



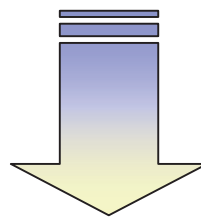
糖鎖クラスター効果を基盤としたバイオセンサーの新開発

埼玉大学理工学研究科・物質科学部門

講師 幡野 健

研究背景

新型インフルエンザ(H1N1型)の発生
(2009年5月)

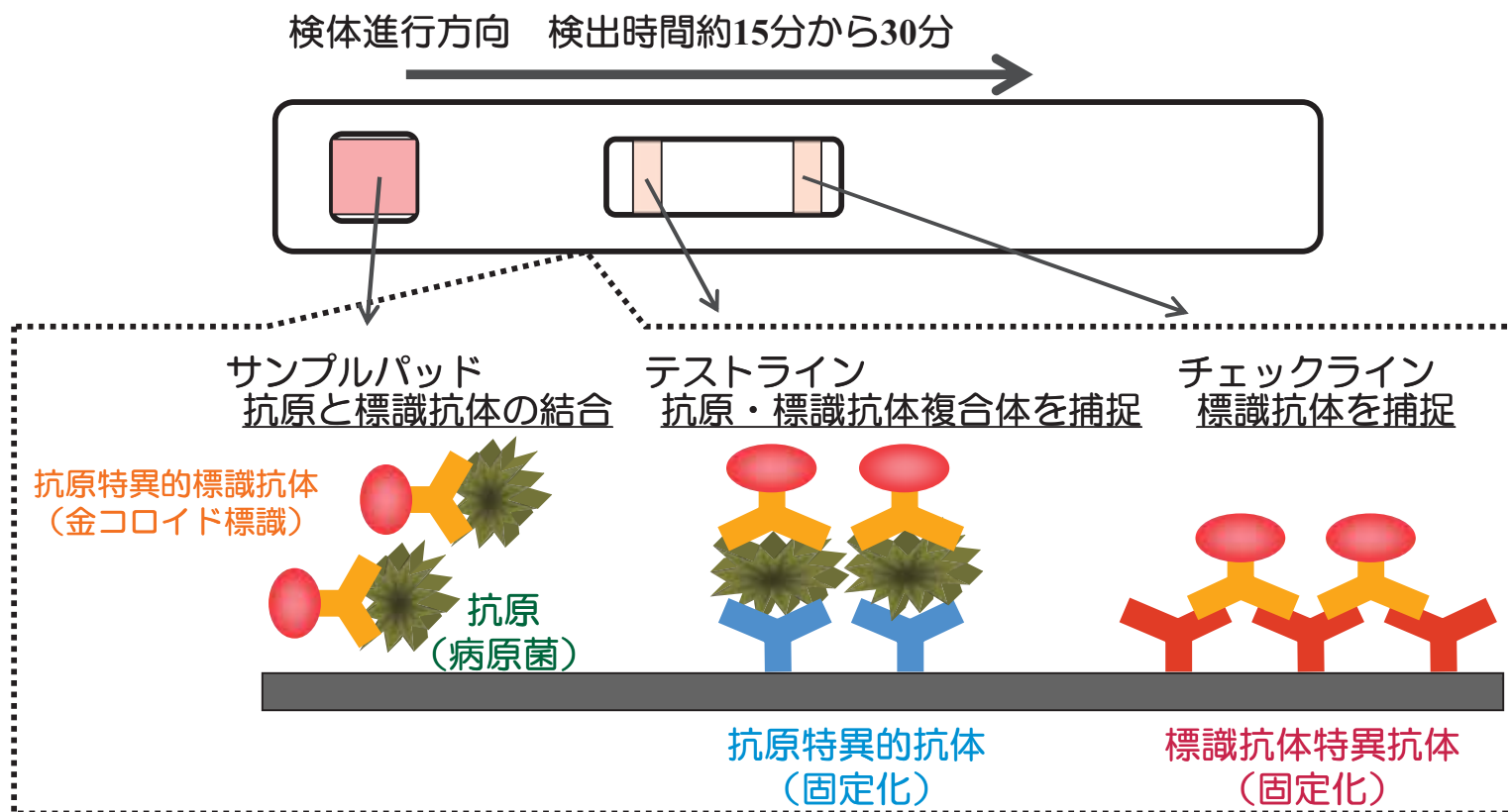


感染検査の重要性

今回、感染検査で用いられた方法

- ・ 1次検査(イムノクロマト)
⇒ A型,B型を判定
- ・ 2次検査(PCR法)
⇒ 感染源の特定

従来技術(イムノクロマト法)



標識抗体の金コロイド粒子が集積すると赤く見える

- ◎ 簡単に検査結果が迅速に得られる検査方法である。
- ◎ 検査対象(用途)が少ない。

従来法 (PCR法: Polymerase Chain Reaction)

- DNAの中から、特定のDNA断片だけを選択的に増幅することができる。
- 増幅に要する時間: 2時間程度



装置価格: 300万円～

検査場所: 特定検査機関など

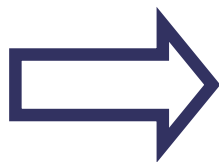
- ◎ 多種の感染症検査に適応可能
- ◎ 精度が高いが装置の値段も高い
- ◎ 時間がややかかる



本研究の目標

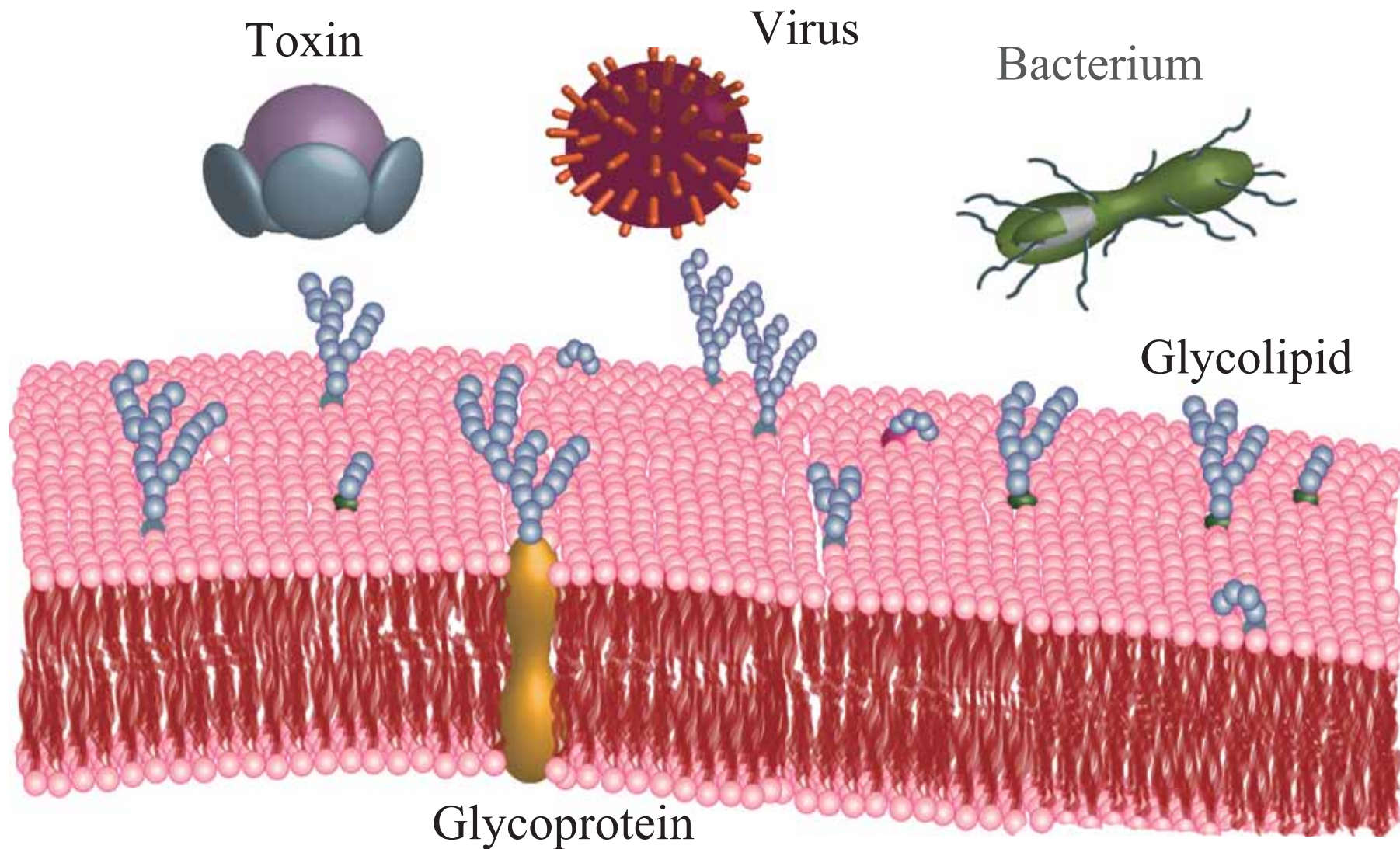
感染検査に求められる特性

- ・ 検査が簡単に行える
- ・ 結果が迅速に得られる
- ・ 精度が高い
- ・ 高額機器を用いない
- ・ 安価な方法
- ・ 検査対象が多い

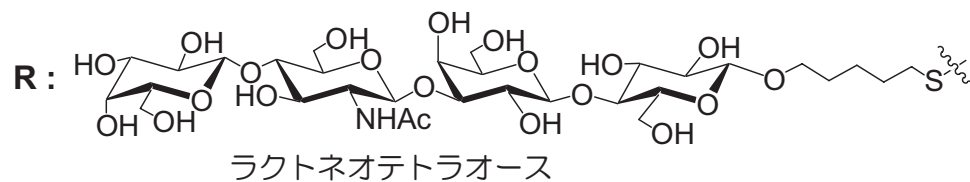
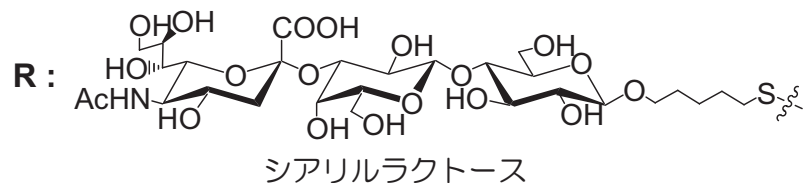
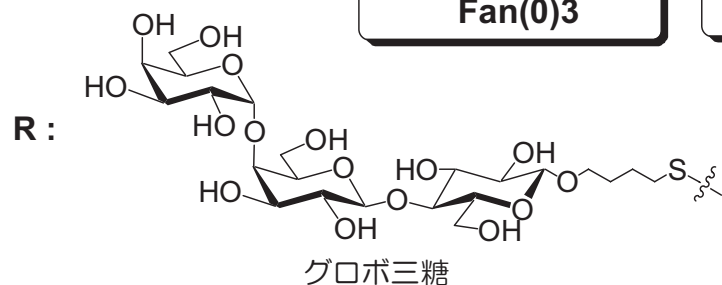
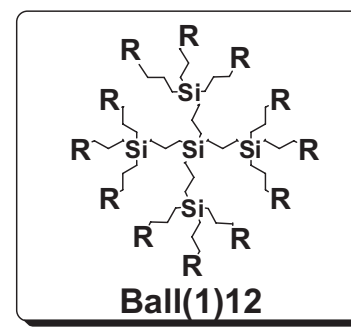
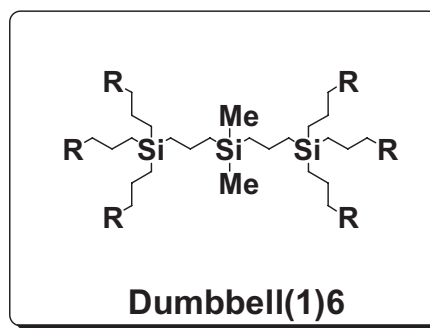
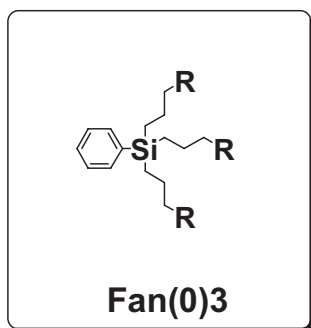


これらの特性を兼ね備えた理想的な検査方法は可能か！？

感染における糖鎖の役割



これまでの研究成果：糖鎖クラスター効果¹⁾



ベロ毒素 (O157)

Tetrahedron Lett., **1999**, 40, 7839-7842.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **2002**, 99, 7669-7674.

インフルエンザ

Bioorg. Med. Chem. Lett., **2008**, 18, 4405-4408.

デングウイルス

Carbohydr. Res. **2006**, 341, 467-473.

1) Y. C. Lee, *FASEB J.* **1992**, 6, 3193-3200.

これまでの研究を活かした検出薬の分子設計

■ 病原体の存在確認

糖鎖担持カルボシラン dendリマー群の病原体への特異的認識能・接着能を用いる(従来技術の利用)。

■ ビジュアル化

発光部位の導入で可能になる？

ただ発光するのみ ⇒ 蛍光標識、プローブ

発光が変化する ⇒ 検出薬

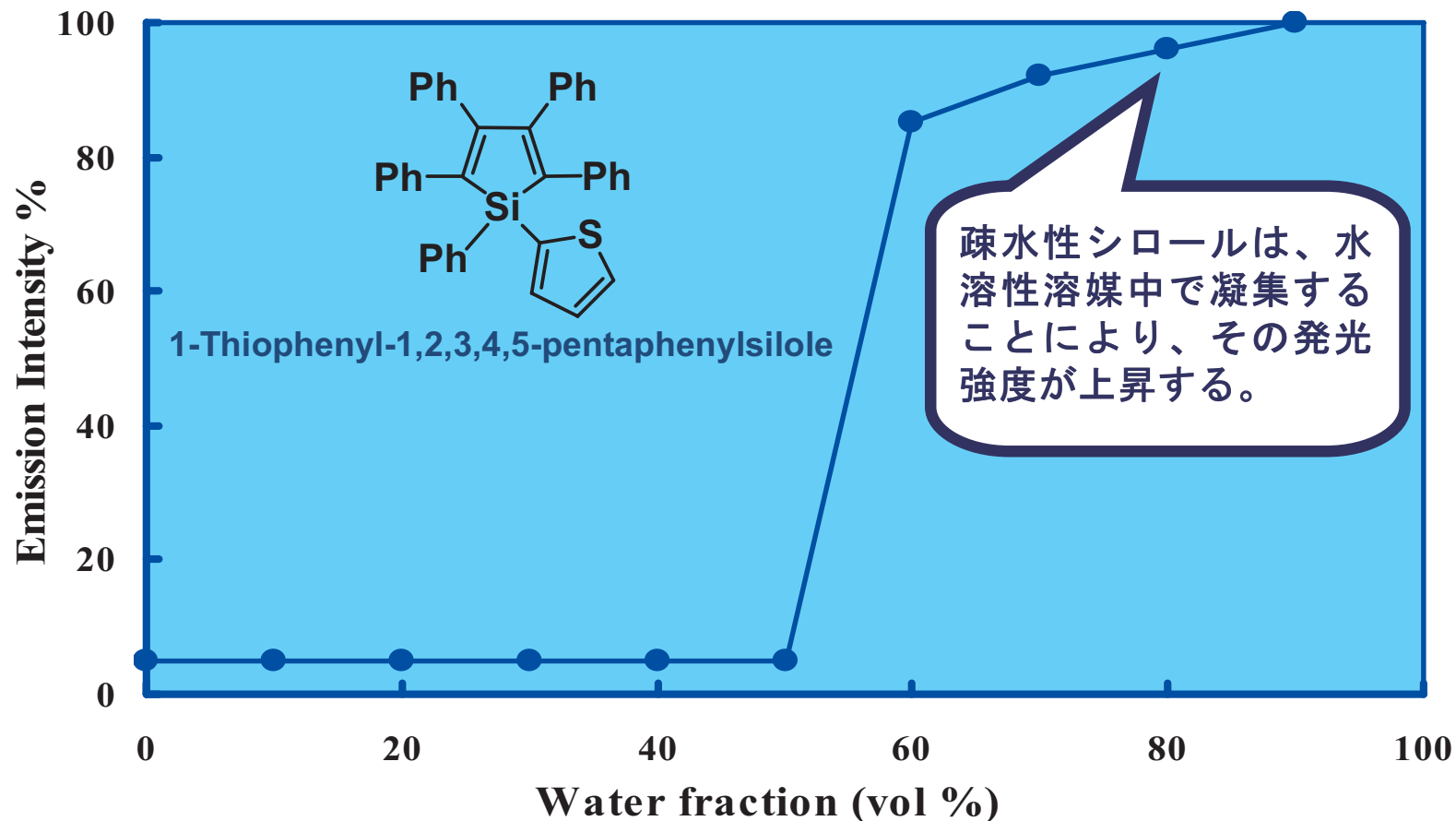
(色調、強度の変化)



この研究の鍵！

シロール基のAIE特性

Aggregate-induced Emission¹⁾

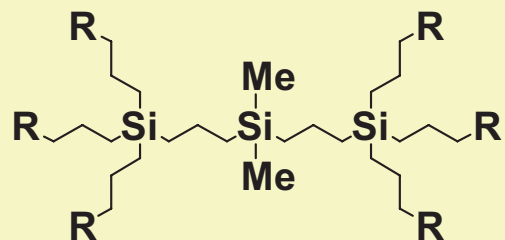


疎水性シロールは、水溶性溶媒中で凝集することにより、その発光強度が上昇する。

Solv.: Water/Acetone mixture; Concentration: 10^{-6} M; Ex: 360 nm

1) B. Z. Tang *et al.*, *Chem. Commun.*, **2001**, 1740.

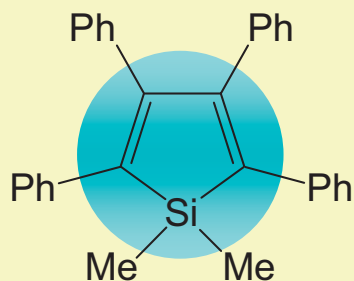
糖鎖クラスター効果とAIE効果のハイブリッド化



Dumbbell(1)6

病原体接着能大

+

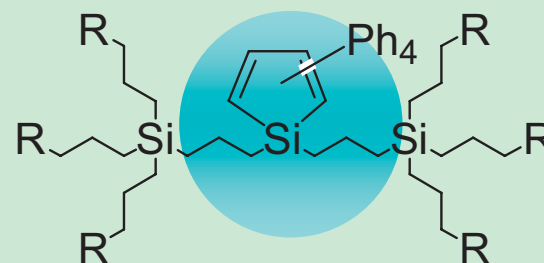


2,3,4,5-Tetraphenylsiloles

AIE特性

PL ~ 470nm (Ex. 360nm)

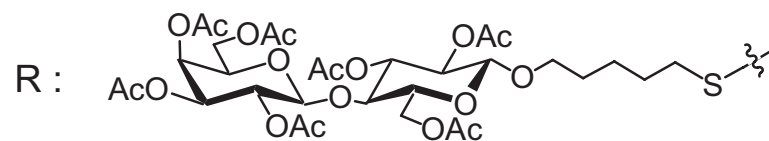
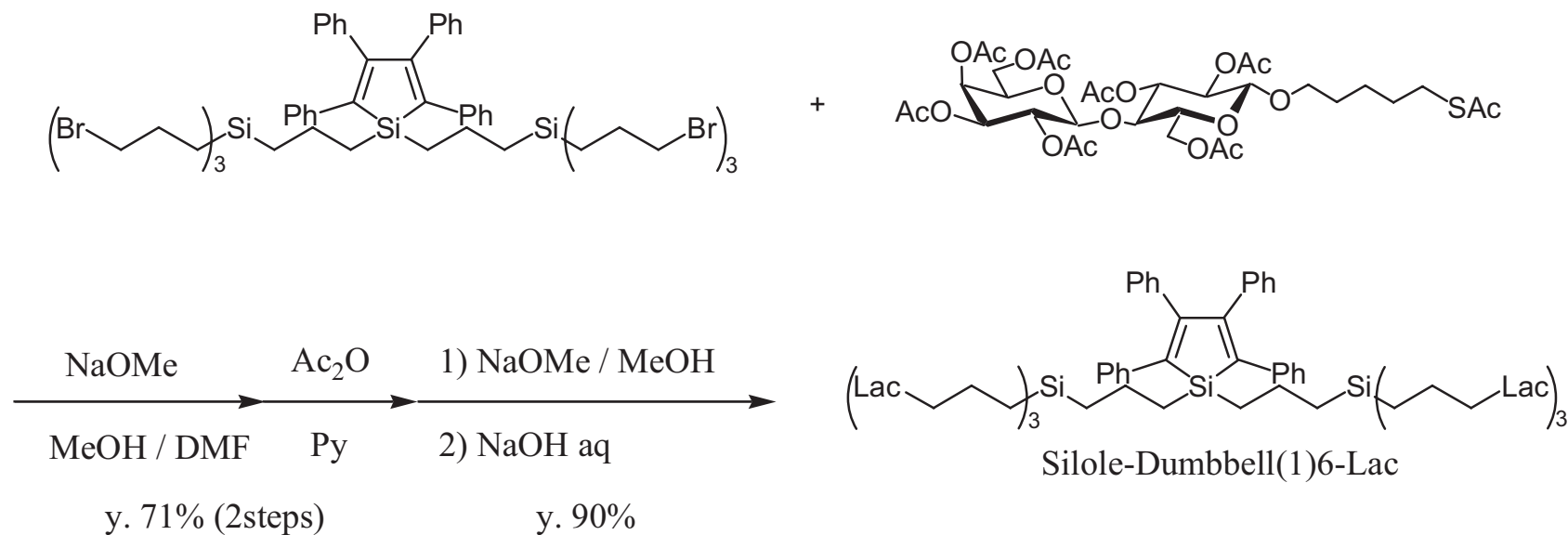
hybrid



病原体を特異的に
認識する蛍光分子

検査薬と成り得るのか？

ラクトースの導入反応¹⁾



1) K. Hatano *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **2007**.

Silole-Dumbbell(1)6-Lacの水中でのPL

- Silole-Dumbbell(1)6-Lac 1mM水溶液

量子収率：
 $\Phi_{FL} = 92\%$

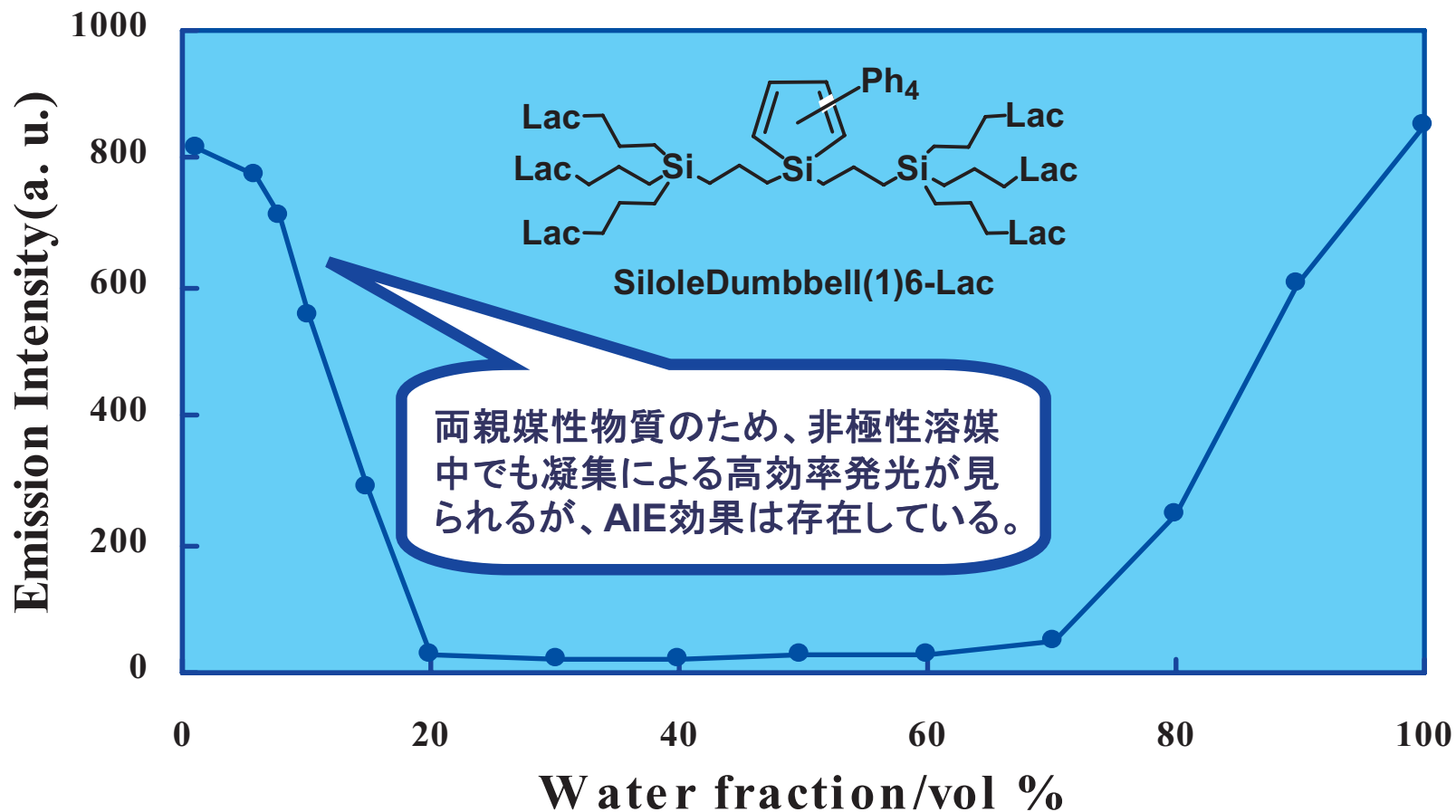


照射前



365nm照射

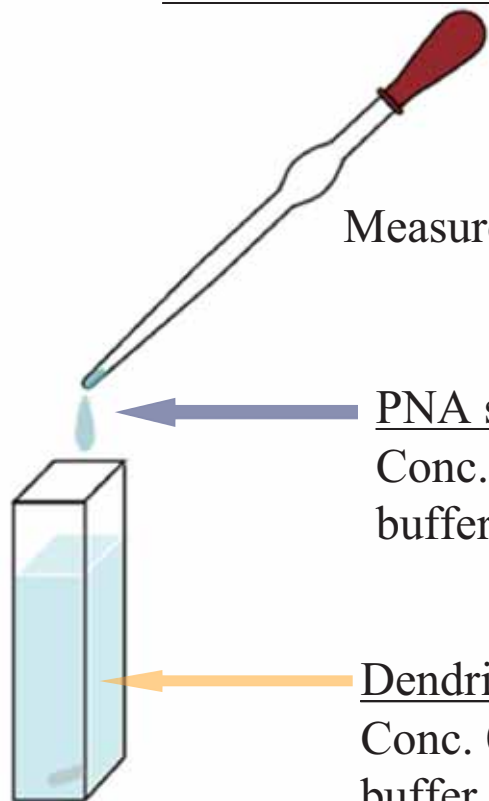
シロール dendリマーのAIE特性



Solv.: Water/Acetone mixture; Concentration: 10^{-6} M; Ex: 360 nm

レクチン結合活性 -測定法-

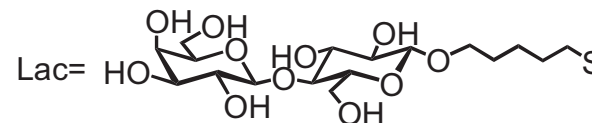
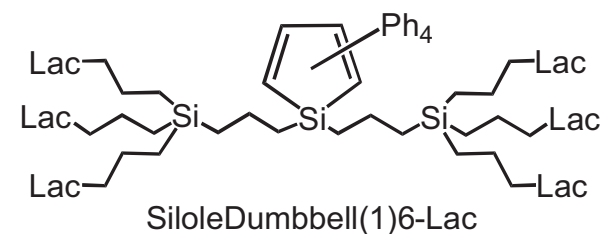
PL spectrum measurement of Silole-Dendrimers



Measured at 5 °C

PNA solution
Conc. 20.0 μM in HEPES
buffer (pH = 7.4)

Dendrimer solution : 3 ml
Conc. 0.6 μM in HEPES
buffer (pH = 7.4)



peanut agglutinin (PNA)
: a Lac binding lectin

Silole-Dumbbell(1)6-LacによるPNA検出：PL強度変化

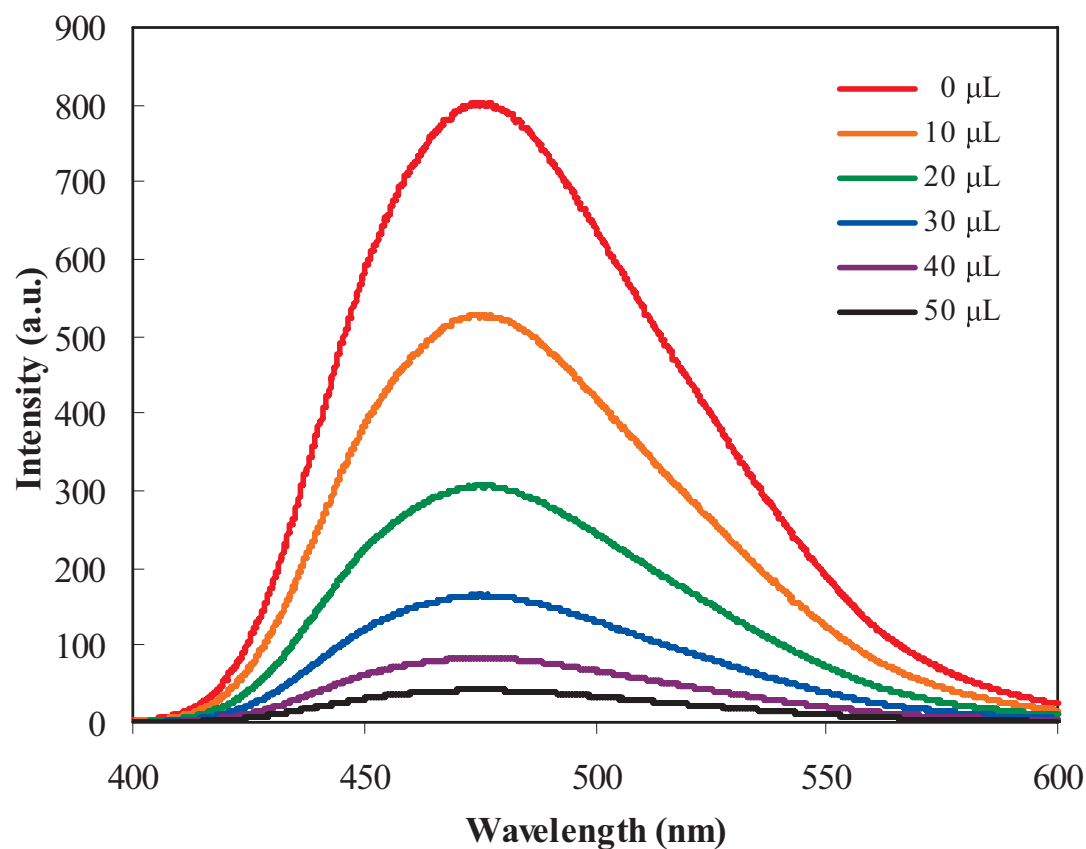


Figure PL spectra of Silole-Dumbbell(1)6-Lac in the presence of different amounts of PNA (from 0 to 50 μL). Concentration: 0.6 μM in HEPES buffer (5 mM, pH = 7.4). Excitation: 360 nm.

相対発光強度変化および発光強度差の比較

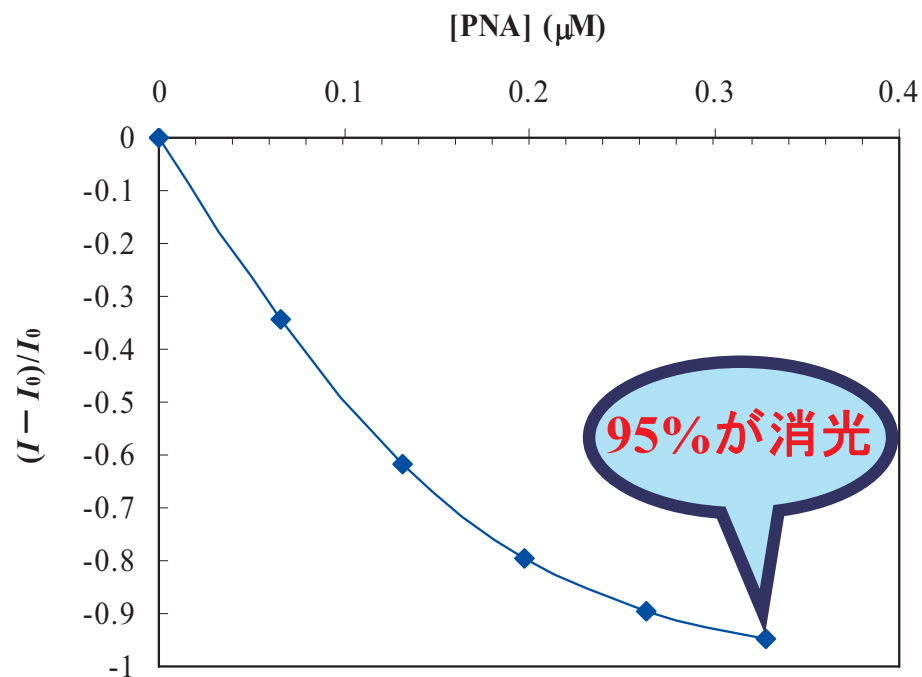


Figure Plots of relative fluorescence intensity $[(I - I_0)/I_0]$ of solution of Silole-Dumbbell(1)6-Lac at 474 nm vs concentration of PNA.

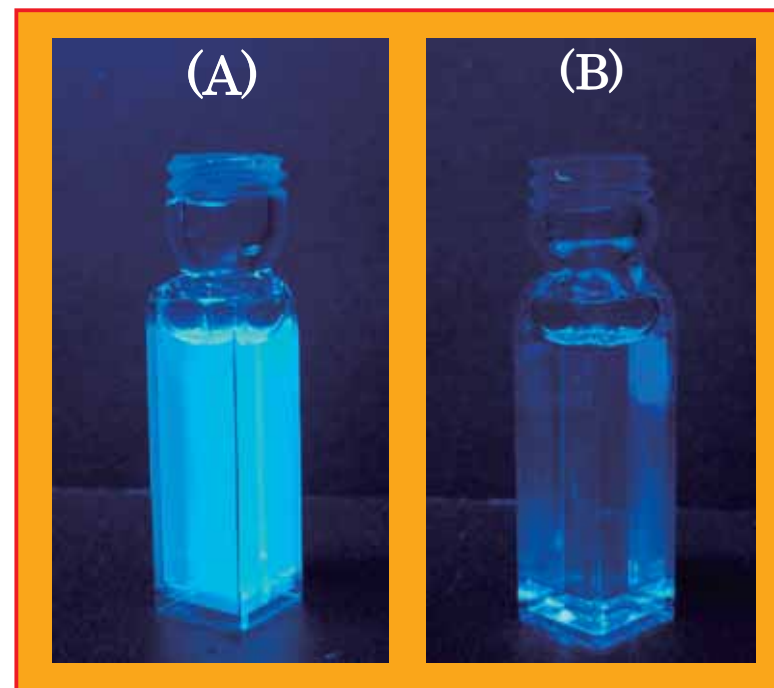


Figure Pictures of photoluminescence of the HEPES buffer solution of Silole-Dumbbell(1)6-Lac in the (A) absence and (B) presence of PNA. Excitation: 360 nm.



AIE効果を利用した検出薬の特徴

■ 利点

- 単純な方法で短時間で検査結果が分かる
- 特殊機器が不要（ハンディUVランプのみ）
- 糖鎖の置換より別のウイルス・毒素に対応可
- 治療薬、予防薬に比べ少量でよい
（>170回／1mg）
- 毒性、水に対する溶解度を気にしなくて良い

従来検査方法と本方法の比較

検査方法	必要機器 (価格)	検査の 簡便さ	検査所 要時間	検出対象	検査費用	検出感度
PCR法	× PCR装置 (300万円程)	× 熟練が必要	△ 数時間	◎ 多数	× 数千円	○ 10 ² ~10 ³ 個/mL
イムノクロ マト法	◎ 不要	◎ 誰でも可	◎ 30分	× 制限あり	× 数千円	△ 10 ⁵ ~10 ⁷ 個/mL
培養法	× 培養装置 (500万円程)	× 熟練が必要	× 数日以上	◎ 多数	◎ 数百円	○ 10 ³ 個/mL
本方法	○ 紫外線ランプ (1万円程)	◎ 誰でも可	◎ 20分	○ 50以上	◎ 数百円 (予想)	? (未定)

想定される用途および業界

- 用途: ウイルスや毒素などの検出薬もしくはキット

- 可能な検査対象(糖鎖との関連あるもの)

インフルエンザ(A,B,C型)、コロナウイルス、エイズウイルス、ヘルペスウイルス、ニューカッスル病ウイルス・・・

コレラ菌、淋菌、ボツリヌス菌、マイコプラズマ肺炎菌、ネズミチフス菌、ブドウ状球菌、肺炎双球菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、腸炎ビブリオ・・・

- 業界: 医療機器関連、医薬品

- 検査を必要とする業界

食品、外食、旅行・ホテル、農林・水産、運輸、航空関連業界など



本方法の課題と企業への期待

- 実用化に向けた課題
 - ・ 検出に適したデンドリマー構造の探索
 - ・ 実際のウイルス・毒素を用いた検出感度の見積もり
- 企業への期待（共同研究を希望）
 - ・ ウイルス・毒素を用いた検出試験の実施
 - ・ 本研究の原理を利用したより使い易い形の検出キットの考案と事業化
 - ・ 生理活性糖鎖の提供



本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ウイルス,微生物類の検出方法
- 出願番号 : 特願2008-283976
- 出願人 : 国立大学法人埼玉大学
- 発明者 : 幡野 健, 松岡浩司, 照沼大陽

-
- 発明の名称 : 蛍光性アミラーゼ基質及び該基質を用いたアミラーゼ活性測定方法
 - 出願番号 : 特願2008-242083
 - 出願人 : 埼玉大学、福島県警察
 - 発明者 : 岡博之, 松岡浩司, 照沼大陽, 幡野健

1. α -アミラーゼとは

一般的にはデンプン(マルトオリゴ糖の α 1,4結合)を加水分解する酵素として知られており、工業的に広く用いられている。

法医鑑定上は、だ液、大便、腔分泌液の証明のための指標の一つとして使用されている。

医療分野では、血液検査の項目として膵臓疾患などのマーカーとして用いられている。



<http://www.rcsb.org/pdb/>
より引用

3. 研究の目的

アミラーゼ検査の検出感度の向上及び特異性の向上を目的とした、新規アミラーゼ基質の化学合成及びその評価をおこなうこととした。

すなわち、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した、アミラーゼ活性の新規測定法を確立する。

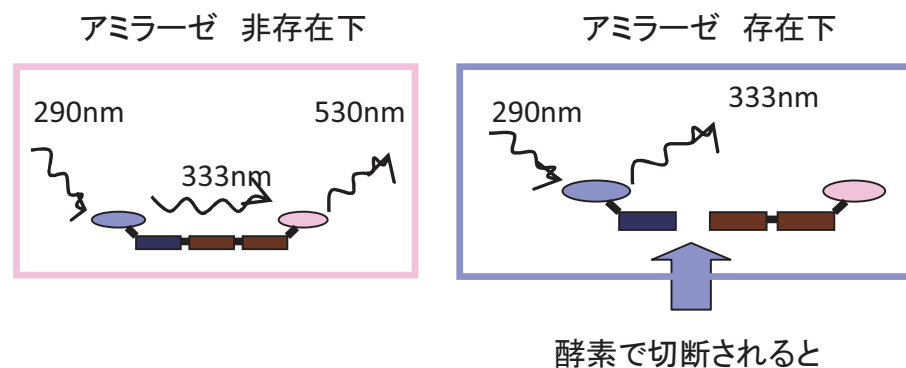
2. アミラーゼの検査薬

方法(商品名)	特徴
ブルースターチ法 (ファデバス)	デンプンに青色色素が練り込んであり、分解すると呈色
ヨードデンプン法 (アミラーゼテストワコー)	デンプン分解後、ヨウ素を添加し、分解の程度により呈色
酵素法 (ダイヤカラーAMY-Lダイレク)	Gal-Glu-Glu-CNPを基質とし、分解するとCNPが遊離し呈色
蛍光 (EnzChek amylase assay)	デンプンに蛍光色素が練り込んであり、分解すると呈色
蛍光(CD-蛍光色素) 東工大 上野ら	CDに蛍光色素が包接しており、アミラーゼによりCD環が切断され蛍光強度が変
蛍光(マルトオリゴ糖-蛍光色素) 北大 西村ら	マルトオリゴ糖に蛍光色素が結合しており、アミラーゼにより糖鎖が切断されFRETが変化

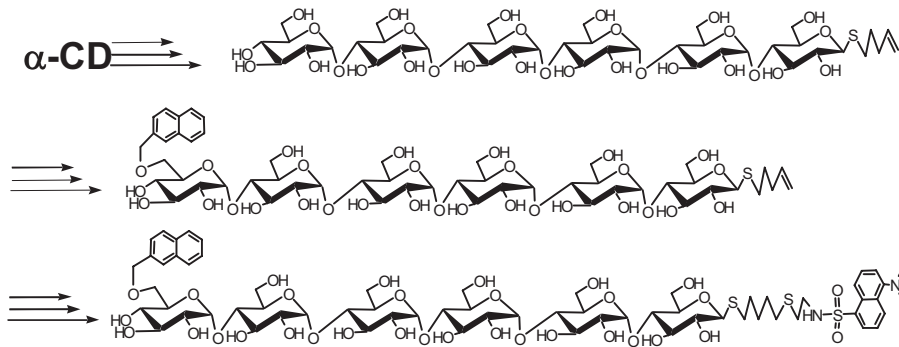
問題点: 操作の煩雑さ、バックグラウンドの高さ、(法医学的な)検出感度、反応特異性

4. 蛍光共鳴エネルギー移動のイメージ

蛍光共鳴エネルギー移動は、エネルギーの転移を利用したアッセイ法のひとつで、非常に高感度であるという特色を持っている。近年、この反応は核酸、タンパク質等の研究に広く利用されてきている。本研究においてもこの方法を用いることとする。

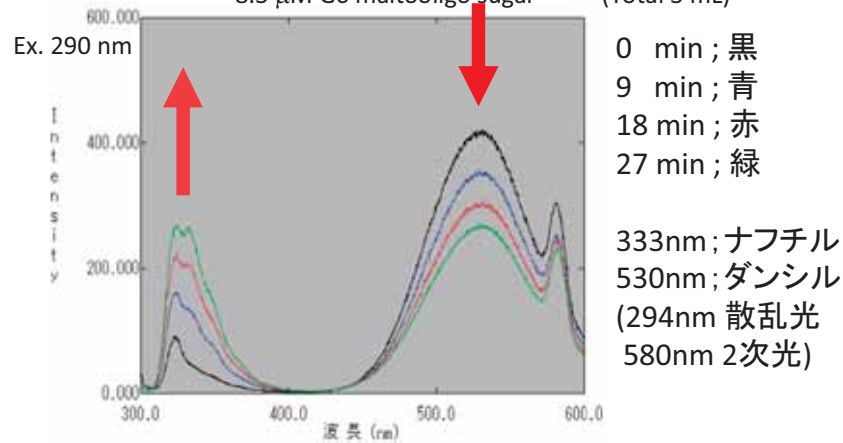


5. 蛍光性アミラーゼ基質の化学合成



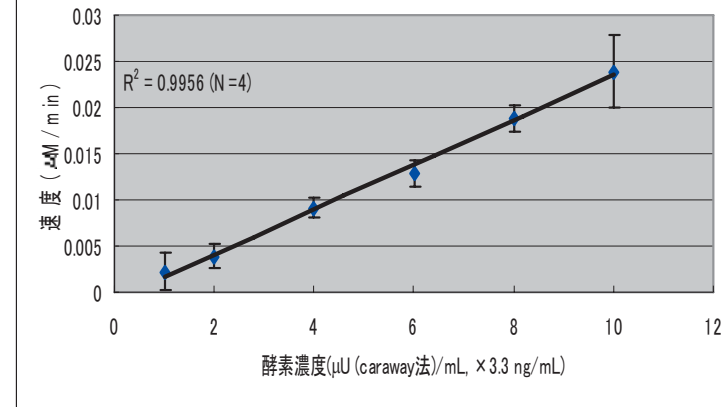
6. アミラーゼによる蛍光強度変化

酵素反応条件 ; 10 mM HEPES-NaOH, 50 mM NaCl
 10 mM CaCl_2 , 0.01 % NaN_3 (pH 7.2)
 S-Amylase 0.03 U / vial (caraway method), 37 °C
 8.3 μM G6 maltooligo sugar (Total 3 mL)



ダンシルの蛍光が減少して、ナフチルの蛍光が増加している。
 → 糖鎖が切断されてFRET効率が低下している。

7. 反応速度の酵素濃度依存性



酵素濃度(酵素活性)と速度の間には一次相関が認められた

↓
 蛍光強度の変化より、酵素活性の定量が可能

8. 結論

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用するための、蛍光性マルトオリゴ糖誘導体の合成方法を確立した。

合成した基質を用いてアミラーゼ活性の検査を行ったところ、酵素濃度と非常に良い相関が得られた。

(アミラーゼの定性的、定量的評価が可能である。)



お問い合わせ

地域オープンイノベーションセンター
シニアコーディネーター 角田 敦

Tel : 048-858-9106

Fax: 048-858-9120

E-mail: tiiki@ml.saitama-u.ac.jp