

学位論文題名

Electroanalytical Study on the Interaction between Proteins and Their Ligands

(タンパクーリガンド間相互作用の電気分析化学的研究)

学位論文内容の要旨

生体内における種々の反応や情報の伝達機構は様々な分子認識能を有するタンパクとそのリガンドとの結合によって誘起・調整される。この様なタンパクーリガンド間相互作用を簡便・迅速に検出・評価するため、様々なバインディングアッセイ法が適用されている。放射性同位体でラベル化したリガンドを用いた手法は高感度であるためこれまで汎用されてきたが、取り扱いや廃棄に問題が生じる。従って、酵素や蛍光分子などをプローブとした分光学的手法が近年多く提案されている。これらのアッセイ法は十分な感度を有するものの、その多くは測定の前にタンパクと結合したりリガンドと遊離のリガンドとの分離操作(ろ過、遠心分離、活性炭吸着など)を必要とする。この事は分析操作を煩雑にするだけでなく、分離操作過程で平衡の変化をもたらす恐れがあり、特に外因性内分泌攪乱化学物質の様なタンパクとの結合力が比較的低い物質のアッセイにおいては致命的な欠点と成り得る。一方、電気化学的手法をバインディングアッセイへ導入する事は、簡便・迅速といった電気化学的手法の持つ利点をバインディングアッセイにもたらす。しかしながら、電気化学的バインディングアッセイの開発は米国の Heinemann らを始めとするいくつかの研究グループによって取り組まれているものの、その数は少なく体系づけられてはいない。

本研究では、アビジンービオチン、レクチンー糖をタンパクーリガンドのモデルとし、煩雑な分離操作を必要としない電気化学的バインディングアッセイ法の開発を試みた。また、本法の外因性内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験への応用について検討した。

本論文は、8章から構成されている。第1章では、これまでに報告されている電気化学的手法を利用したバインディングアッセイについて解説し、本研究の目的とその概要について記述した。第2章～第5章では、電極活性物質でラベル化したリガンドを用いたアビジンービオチン、及びレクチンー糖の電気化学的ホモジニアスバインディングアッセイを試みた。第6章、第7章では、ラベル化リガンドを必要としない簡便なバインディングアッセイを達成するため、リガンドを修飾した電極をデザインし、酸化・還元活性マーカの電極応答からタンパクをセンシングする手法を検討した。第8章では、女性ホルモンであるエストラジオールを電極活性物質でラベル化したリガンドを用い、外因性内分泌攪乱化学物質のレセプターへの結合能を評価した。以下、第2章から8章までの概要を述べる。

第2章では、ドーパミンでラベル化したビオチンを用いたアビジンービオチンアッセイを記述した。一般に、酵素をラベル化剤として使用する手法は、酵素反応によって生じる電極活性な基質の応答からタンパクーリガンド間相互作用を評価するため、電極活性物質をラベル化剤として用いる手法と比較して高感度である。従って、従来の電気化学的バインディングアッセイにおいては酵素ラベル化法が一般的であり、電極活性物質をラベル化剤として用いた例は極めて少ない。しかしながら、巨大分子である酵素をラベル化剤として用いた場合、

その大きな分子サイズによりリガンドとタンパクとの結合の選択性が損なわれる恐れがあることが指摘されている。一方、ドーパミンは NADH の酸化を触媒する事が知られている。バルク中に NADH を共存させることにより、ドーパミンでラベル化したビオチンが NADH の酸化を触媒するならば、酵素をラベル化剤として使わなくとも増幅された電極応答の変化からアビジン-ビオチンアッセイが可能となる。ドーパミンでラベル化したビオチンと NADH から得られる電気化学的触媒応答は、ラベル化ビオチンがアビジンと特異的に結合することにより減少した。この電極応答の変化からアビジンが間接的に検出された。また、アビジンに対してラベル化ビオチンとビオチンを競争反応させる事によりビオチンの検出も可能であることが示唆された。

第 3 章では、チオ尿素でラベル化したビオチンを用いたアッセイ法について検討した。チオ尿素は銅のアンオーディックストリップング波を増幅させる事が知られている。ここでは、この増感効果をバインディングアッセイに応用する事を目的とした。チオ尿素でラベル化したビオチンがアビジンと複合体を形成することにより、銅のストリップング波に対する増感効果が消失する事を利用してアビジン-ビオチンアッセイを行った。

第 4 章では、最も一般的な電極活性物質の 1 つであるフェロセンでラベル化したビオチンを調整し、カチオン交換能を有するナフィオンを修飾したカーボン電極上での濃縮挙動を未修飾のカーボン電極と比較して調査した。その結果、電気化学的酸化によりカチオン種（フェロセニウムイオン）のとしたラベル化ビオチンはナフィオン修飾電極に濃縮され、高感度な電気化学的アビジン-ビオチンバインディングアッセイを達成する事ができた。

第 5 章では、電極活性ラベル化剤としてダウノマイシンを適用し、レクチン-糖の電気化学的バインディングアッセイを試みた。ダウノマイシンでラベル化したガラクトサミンは電位制御濃縮ボルタンメトリーにより高感度に検出され、ガラクトサミンに対する結合サイトを有するレクチンの電気化学的検出を可能とした。

第 6 章では、金電極上に構築したビオチン自己集積単分子膜電極を用い、酸化・還元活性マーカ-の電極応答変化から、電極上に修飾したビオチンとアビジンとの相互作用を評価した。電極表面上にアビジン膜が構築されることにより、マーカ-イオンの電極応答はアビジンとの静電的な相互作用により変化する。このマーカ-イオンの応答変化をモニタリングすることにより、ラベル化分子を必要としない電気化学的バインディングアッセイを可能とした。

第 7 章では、前章に記述したアッセイシステムのレクチン-糖系への適用を検討した。ガラクトサミン自己集積単分子膜を金電極表面上に構築し、ガラクトサミンと特異的に結合するレクチンと、いくつかの結合サイトを持たないレクチンの電極挙動をマーカ-イオンの電極応答変化から検討した。

第 8 章では、本法の外因性内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験への応用を、ダウノマイシンでラベル化した 17 β -エストラジオールを用いて検討した。その結果、エストロゲンレセプターとラベル化エストラジオール間の相互作用の電気化学的モニタリングが可能である事が明らかとなり、ビスフェノール A やノニルフェノールといった内分泌攪乱化学物質とレセプターとの相互作用がラベル化エストラジオールの電気化学的応答変化から間接的に評価された。

以上の研究から、タンパク-リガンド間相互作用という化学的情報が電極活性物質でラベル化したリガンドの電流値変化や、電極表面上に固定化されたりタンパク複合体膜への酸化還元活性マーカ-イオンの膜透過性変化に伴う電極応答の変化という形に変換可能である事が明らかとなった。これらの手法はタンパクに結合したりリガンドと遊離のリガンドとの煩雑な分離操作を必要とせず、タンパク-リガンド複合体形成のモニタリングを可能とするものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田中	俊逸
副査	教授	長谷部	清
副査	教授	中村	博
副査	教授	大澤	雅俊
副査	助教授	嶋津	克明

学位論文題名

Electroanalytical Study on the Interaction between Proteins and Their Ligands

(タンパクーリガンド間相互作用の電気分析化学的研究)

生体内における種々の反応や情報の伝達機構は様々な分子認識能を有するタンパクとそのリガンドとの結合によって誘起・調整される。この様なタンパクーリガンド間相互作用を簡便・迅速に検出・評価するため、様々なバインディングアッセイ法が適用されている。放射性同位体でラベル化したリガンドを用いた手法は高感度であるためこれまで汎用されてきたが、取り扱いや廃棄に問題が生じる。従って、酵素や蛍光分子などをプローブとした分光学的手法が近年多く提案されている。これらのアッセイ法は十分な感度を有するものの、その多くは測定の前にタンパクと結合したリガンドと遊離のリガンドとの分離操作(ろ過、遠心分離、活性炭吸着など)を必要とする。この事は分析操作を煩雑にするだけでなく、分離操作過程で平衡の変化をもたらす恐れがあり、特に外因性内分泌攪乱化学物質の様なタンパクとの結合力が比較的低い物質のアッセイにおいては致命的な欠点と成り得る。一方、電気化学的手法をバインディングアッセイへ導入する事は、簡便・迅速といった電気化学的手法の持つ利点をバインディングアッセイにもたらす。しかしながら、電気化学的バインディングアッセイの開発は米国の Heinemann らを始めとするいくつかの研究グループによって取り組まれているものの、その数は少なく体系づけられてはいない。

本研究では、アビジンービオチン、レクチンー糖をタンパクーリガンドのモデルとし、いくつかの新たな電極活性物質でラベル化したリガンドを調整し、煩雑な分離操作を必要としない電気化学的バインディングアッセイ法の開発を試みている。特に感度を向上させるために、メディエーター分子によるラベル化と触媒電流の利用、フェロセンによるラベル化とその酸化によって生じるフェロセニウムイオンのナフィオン膜への濃縮などを用いる、いくつかの新しい方法について検討している。また、マーカージオンの膜透過性をタンパクーリガンド間相互作用で制御しうる電極系についても提案している。さらに、本法の外因性内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験への応用について検討したものである。

本論文は、8章から構成されている。第1章では、これまでに報告されている電気化学的手法を利用したバインディングアッセイについて解説し、本研究の目的とその概要について記述している。第2章では、ドーパミンでラベル化したビオチンを用いたアビジンービオチンアッセイを記述している。一般に、酵素をラベル化剤として使用する手法は、酵素反応に

よって生じる電極活性な基質の応答からタンパクーリガンド間相互作用を評価するため、電極活性物質をラベル化剤として用いる手法と比較して高感度である。従って、従来の電気化学的バインディングアッセイにおいては酵素ラベル化法が一般的であり、電極活性物質をラベル化剤として用いた例は極めて少ない。しかしながら、巨大分子である酵素をラベル化剤として用いた場合、その大きな分子サイズによりリガンドとタンパクとの結合の選択性が損なわれる恐れがあることが指摘されている。一方、ドーパミンは NADH の酸化を触媒する事が知られており、バルク中に NADH を共存させることにより、ドーパミンでラベル化したピオチンが NADH の酸化を触媒するならば、酵素をラベル化剤として使わなくとも増幅された電極応答の変化からアビジン-ピオチンアッセイが可能となると予測できる。ドーパミンでラベル化したピオチンと NADH から得られる電気化学的触媒応答は、ラベル化ピオチンがアビジンと特異的に結合することにより減少し、この電極応答の変化からアビジンが間接的に検出されることを示している。また、アビジンに対してラベル化ピオチンとピオチンを競争反応させる事によりピオチンの検出も可能であることを示唆している。第 3 章では、チオ尿素でラベル化したピオチンを用いたアッセイ法について検討している。チオ尿素は銅のアンオーディックストリッピング波を増幅させる事が知られているが、ここでは、この増感効果をバインディングアッセイに応用する事を目的とし、チオ尿素でラベル化したピオチンがアビジンと複合体を形成することにより、銅のストリッピング波に対する増感効果が消失する事を利用してアビジン-ピオチンアッセイを行うことに成功している。第 4 章では、フェロセンでラベル化したピオチンを調整し、カチオン交換能を有するナフィオンを修飾したカーボン電極上での濃縮挙動を未修飾のカーボン電極と比較して調査している。その結果、電気化学的酸化によりカチオン種（フェロセニウムイオン）となるラベル化ピオチンはナフィオン修飾電極に濃縮され、高感度な電気化学的アビジン-ピオチンバインディングアッセイを達成しうることを明らかにしている。第 5 章では、電極活性ラベル化剤としてダウノマイシンを適用し、レクチン-糖の電気化学的バインディングアッセイを試みている。ダウノマイシンでラベル化したガラクトサミンは電位制御濃縮ボルタメトリーにより高感度に検出され、ガラクトサミンに対する結合サイトを有するレクチンの電気化学的検出を可能としている。第 6 章では、金電極上に構築したピオチン自己集積単分子膜電極を用い、酸化・還元活性マーカ-の電極応答変化から、電極上に修飾したピオチンとアビジンとの相互作用を評価している。電極表面上にアビジン膜が構築されることにより、マーカ-イオンの電極応答はアビジンとの静電的な相互作用により変化する。この時の応答変化をモニタリングすることにより、ラベル化分子を必要としない電気化学的バインディングアッセイを可能としている。第 7 章では、前章に記述したアッセイシステムのレクチン-糖系への適用を検討している。ガラクトサミン自己集積単分子膜を金電極表面上に構築し、ガラクトサミンと特異的に結合するレクチンと、いくつかの結合サイトを持たないレクチンの電極挙動をマーカ-イオンの電極応答変化から検討している。第 8 章では、本法の外因性内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験への応用を、ダウノマイシンでラベル化した 17 β -エストラジオールを用いて検討した。その結果、エストロゲンレセプターとラベル化エストラジオール間の相互作用の電気化学的モニタリングが可能である事を明らかとしており、ビスフェノール A やノニルフェノールといった内分泌攪乱化学物質とレセプターとの相互作用がラベル化エストラジオールの電気化学的応答変化から間接的に評価されることを示している。

以上の研究から、タンパクーリガンド間相互作用という化学的情報が電極活性物質でラベル化したリガンドの電流値変化や、電極表面上に固定化されたりガンド-タンパク複合体膜への酸化還元活性マーカ-イオンの膜透過性変化に伴う電極応答の変化という形に変換可能である事を明らかとし、これらの手法はタンパクに結合したりガンドと遊離のリガンドとの煩雑な分離操作を必要とすることなく、タンパクーリガンド複合体形成のモニタリングを可能とするものとして期待できる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。