吸着を測定した。4 種類の糖鎖高分子のうちマンノースを導入した糖鎖高分子に対して最も大きな反射率変化が観測され、他の糖鎖を導入した糖鎖高分子については、反射率変化量はその 40%以下であった。すなわち糖鎖高分子-タンパク質の特異的な結合を検出することができた。また、マンノースの導入率が異なる糖鎖高分子に対する ConA の吸着について同様に SPR イメージングにて測定したところ、大きな差異はなかった。高分子主鎖の長さの違いに関しては、長い主鎖の糖鎖高分子に対して大きな反射率変化が得られ、高感度な検出に向けた糖鎖高分子の設計指針の一つが明らかとなった。以上の結果を総合して、網羅解析に向けた糖鎖高分子-SPR バイオセンシングシステムの概念実証も達成されたといえる。

また、糖鎖による認識の情報が少ない生体分子の検出に向けて、糖鎖との結合について前例のない補酵素 FO を標的分子として同様に糖鎖の種類がマンノース、グルコース、ガラクトース、*N*-アセチルノイラミン酸の長さ 50 量体の糖鎖高分子に対して SPR イメージング測定を行った。その結果、全ての糖鎖高分子に対し FO の吸着による反射率変化が得られた。糖鎖の種類の違いによる反舎利変化量の違いに大きな差異はなかった。糖鎖による認識が未知な生体分子に対して結合を示す糖鎖高分子が存在する可能性が見出された。

参考文献

[1] M.Saito et al., *Anal. Chem.* 2012, 84, 13, 5494-5500

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Terada Yuhei、Obara Ain、Briones Jonathan Campos、Luo Xi、Espulgar Wilfred Villariza、Saito Masato、Takamatsu Hyota、Tamiya Eiichi	４．巻 14
２．論文標題 Development of Nano?Micro Fused LSPR Chip for In Situ Single-Cell Secretion Analysis	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Micromachines	６．最初と最後の頁 1404～1404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi14071404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 寺田侑平、青木寛
２．発表標題 糖鎖高分子-SPRI バイオセンサーを用いたタンパク質認識能解析
３．学会等名 令和５年度東日本分析化学若手交流会
４．発表年 2023年

１．発表者名 寺田侑平、青木寛
２．発表標題 糖鎖高分子-SPRI バイオセンシングシステムの構築
３．学会等名 日本分析化学会第７２年会
４．発表年 2023年

１．発表者名 寺田侑平、青木寛
２．発表標題 糖鎖高分子を分子認識素子としたSPRI バイオセンシング
３．学会等名 第84回応用物理学会秋季学術講演会
４．発表年 2023年

１．発表者名
寺田侑平、高松漂太、齋藤真人、民谷栄一

２．発表標題
糖鎖高分子ブラシによる免疫関連タンパク質のバイオセンシング

３．学会等名
第16回バイオ関連化学シンポジウム

４．発表年
2022年

１．発表者名
寺田侑平、高松漂太、齋藤真人、民谷栄一

２．発表標題
免疫関連タンパク質の検出に向けた糖鎖高分子膜-LSPR バイオセ ンサー

３．学会等名
日本分析化学会第71年会

４．発表年
2022年

１．発表者名
寺田侑平、高松漂太、齋藤真人、民谷栄一

２．発表標題
マンノース糖鎖高分子バイオセンサーを用いたサイトカイン検出

３．学会等名
第41回糖質学会年会

４．発表年
2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関