

糖鎖を認識ツールに用いた生物毒素の高感度検出技術

鵜沢 浩隆

Highly Sensitive Detection Technology for Biological Toxins Applying Sugar Epitopes

Hirotaka UZAWA

Research Center of Advanced Bionics, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba 305-8565, Japan

(Received August 15, 2008)

The Shiga toxin is a highly poisonous protein produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. This bacterial toxin causes the hemolytic uremic syndrome. Another plant toxin from castor beans, ricin, is also highly toxic. The toxin was used for assassination in London. Recently, there were several cases of postal matter containing ricin. Both toxins are categorized as biological warfare agents by the Centers of Disease Control and Prevention. Conventional detection methods based on the antigen-antibody reaction, PCR and other cell-free assays have been proposed. However, those approaches have drawbacks in terms of sensitivity, analytical time, or stability of the detection reagents. Therefore, development of a facile and sensitive detection method is essential. Here we describe new detection methods applying carbohydrate epitopes as the toxin ligands, which is based on the fact that the toxins bind cell-surface oligosaccharides. Namely, the Shiga toxin has an affinity for globobiosyl (Gb₂) disaccharide, and ricin binds the β-D-galactose residue. For Shiga toxin detection, surface plasmon resonance (SPR) was applied. A polyanionic Gb₂-glycopolymer was designed for this purpose, and it was used for the assembly of Gb₂-chips using alternating layer-by-layer technology. The method allowed us to detect the toxin at a low concentration of LD₅₀. A synthetic carbohydrate ligand for ricin was designed and immobilized on the chips. SPR analysis with the chips allows us to detect ricin in a highly sensitive and facile manner (10 pg/ml, 5 min). Our present approaches provide a highly effective way to counter bioterrorism.

Key words—Shiga toxin; ricin; detection; sensor; surface plasmon resonance (SPR); globobiosyl (Gb₂) disaccharide

1. はじめに

糖鎖は、核酸、タンパク質に続く第3の生命鎖として知られ、様々な生命現象に深く関わっている。グリコーゲンは、グルコースが多数連なったポリマー（高分子）で肝臓に蓄えられているが、これは生体のエネルギー源として利用される。しかし、近年、糖鎖が特に注目されているのは、単なるエネルギー源としてではなく、生体の情報を司る分子として機能しているためである。例えば、ABO式の血液型には、A型、B型、O型、AB型の4種類の型がある。これらの違いは、赤血球表面に存在するたった1つの糖構造の違いに基づいている。

さらに糖鎖は、細胞間のコミュニケーションや分

化、免疫、受精、血液凝固、がん転移、病原性ウイルス、細菌、毒素の感染にも関与している。¹⁾ それゆえ、糖鎖をベースにした医薬品開発、糖鎖マテリアル、機能性食品などの研究が活発に行われている。^{2,3)} 本稿では、このような様々な糖鎖の機能のうち、毒素が生体の特定の糖鎖に結合する事実に着目し、高感度で迅速に毒素を検出する検知チップやバイオセンサー技術について、われわれの研究を中心に紹介する。⁴⁻⁶⁾ 対象とした毒素は、いずれも、米国疾病対策センター（Centers of Disease Control and Prevention; CDC）で生物化学兵器や生物化学剤にカテゴライズされている毒素で、食中毒としても知られている病原性大腸菌 O157 のペロ毒素、及び、過去に暗殺やテロに使用されたことのあるリシンである。

2. 糖鎖を用いた新しいペロ毒素検知技術の開発

2-1. 現行のペロ毒素判定法とその課題 腸管出血性大腸菌 O157 は、致死性の高いペロ毒素を産

産業技術総合研究所バイオニクス研究センター（〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 つくば中央第5）
e-mail: h.uzawa@aist.go.jp

本総説は、日本薬学会第128年会シンポジウム S10 で発表したものを中心に記述したものである。

出し、食中毒の原因細菌として知られている。⁷⁾ この食中毒は平成8年にわが国で大流行し、⁸⁾ その後も発症数は減少したものの、依然として毎年死者が出続けている。ベロ毒素は、 β -グリカナーゼ活性を有しており、しばしば腎臓細胞を壊死させ尿毒症を発症させる。また、汚染食品の摂取から発症までの潜伏期間が長く、検査に要する時間も数日を要することなどから、他の食中毒に比べて原因の特定に時間が掛かり、最終的に治療が開始されるのは原因食品を摂取後7-8日とされる。また、抜本的な治療法は確立していないため、対症療法で対応しているのが現状である。このような理由から、ベロ毒素による中毒は、他の食中毒と異なり致死性が高い。

現行のベロ毒素の判定法としては、抗原抗体反応を利用した免疫化学法、特定の遺伝子を増幅して毒素の有無を推定するPCR法、ベロ細胞やHeLa細胞を用いたバイオアッセイ法などが知られている。⁹⁻¹²⁾ しかし、現行の判定法には一長一短がある。保健所などで広く使用されている免疫化学法は、次の理由からときに擬陽性を示すことがある。ベロ毒素は、細菌性の毒素に特徴的な A_1B_5 と呼ばれるタンパク質の集合体である。¹³⁻¹⁶⁾ つまり、1つのA-サブユニットとこれをドーナツ状に取り囲んだ5つの同一のB-サブユニットから構成される(Fig. 1)。A-サブユニットは先述した β -グリカナーゼ活性を有しており、毒の「本体」である。一方、B-サブユニットは、後述するように、腎臓細胞に存在するグロボ系糖脂質(Gb_3 セラミド)に特異的に結合する。個々のサブユニットでは、毒性を示さないが、 A_1B_5 の集合体構造を取ると毒性を発現する(Fig. 1)。免疫化学法では、個々のタンパク質(抗原)に対する抗体を用いているために、無毒の各サブユニットに対して反応してしまうといった問題がある。分析時間は、数時間-数日程度である。また、抗体は低温での保存が必要で、保証有効期限も短い。

PCR法は、検体の大腸菌の遺伝子、特に、毒素を発現する部位の遺伝子を増幅して判定する方法であるが、コンタミの問題があり、判定には専門的な知識と経験を必要とする。また、毒素そのものを判定しているのではなく、あくまで、毒素の存在を推定するに過ぎない。遺伝子の増幅に数時間程度を必要とする。バイオアッセイ法は、大学などの機関で

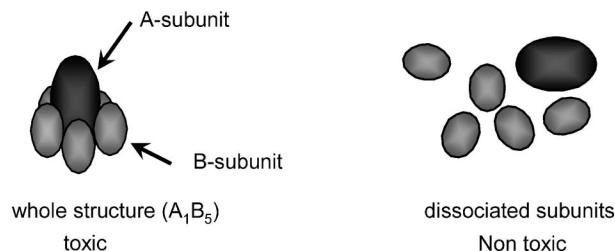


Fig. 1. The Whole Structure (A_1B_5) and Dissociated Subunits of Shiga Toxins

The Shiga toxin composed of a monomeric A-subunit and pentameric B-subunits. The A_1B_5 structure is toxic while each subunit is non toxic.

使用されている、信頼性の高い方法である。ベロ細胞やHeLa細胞が用いられるが、HeLa細胞の感受性はベロ細胞に比べて落ちるため、ベロ細胞がよく用いられる。判定に数日掛かり、また、生細胞をカウントするために多大な労力を要する。

このように現行の判定法は、信頼性、判定のし易さ、感度、保証有効期限などの点で問題が残されている。そこで、われわれは、岐阜薬科大学 森裕志教授、千葉大学 西田芳弘教授と共同で、簡便で迅速なベロ毒素検出法の開発を試みた。本法は、毒素が腎臓細胞のグロボ系糖脂質に結合する事実を応用しているので、真に毒性を発現するベロ毒素の集合体(A_1B_5 構造)のみを検出できるメリットを有しており、より正確な判定を下せる。また、糖鎖は抗体に比べると安定で、室温下での取り扱いが可能である。以下に、本法について述べる。

2-2. ベロ毒素の検知原理と糖鎖設計 ベロ毒素の感染機構をFig. 2に示す。これまでに述べたように、ベロ毒素は、 A_1B_5 の集合体構造を取っている。この集合体の5つのB-サブユニット(B_5)が、生体膜表面のラフトと呼ばれる Gb_3 セラミドが高密度に集合した部分に特異的に結合する[Fig. 2(A)]。次に、中央のA-サブユニットが細胞膜を貫通し[Fig. 2(B)]、細胞内に侵入する[Fig. 2(C)]。A-サブユニットは β -グリカナーゼ活性を有しているので、タンパク質の生合成が阻害され中毒症状を示す。本検出法では、このような毒素の感染機構、すなわち、「 A_1B_5 の集合体が細胞表面の糖鎖に結合する事実」を検知原理に用いた。

ベロ毒素の天然リガンドである Gb_3 セラミドの構造をFig. 3に示す。2本鎖セラミドにガラクトース(Gal)、グルコース(Glc)からなる3糖が結合

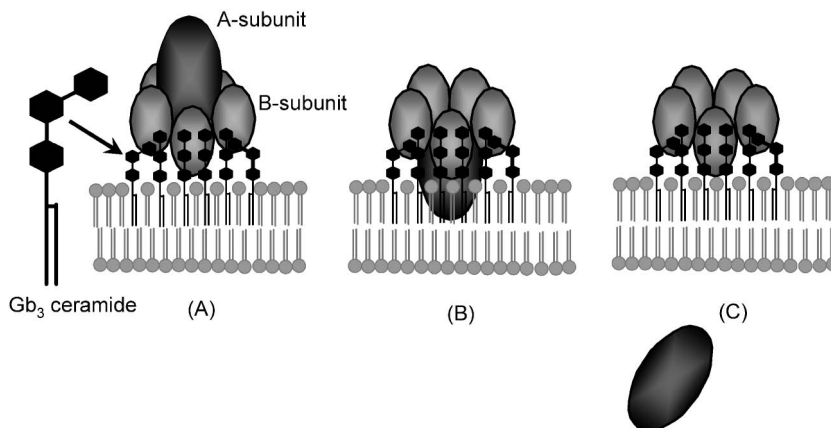


Fig. 2. Infectious Process of Shiga Toxin

(A) Pentameric B-subunits of the toxin bind cell-surface Gb₃ ceramides. (B) A-subunit makes an opening in the cells. (C) A-subunit internalizes into the cells.

している。非還元末端側には、2つのガラクトースが「 α (1 \rightarrow 4) 結合」という特別な様式で結合したグロビオース (Gb₂) と呼ばれる2糖が存在する。この Gb₂ 糖鎖がグルコースの4位に結合して3糖 (Gb₃) を構成する。このような特徴的な糖鎖は、主に、腎臓細胞に存在する。末端の Gb₂ 糖鎖は、ペロ毒素が結合する最小単位のリガンドと考えられている。そこで、われわれは、合成がより容易で取り扱い易い人工の Gb₂ 糖鎖を毒素検知用のリガンドに選択した (Fig. 3)。

Gb₂ 糖鎖は化学的に合成可能であり、これを金電極、あるいは、センサーチップ上に固定化する。毒素は、チップ上の糖鎖に結合するので、この結合量を電気化学的なデバイスや光学的なデバイスによって検出すれば、毒素の有無が分かる。われわれは、検出デバイスに古くから知られている水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法¹⁷⁾と、近年、開発された表面プラズモン共鳴 (SPR) 法^{18,19)}を選択した。QCM 法は、金電極に物質が結合すると周波数が減少することを利用し、この変化量から毒素量を求める方法である。SPR 法は、センサーチップ上に物質が結合すると誘電率等の光学的特性が変化することを利用した計測法である。ここでは、はじめに、QCM 法による毒素検知技術について述べる。

2-3. ペロ毒素検出のための Gb₂ 糖鎖の合成

Figure 4 に、QCM 法による毒素検出用の Gb₂ 糖鎖の合成法を示す。⁴⁾ Gb₂ 糖鎖の配糖体 (アグリコン) 部位には、疎水性の長鎖アルキル鎖を導入した。この毒素検出用リガンド分子、すなわち、Gb₂

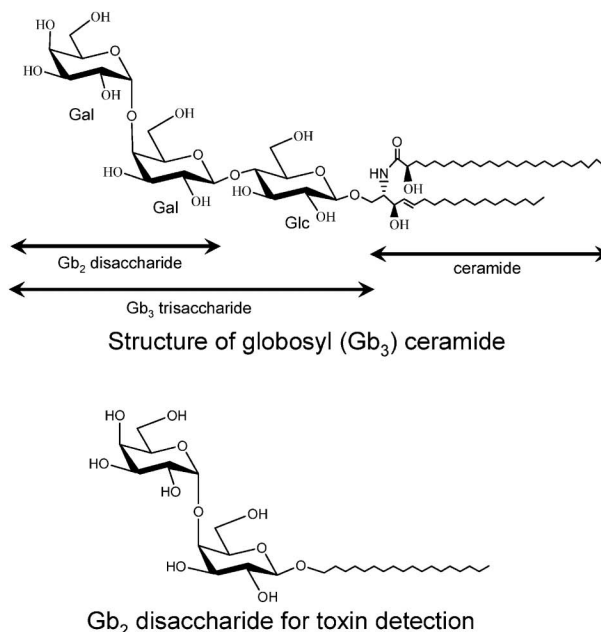


Fig. 3. Structures of Globosyl Ceramide (top) and Artificial Gb₂ Disaccharide (bottom)

糖鎖は、あらかじめ疎水処理した金電極に、気水界面単分子 (LB) 膜法によって固定化されるように設計されている。アセチル基で保護したガラクトース誘導体 **2** に炭素数 18 の飽和アルキル鎖を導入し化合物 **3** とした。脱保護、保護を繰り返して、4位が遊離の化合物 **8** に変換した。化合物 **8** と第2のガラクトースである化合物 **9** とをグリコシル化して、 α (1 \rightarrow 4) 結合を有する Gb₂ 誘導体 **10** を合成した。脱保護して目的とする Gb₂ 誘導体 **12** を得た。この2糖を気水界面上に展開し単分子膜とし、これを、

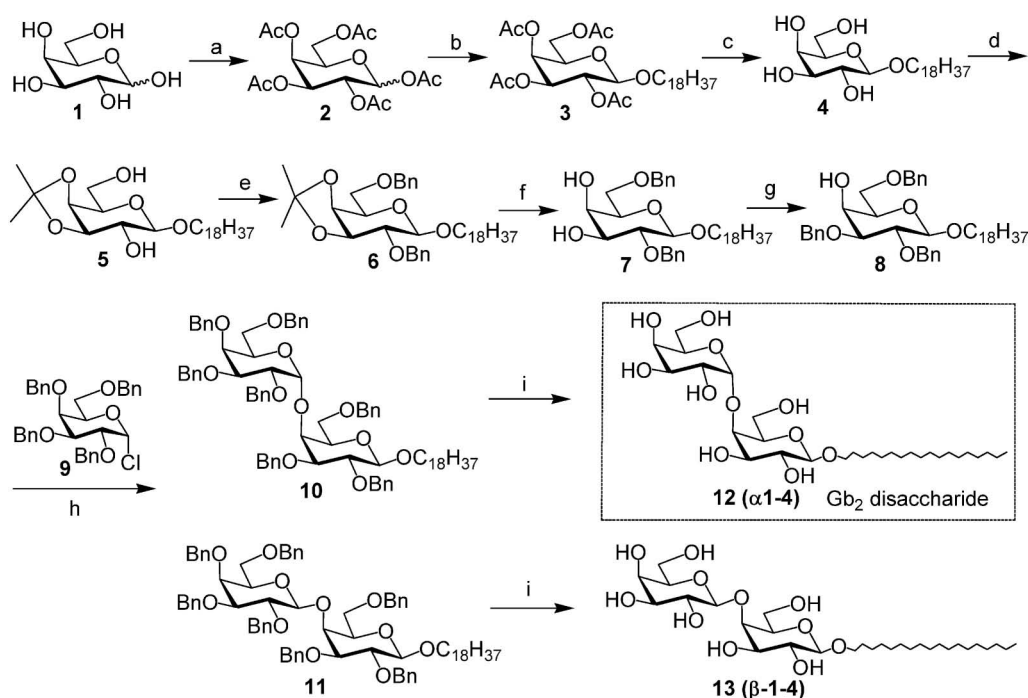


Fig. 4. Synthesis of Gb₂ Disaccharide

a: Ac₂O, pyridine, DMAP, quant. b: octadecanol, TMSOTf, MS4A in toluene, 34%. c: NaOMe, MeOH, quant. d: acetone-THF (10 : 1, v/v), CSA, 70%. e: BnBr, NaH, 96%. f: CSA, CH₂Cl₂-MeOH (1 : 5, v/v), 92%. g: Bu₂SnO, BnBr, Bu₄NBr, quant. h: 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl chloride **9**, AgOTf, MS4A, Et₂O, 0°C, **10** (α , 46%), **11** (β , 11%). i: H₂, Pd, MeOH, AcOEt, 50–60°C, 82–90%.

あらかじめ、ドデカンチオールで処理した金電極に、垂直浸漬法により1回累積して、Gb₂糖鎖を固定化した。

2-4. QCM 法によるペロ毒素の検出⁴⁾ このようにして作製した Gb₂糖鎖被覆電極を 9 MHz の水晶振動子装置に装着し、緩衝液中、最終濃度が 2 nM になるようにペロ毒素 (ペロ毒素 I 型^{6,20–22)} を加えた。その結果を Fig. 5 (A) に示す。毒素を加えた直後から周波数が減少し、約 45 分後には平衡に達し 75 Hz の周波数減少が観測された。これは、Sauerbrey 式²³⁾により約 37.5 ng の毒素が電極に結合したことを意味する。ここで用いたペロ毒素 I 型の試料はクルードであり、毒素の純度としては 2.6 % 程度である。すなわち、夾雑タンパク質を 97.4 % 含む試料を用いているが、本法は選択的に毒素のみを検出した。これは、患者由来の検体試料や汚物、汚染試料などを分析する上で、夾雑物質による影響は受け難く、微量の毒素を検出できることを示唆するものである。

次に、これらの結合が特異的なものか、単なる物理吸着によるものなのかを明らかにするために、阻害実験を行った。阻害剤には、Gb₂糖鎖を側鎖に持

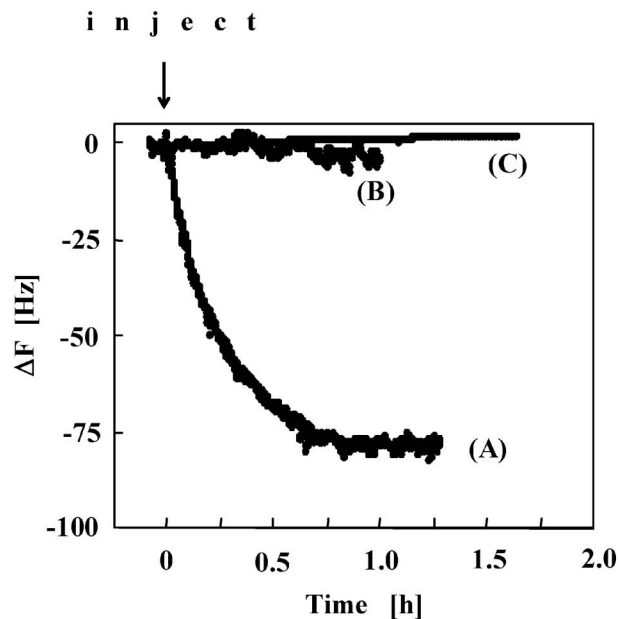


Fig. 5. Typical Time Courses of Frequency Changes (ΔF) of a QCM on the Monolayer of Globobioside **12** and Inhibition Assay of Stx-1 in the Presence of Acrylamide Gb₂ Copolymer as an Inhibitor

(A): Stx-1 (2.0 nM); (B) Stx-1 (2.0 nM) + Gb₂ copolymer (ca. 10 times molar equiv of Gb₂ unit), (C): toxin-free protein extracts (0 nM of Stx-1) as a negative control. The measurements were carried out in a phosphate buffer solution (0.01 M, pH 7.2, 20 ml) containing 0.15 M saline at 25°C.

つアクリルアミド型ポリマーを用いた [平均分子量 (Mn): 2.5×10^5 , Gb₂: acrylamide = 1 : 10].²⁴⁾ ペロ毒素は A₁B₅ の集合体を取っており, 1つの B-サブユニットに少なくとも2カ所の糖鎖結合部位を持っているとされているので, 約10倍過剰にポリマーを加えたところ, Gb₂ 糖鎖被覆電極への毒素の結合は, ほぼ完全に阻害された [Fig. 5(B)]. また, コントロールとして, 毒素を含まない粗抽出液を用い, QCM を測定したところ, 周波数の変化はみられなかった [Fig. 5(C)]. したがって, 本法による毒素検出は糖鎖を認識した特異的なものであることが証明された.

2-5. 交互積層法を利用した新しいペロ毒素検出チップの開発^{5,6)} 近年, 糖鎖とタンパク質の相互作用を解析するために, 糖鎖マイクロチップやマイクロアレイ, 糖鎖ナノ材料に関する研究が盛んに行われている. Kiessling ら, Wang ら, 及び Fukui らは, それぞれ独立に, ほぼ同じ時期に, 糖鎖マイクロアレイについて報告した.²⁵⁻²⁷⁾ その後, 基板表面に糖鎖を固定化する新しいアプローチが続々と報告されている. 例えば, Diels-Alder 反応を利用したグリコシルジエンの固定化,²⁸⁾ 1,3-dipolar cycloaddition による糖アジドの固定化,²⁹⁾ Staudinger reaction³⁰⁾ や糖マレイミドの Michael addition³¹⁾ による固定化などがある. また, 金微粒子に糖鎖を固定化した先駆的な研究もある.^{32,33)} このような研究は, 糖鎖のクラスター, あるいは, マルチバレント効果を期待したもので,³⁴⁾ 「タンパク質-糖鎖相互作用」, あるいは, 「糖鎖-糖鎖相互作用」の解明に有用である. われわれは, より高感度で実用的な毒素検出のために, 交互積層法を利用した新しい糖鎖チップの作製法を開発したので紹介する.^{5,6)}

交互積層法は, 正電荷と負電荷を有する分子が静電的な相互作用によって交互に結合する手法で,^{35,36)} 化学フィルター, 分子インプリンティング, 高分子分離膜などの分野に応用されている.^{37,38)} ここでは, 交互積層法を効果的に活用するために, ポリアニオン性ポリマーとポリカチオン性ポリマーによる固定化法を例に紹介する.

Figure 6 に, 基板, アニオン性自己集積化単分子膜, ポリカチオン性ポリマー, 及び, ポリアニオン性糖鎖ポリマーから構成される交互積層法を概念を示す. 基板 (チップ) の最下層にある負電荷の自己

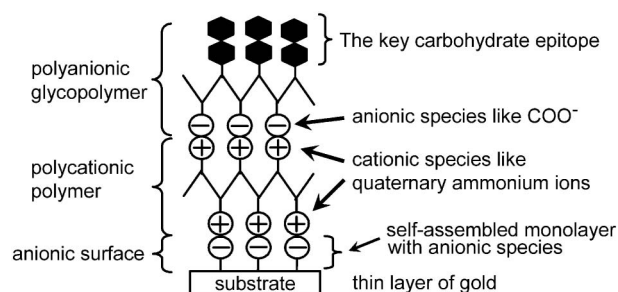


Fig. 6. Schematic Figure of Alternating Layer-by-layer Membranes onto the Substrate Surface.

集積化膜に, 例えば, 4級アンモニウム塩などの正電荷を側鎖に有するポリカチオン性ポリマーを静電的に固定化する. ポリマーを用いたのは, 側鎖の正電荷が基板上的負電荷に「多点」で結合するため, より安定で強固なチップができるためである. 正電荷を帯びた第2層目に, カルボン酸のような負電荷と認識部位としての糖鎖を側鎖に合わせ持つポリアニオン性糖鎖ポリマーを静電的に固定化して, 最外層に糖鎖が表れたチップを構築する. このようなアイデアを実現するために, 具体的には, 次のようなポリアニオン性糖鎖ポリマーを設計・合成した.

2-6. ポリアニオン性糖鎖ポリマーの合成 正電荷表面と多点で結合するための負電荷のカルボン酸と, 毒素結合部位としての Gb₂ 糖鎖が, できる限り交互に配置したポリマーが理想的である. そこでわれわれは, 側鎖に酸無水物を有する反応性ポリマー, poly(ethylene-*alt*-maleic anhydride) (Mw = 100000-500000) を用いた. この酸無水物に Gb₂ 糖鎖 (Fig. 7 の化合物 18) を反応させると, Gb₂ 糖鎖がポリマーに導入されるのと同時に, 遊離のカルボン酸が生成する. 理論的には, 1モルの糖鎖が反応すると1モルのカルボン酸が生成するので, 両者はほぼ1対1に交互に配置される. また, Gb₂ 糖鎖の還元末端側の配糖体には, 炭素数10のアルキル鎖を導入した. これは, ペロ毒素が糖鎖のみならず, 配糖体部位の疎水性基に対しても親和性を持っていることと, この疎水性基の横方向の配列によって, チップ内部への水の浸入をブロックすることが期待されるためである. 本法は, 静電的な相互作用で糖鎖リガンドを固定化しているため, 水中, あるいは, 緩衝液中でチップを使用すると, 固定化した糖鎖ポリマーが剥離する可能性もあるが, この疎水的

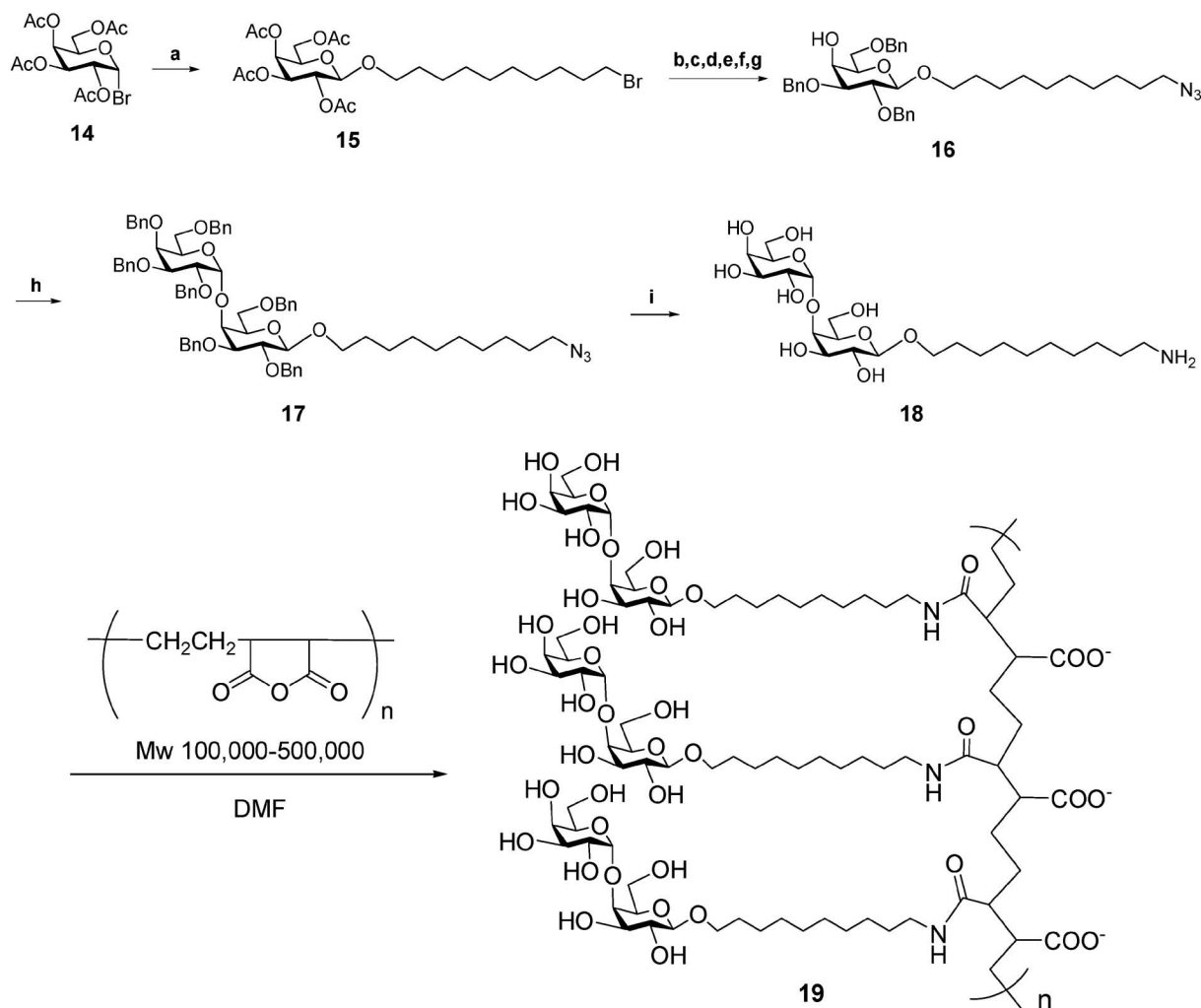


Fig. 7. Synthesis of Polyanionic Glycopolymer **19** Having Gb₂ Disaccharide

a: 10-bromo-1-decanol, Ag₂CO₃, CH₂Cl₂, MS4A, 72%. b: NaN₃, DMF, 80°C, 99%. c: NaOMe, MeOH. d: 2,2-dimethoxypropane, acetone, camphorsulfonic acid (CSA), 73% (two steps). e: BnBr, NaH, quant. f: MeOH, CSA, 84%. g: Bu₂SnO, toluene, reflux, then BnBr, Bu₄NBr (0.5 equiv), 93%. h: 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl chloride, AgClO₄, Et₂O, MS4A, 0°C→rt, 22 h, α (67%) + β (7%). i: Pd(OH)₂, H₂, MeOH-AcOEt (2 : 5, v/v), 85%.

なバリアーをチップの表面に構築することで、外部からの水の浸入をブロックし、より強固なチップを構築できると考えられる。このような思想の基に、ポリアニオン性 Gb₂ 糖鎖ポリマー **19** を合成した (Fig. 7)。

2-7. 交互積層法による糖鎖チップの作製 合成したポリアニオン性糖鎖ポリマー **19** は、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法でモニタリングしながら、センサーチップに累積した。そのプロセスを Fig. 8 に示す。あらかじめ、メルカプトプロピオン酸で処理したアニオン性自己集積化単分子膜 (Fig. 9, Layer A) を作製し、これを SPR 装置に装着する。ここに、ポリカチオン性ポリマーの poly (diallyl-dimethylammonium chloride) [**20** とする, Mw

400000–500000] をフロー系で流し固定化する (Layer B)。続いて、ポリアニオン性ポリマーの poly (ethylene-*alt*-maleic acid) [**21** とする, Mw 100000–500000] を固定化して Layer C を構築する。再度、ポリカチオン性ポリマー **20** を固定化して Layer D とする。最後に、ポリアニオン性 Gb₂ 糖鎖ポリマー **19** を固定化して最外層に毒素の結合する糖鎖を固定化した Layer E を構築した。ここでは、交互積層法を繰り返し用いることにより、より安定な 5 層のマルチレイヤー型糖鎖チップを作製した。これを Fig. 9 に示す。FTIR-RAS 解析により、このチップを 50 mM 塩酸で洗浄するか、あるいは、150 mM NaCl を含有する HEPES 緩衝液で 24 時間洗浄しても、なんら剥離することがなかつ

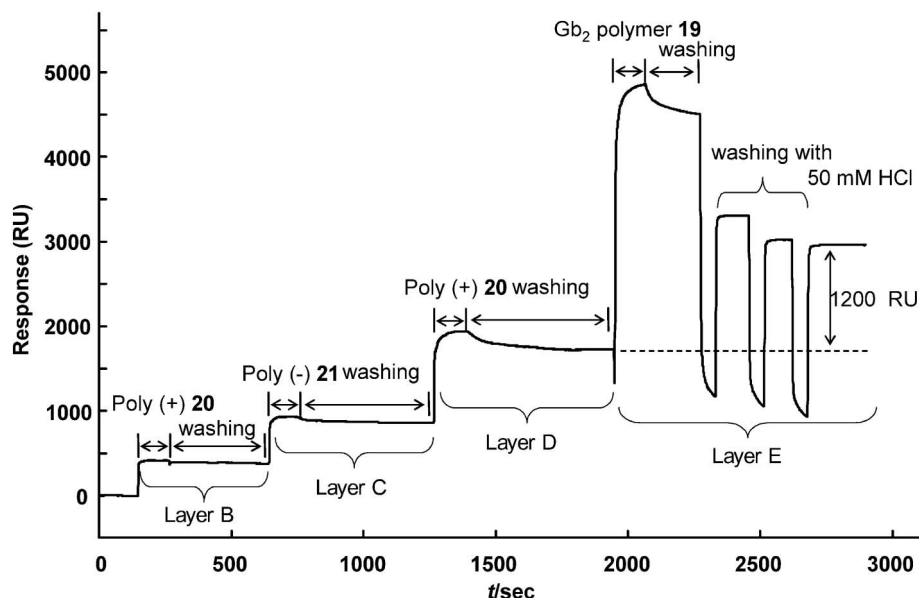


Fig. 8. SPR Monitoring of the Layer-by-layer Processes for the Assembly of Gb₂ Glyco-chips with 19. Glycopolymer 19 with 25% sugar content was applied as a typical example.

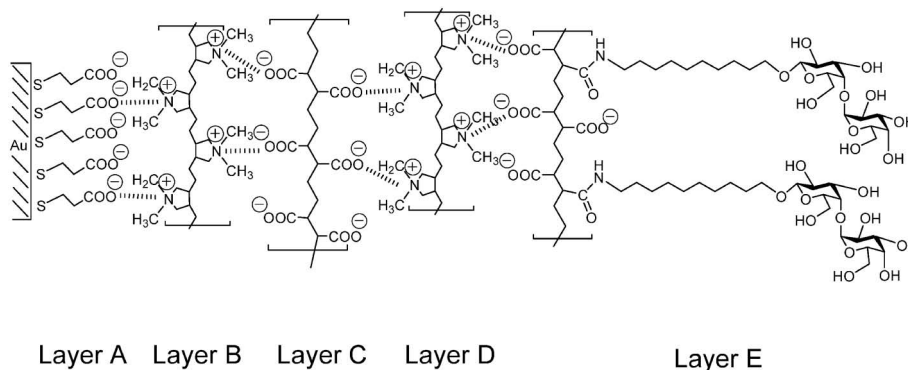


Fig. 9. Assembly of the Gb₂ Glycochips by Layer-by-layer Adsorption

た。したがって、本チップは、通常の毒素検知の条件において十分使用可能である。

2-8. SPR によるペロ毒素の検出 Figure 10 にペロ毒素 I 型を用いたときの SPR レスポンスを示す。糖含有率が 0%, 3%, 13%, 25%, 43% の Gb₂ 糖鎖ポリマーを Fig. 7 に従いそれぞれ合成し、これらを交互積層法により固定化して 5 種類の糖鎖チップを作製した。各チップに対する毒素の結合量を SPR により検出した。その結果、少なくとも 13% 以上の Gb₂ 糖鎖を含有する糖鎖ポリマーを固定化したチップが、毒素検知に有効であった。43% の Gb₂ チップを用いたときに、毒素に対するレスポンスが最も高くなった。また、そのときの見掛けの結

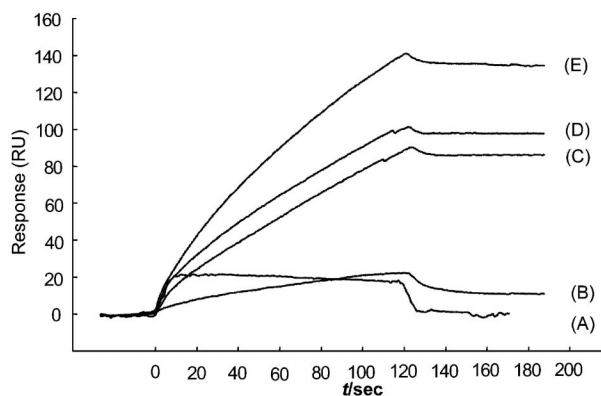


Fig. 10. SPR Responses to Stx-1 (1 µg/ml) on the Surface of Glycochips Coated with Gb₂-based Glycopolymers of Different Sugar Content

(A): 0%, (B): 3%, (C): 13%, (D): 25%, (E): 43%.

合定数 (K_a) を求めたところ, 1.8×10^9 [M^{-1}] となり, 毒素と糖鎖の結合は相当強い結合であることが明らかになった. 糖鎖を含有しない 0% のチップ (コントロール) を用いたときには, 毒素は結合しなかった.

次に, 43% の Gb_2 糖鎖を含有するポリマーを固定化したチップを用いて, 検出限界を求めた. Figure 11 には, 0 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1 μ g/ml の各濃度の毒素をインジェクトしたときの SPR レスポンスを示す. その結果, 10 ng/ml–1 μ g/ml の各濃度において, 毒素を検出でき, 10 ng/ml を検出限界と決定した. これは, 毒素の絶対量としては 300 pg に相当する. 検出に要する時間は, 100 ng/ml–1 μ g/ml においては 2 分程度 [Fig. 11(a)], また, 10 ng/ml においては, 約 30 分であった [Fig. 11(b)]. コントロールとして毒素を含まない粗抽出液 (0 ng/ml) を用いたときには, SPR レスポンスはみられなかった.

Figure 12 に様々な糖鎖を固定化したチップに対するペロ毒素のレスポンスを示す. 固定化に用いた糖鎖は, Gb_2 , ラクトース, マンノースである. ラクトース, マンノースを側鎖に有するポリアニオン性糖鎖ポリマー (22 及び 23) は, Gb_2 糖鎖ポリマーと類似の方法によって合成した (Fig. 13). SPR 解析の結果, Gb_2 固定化チップが最も高いレスポンスを示し [Fig. 12(A)], マンノース固定化チップには, 結合しなかった [Fig. 12(C)]. ラクトース固定化チップには, 弱いながらも結合した [Fig. 12

(B)]. ペロ毒素の天然リガンドは Gb_3 セラミドであり, ラクトースを含んでいる. これまでの研究から, ペロ毒素は Gb_2 糖鎖よりも Gb_3 糖鎖に対して強い結合を示すことが知られている. したがって, ラクトース部分は, 毒素の結合に少なからず寄与していると考えられる. 本結果は, この事実をサポートするものである.

次に, 毒素と糖鎖の結合が特異的であるかを調べるために阻害実験を行った. 阻害剤に, QCM 法で述べた Gb_2 糖鎖を側鎖に持つアクリルアミド型ポリマーや, 本セクションでチップに使用したポリアニオン性糖鎖ポリマー 19 を用いた. Figure 14 及び

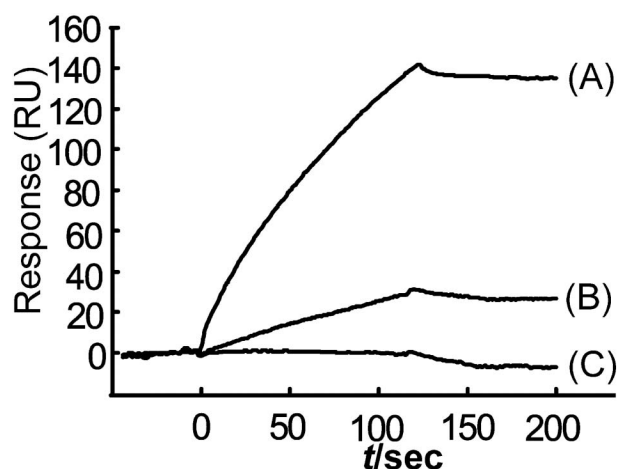


Fig. 12. Binding Specificity of Stx-1 to the Three Glycochips Containing (A) Gb_2 -embedded Glycopolymer 19 (43%), (B) Lactose-embedded Glycopolymer 22 (40%), and (C) Mannose-embedded Glycopolymer 23 (37%)

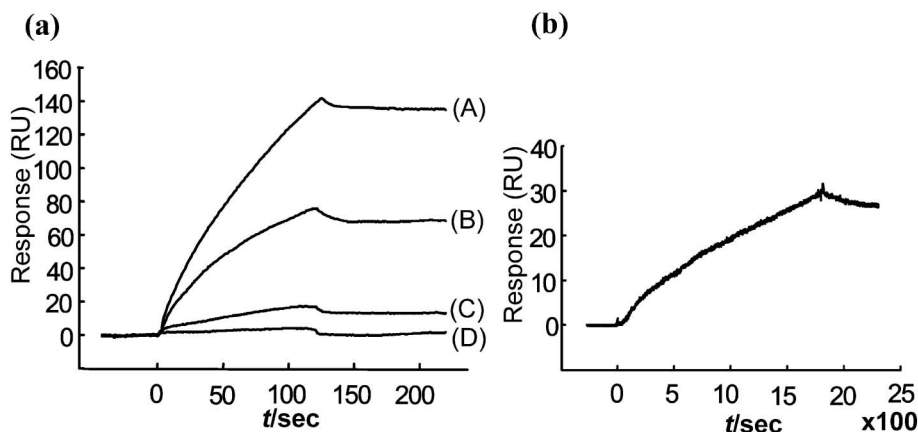


Fig. 11. SPR Responses to Solutions of Stx-1 at Different Concentrations on Glycochips of Polyanionic Glycopolymer 19 (Gb_2 content: 43%)

(a) (A) 1 μ g/ml, (B) 500 ng/ml, (C) 100 ng/ml, or (D) 0 ng/ml, (b) 10 ng/ml.

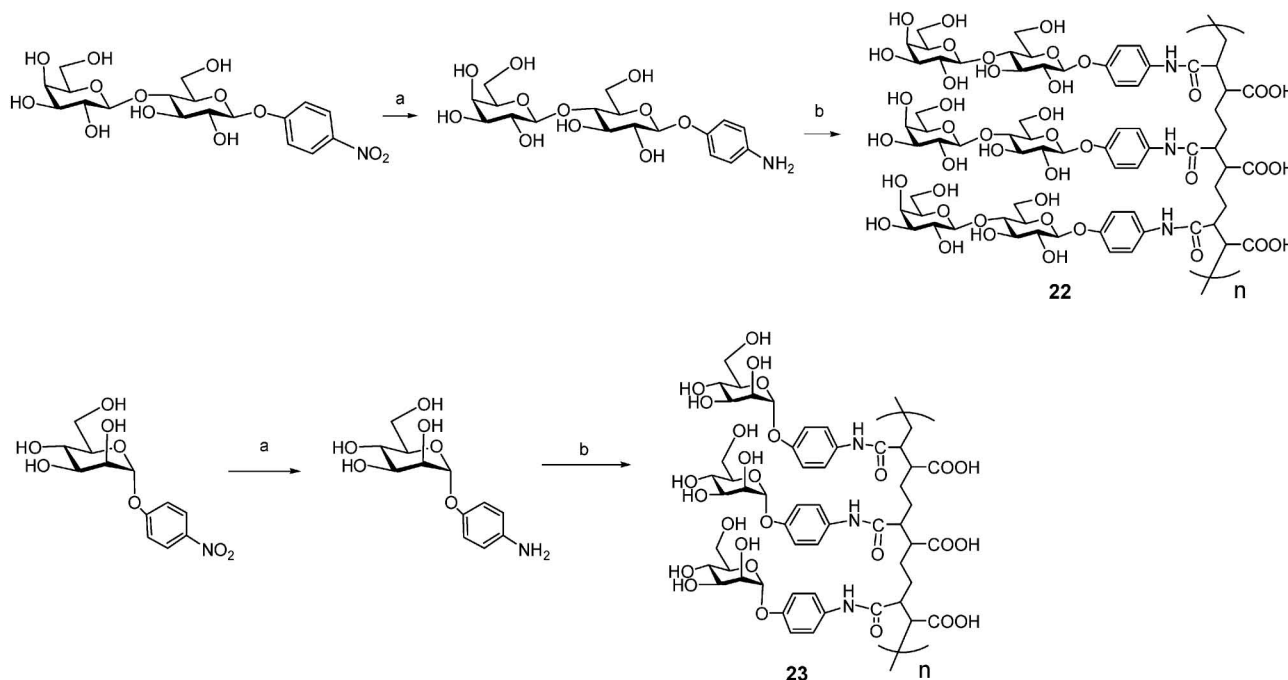


Fig. 13. Synthesis of Polyanionic Glycopolymer **22** and **23** Having either a Lactose or Mannose Residue

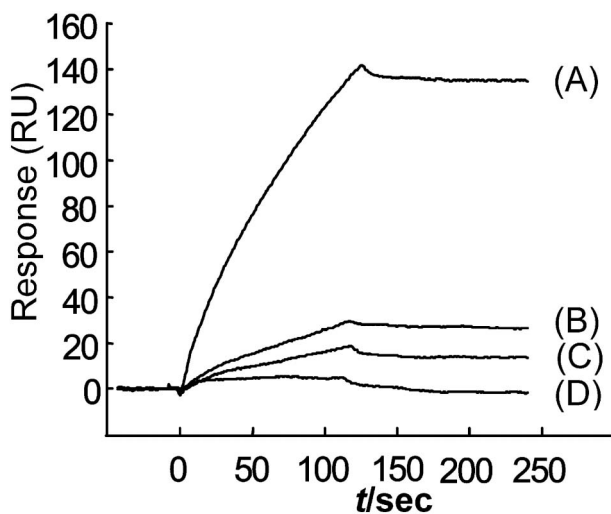


Fig. 14. Inhibitory Experiments in the Presence of the Gb₂ Acrylamidecopolymer as a Competitor to the Binding of Stx-1 to Gb₂ Chips Coated with **19** (sugar content: 43%)
Toxin concentration 14 nM. Competitor concentration: (A): 0 nM, (B): 140 nM, (C): 280 nM, (D): 420 nM

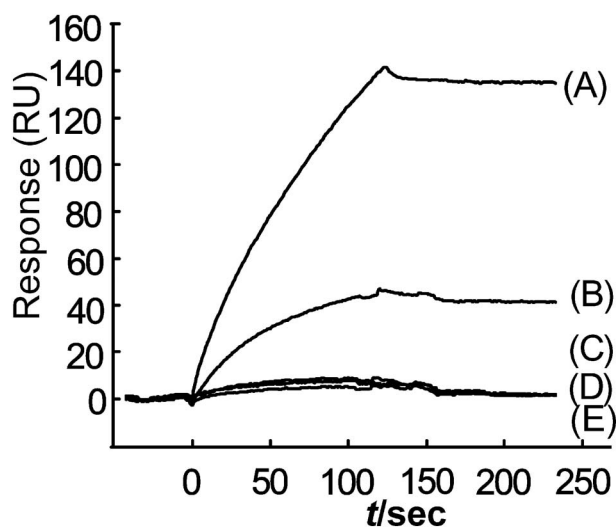


Fig. 15. Inhibitory Effects of Competitor **19** with Varying Gb₂ Content on the Binding of Stx-1 to Gb₂ Chips Coated with **19** (sugar content: 43%)

Toxin concentration: 14 nM. Competitor concentration: (A): 0 nM, (B): 420 nM (Gb₂: 3%), (C): 420 nM (Gb₂: 3%), (D): 420 nM (Gb₂: 13%), (E): 420 nM (Gb₂: 43%).

Fig. 15 に、それぞれの阻害剤を用いたときの SPR を示す。アクリルアミド型ポリマーを阻害剤に用いたときには (Fig. 14), dose-dependent に阻害がかかった。すなわち、阻害剤濃度を 140 nM, 280 nM, 420 nM と高めるに従って、SPR レスポンスが減少した。30 倍過剰 (420 nM) のポリマーを加えたと

きに、ペロ毒素の結合はほぼ完全に阻害された [Fig. 14(D)]。ポリアニオン性糖鎖ポリマー **19** を用いたときには (Fig. 15), ポリマー中の Gb₂ 含量が阻害に重要であるという結果を示した。つまり、Gb₂ 含量が 43% のポリマーは、420 nM (毒素の 30 倍過剰の阻害剤を加えたことに相当) でほぼ完全に

阻害されるのに対し [Fig. 15 (E)], 糖鎖含量が低い 3% のポリマーでは, 420 nM の濃度では不完全な阻害を示した [Fig. 15 (B)]. Gb₂ 含量が 3% のポリマーを用いて完全に阻害をするには, 4200 nM の阻害剤が必要であった [Fig. 15 (C)]. 以上の実験により, 毒素は, チップ上の糖鎖を特異的に認識して検出されており, 本分析法は, 信頼性の高い検知技術であることが実証された.

ELISA や蛍光免疫法などの抗体を用いた検出法は, 現在, 主流の判定法であるが, 抗体を低温 (2–8°C) で保存しなければならないし, 保証有効期限も短い. 本検出法は, ラベル化なしで毒素を迅速で感度よく検出できる. Figure 8 のチップ作製に要する時間を含めても, 80 分程度であり, チップが既に用意されていて毒素の検出のみであれば, 30 分程度で結果が分かるので, 現行法に比べてはるかに迅速である. ここで述べた糖鎖を用いたペロ毒素検知に関する研究は, 最近の総説にまとめられている.^{39–41)}

3. 猛毒リシンの高感度検知技術の開発⁴²⁾

3-1. リシン検知の必要性 リシンは, 1978 年にロンドンでジャーナリストの暗殺に使用されたことがあり, また, 最近では, 2003–2004 年に米国の上院やホワイトハウス宛にリシン入りの「白い粉」が郵送される事件が起きている. リシンはヒマ植物 (*Ricinus communis*) の種子に含まれているタンパク性の毒素である. 青酸カリの 500–1000 倍も毒性が高いとされている. そのため, 化学兵器や生物化学テロへの使用が懸念されている. また, 効果的な治療法もない. 被害を最小限にするために, 迅速で高感度な検知技術の開発が, 国家レベルの研究として喫緊に行われなければならない. そこでわれわれは, 警察庁科学警察研究所 瀬戸康雄博士と共同で, リシンを対象毒素に選択して, 研究を進めた.

3-2. リシンの感染機構と毒素に高親和性を示す検出チップ リシンは, 細胞表層に存在する特定の糖鎖に結合して中毒症状を示す. この機構は, ペロ毒素の場合に類似している. ただ, リシンは, A₁B₁ の構造体を取っており, リボヌクレアーゼ活性を持つ A-サブユニットと, 細胞表層のオリゴ糖に結合する B-サブユニットが 1 つずつ結合している点が異なる. 結合する糖鎖もペロ毒素とは異なり, 非還元末端に β -D-ガラクトース, 若しくは, β -

D-N-アセチルガラクトサミンを有する糖鎖が天然リガンドとされる. そこでわれわれは, 非還元末端にこれらの糖を含有するリガンドを合成して, 毒素を検出することを試みた. すなわち, ラクトース, ガラクトースの天然セラミド型リガンド (Fig. 16 の化合物 **24**, **26**) をケモエンザイム的に調製した. チップに固定化するためのアンカーに環状のジスルフィド基を選択し配糖体に導入した. 合成した糖鎖リガンドは, self-assembled monolayer (SAM) 法によりチップに固定化した. また, レファレンスとしてグルコースを有するセラミド型リガンド (Fig. 16 の化合物 **27**) も合成した. さらに, 配糖体の効果を調べるために, 芳香族基を導入したりガンド (Fig. 16 の化合物 **25**) も合成した. これらのリガンドの中から, リシン検知に有効な糖鎖を SPR により決定した. まず, 見掛けの結合定数を求めたところ, 天然型のラクトースリガンド (化合物 **24**) では, 1.5×10^9 となった. 一方, 同じラクトースを有する芳香族基 (化合物 **25**) では, 1.7×10^7 となり, 配糖体構造によって約 88 倍も結合定数が異なることが明らかになった. また, ガラクトースセラミド型 (化合物 **26**) では, 2.3×10^6 となり, 配糖体が天然型と同じであっても, ラクトースの方がガラクトースより 650 倍も結合定数が大きいことが分かった. グルコース (化合物 **27**) では, 8.2×10^4 となり, ラクトースと比べ 18000 倍の差が生じた. したがって, ラクトースセラミド型リガンド (化合物 **24**) がリシンの高感度検知に適していると考えられる.

3-3. 検出感度と特異性 次に, このラクトース修飾チップを用い, 1 μ g/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 0 pg/ml の各リシン濃度に対する SPR の応答性を調べた. その結果, 1 μ g/ml ~ 10 pg/ml の濃度においてリシンを検出できた. 10 pg/ml の濃度においても, 有意な差でリシンを検出できたので (Fig. 17), 本法は高感度なリシン検知技術であることが証明された. 検出に要した時間は約 5 分で, 検出感度, 迅速さともに世界最高である. 次に, リシン以外のタンパク質について非特異的に結合しないか検討した (Fig. 18). 調べたタンパク質は, アルブミン, グロブリン, 及び, ヒマ凝集素 (RCA₁₂₀), タチナタマメ, ダイズ, ピーナッツ, オサゲオレンジ, イヌエンジュマ

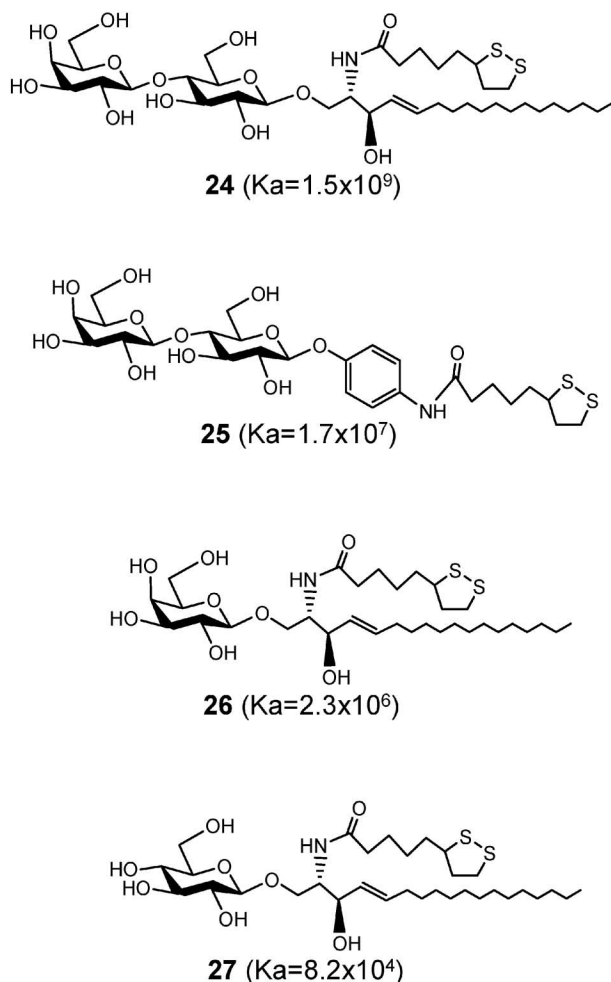


Fig. 16. Structures of Synthetic Carbohydrate Ligands 24–27

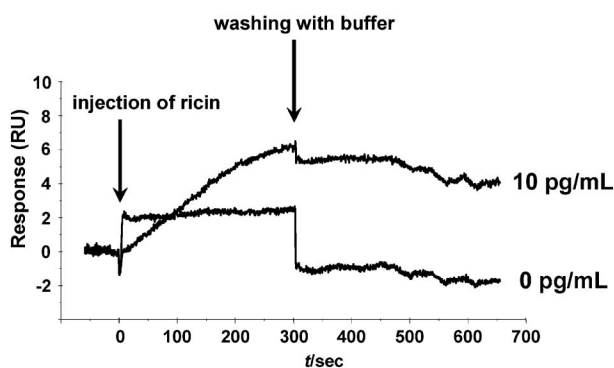


Fig. 17. SPR Responses of Ricin at Different Concentrations to a Sugar Chip Derived from 24.

メ、サルビアなどの植物由来のレクチンである。解析の結果、RCA₁₂₀を除いて残りの8種については、ほとんど結合しないことが分かった (Fig. 18)。RCA₁₂₀は、ラクトース、ガラクトースともに、 10^9 -

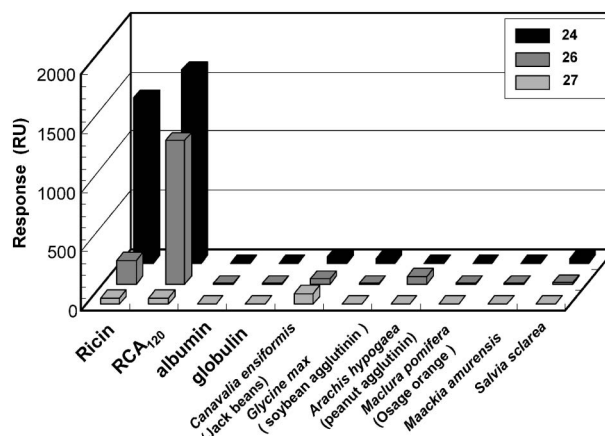


Fig. 18. Discriminative Analyses of Ricin and Different Proteins Using SPR

10^{10} の強さ (結合定数) で結合した。一方、リシンでは、両糖鎖の結合定数の差は 650 倍に達した。したがって、この差を利用して、リシンと RCA₁₂₀ とを明確に識別できた。すなわち、リシンではラクトースにのみ強く結合したが、RCA₁₂₀ ではラクトース及びガラクトースの両方に強く結合した。抗体法では識別が困難なリシンと RCA₁₂₀ とを、2種類の糖鎖を用いて簡便に識別することができた。

ベロ毒素と同様に、阻害実験を行ったところ、does-dependent にチップへのリシン結合が阻害された。それゆえ、本検知法は、「リシン-糖鎖」結合に基づく特異的な検知法であることが実証された。本検知技術は信頼性の高い判定法である。

3-4. 金ナノ粒子を用いた現場検知法の開発

先の SPR の結果を基に、現場用の簡易検知法を開発した。センサーチップに糖鎖を固定化したのと類似の方法によって、天然セラミド型糖誘導体 (化合物 24, 26, 27) を金ナノ粒子 (直径約 20 nm) に自己集積化膜法によって固定化した。この各糖鎖修飾金ナノ粒子をマイクロプレート上に一定体積取り、ここに、リシン、RCA₁₂₀、及び、各種レクチンやアルブミンを加えた。その結果、リシンでは、ラクトース金ナノ粒子でのみ凝集が生じ、RCA₁₂₀ では、ラクトースとガラクトースの金ナノ粒子に凝集が生じた。ほかのタンパク質では凝集はみられなかった。これらの結果は、SPR の結果と完全に一致した。本分析法は、特別な装置を必要とせず目視によって、3.3 $\mu\text{g/ml}$ のリシンなら 10 分

程度で、 $1.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ では 30 分で判定できた。

4. 糖鎖モノリスを用いたリシン除染剤の開発

前節で、リシンなどの生物毒素の高感度なラボ用、及び現場用の検知技術について述べた。これらの検知技術は、テロに用いられた危険物質を特定するために重要である。しかし、その一方で、汚染現場からこれらの生物化学剤を速やかに取り除くことも必要である。そこでわれわれは、科学警察研究所、ジーエルサイエンス^(株)と共同で、リシン除染剤の開発を進めてきた。ここでは紙面の関係で、その一部について紹介する。

モノリス型シリカゲル（ジーエルサイエンス製）は、 $35\text{--}40 \text{ nm}$ の微細な貫通孔が無数にあいたマテリアルで、ゾルゲル法により大量に生産される。これは表面積が $100 \text{ m}^2/\text{g}$ と大きく、ここに糖鎖を導入すれば、効率よくリシンを除去可能と予想される。そこで、このモノリスにわれわれが独自に開発した糖鎖を導入することを試みた。糖鎖の導入条件などを詳細に検討したところ、約 20% の糖鎖を導入できることが分かった。次にこの糖鎖モノリスを用い、リシンを除去できるか比色分析法によって評価した (Fig. 19)。その結果、約 96% のリシンを除去できた。糖鎖に結合しないアルブミンでは、ほとんど除去されなかった (<4%)。また、先に示した SPR 法によってリシン除染率を求めたところ、比

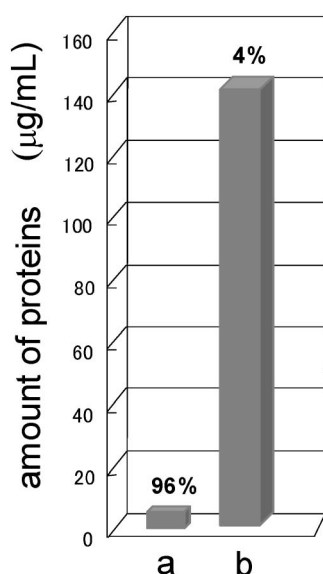


Fig. 19. Decontamination of Different Proteins Using a Sugar-modified Monolith

a: ricin, b: albumin. $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ of each protein was used in this study. The efficiency of decontamination is also indicated.

色法と同じ結果を与えた (>95%)。これらの結果は、糖鎖モノリスが特異的にリシンのみを除去したことを意味している。

道路や建物などがリシンで汚染された場合、大量の水で洗浄するが、廃水中にはリシンが残存している。リシンを含んだ廃水は、河川に流せないで、なんらかの手法でリシンを取り除かなければならない。本技術は、廃水中のリシンを糖鎖モノリスによって選択的に簡便に除去する技術である。活性炭カラムなどの方法では、非選択的に様々な物質が吸着するため、除染の効率が悪い。本技術は、目的の危険物質のみを除去可能であり、また、モノリスも糖鎖も安価であるので、新しい除染剤としての利用が期待される。

5. おわりに

以上のように、われわれは、米国 CDC において生物化学兵器として分類され、食中毒の原因ともなった大腸菌 O157 のベロ毒素、及び、海外で暗殺やテロに用いられた猛毒リシンについて、糖鎖を用いた従来にない革新的な毒素検知技術を開発してきた。この技術は、現行の抗体法や他のアッセイ法に比べて、感度、検出時間、チップの保存安定性などにおいて優れており、細胞フリーの検出法として様々な機関での利用が期待される。例えば、本技術は、食中毒やテロが生じたときの現場判定法として、あるいは、検査機関における毒素の一次スクリーニング法としての利用が挙げられ、確定検査のコストを抑えることができる。また、糖鎖モノリスによるリシン除染剤が開発され、警察、消防、防衛の初動措置隊への配備も期待される。本研究は、毒素による中毒の治療薬の開発にも応用可能である。われわれは、ここで紹介した毒素判定技術や除染技術を通して、安心・安全な社会の構築に微力ながら貢献したいと考えている。

謝辞 本研究は、科学警察研究所瀬戸康雄博士、ジーエルサイエンス^(株)古野正浩博士、岐阜薬科大学森 裕志教授、千葉大学西田芳弘教授との共同研究である。また、貴重なご意見を頂いた東京工科大学軽部征夫教授、箕浦憲彦教授に深謝します。本研究は、文部科学省科学技術振興調整費「化学剤・生物毒素の一斉現場検知法の開発」、「生物化学テロにおける効果的な除染法の開発」の一環として実施

したものである。

REFERENCES

- 1) “Essentials of Glycobiology,” eds. by Varki A., Cummings A., Esko J., Freeze H., Hart G., Martin J., Cold Spring Harbor, Plainview, New York, 1999.
- 2) Bowman K. G., Bertozzi C. R., *Chem. Biol.*, **6**, R9–R22 (1999).
- 3) Hemmerich S., *Drug Discov. Today*, **6**, 27 (2001).
- 4) Uzawa H., Kamiya S., Minoura N., Dohi H., Nishida Y., Taguchi K., Yokoyama S., Mori H., Shimizu T., Kobayashi K., *Biomacromolecules*, **3**, 411–414 (2002).
- 5) Uzawa H., Ito H., Izumi M., Tokuhisa H., Taguchi K., Minoura N., *Tetrahedron*, **61**, 5895–5905 (2005).
- 6) Uzawa H., Ito H., Neri P., Mori H., Nishida Y., *ChemBioChem*, **8**, 2117–2124 (2007).
- 7) “*Escherichia coli* O157: H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strain,” eds. by Kaper J. B., O’Brien A. D., ASM press, Washington, DC, 1998.
- 8) Heisei 9 Nen-ban Kousei Hakusho.
- 9) Tsen H.-Y., Jian L.-Z., *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 585–592 (1998).
- 10) Weeratna R. D., Doyle M. P., *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2951–2955 (1991).
- 11) Acheson D. W. K., Jacewicz M., Kane A. V., Donohue-Rolfe A., Keusch G. T., *Microb. Pathog.*, **14**, 57–66 (1993).
- 12) Ashkenazi S., Cleary T. G., *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1145–1150 (1989).
- 13) Merritt E. A., Hol W. G. J., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 165–171 (1995).
- 14) Ling H., Boodhoo A., Hazes B., Cummings M. D., Armstrong G. D., Brunton J. L., Read R. J., *Biochemistry*, **37**, 1777–1788 (1998).
- 15) Nutikka A., Lingwood C., *Glycoconj. J.*, **20**, 333–8 (2003).
- 16) Lingwood C. A., *Trends Glycosci. Glyco-technol.*, **12**, 7–16 (2000).
- 17) Marx K. A., *Biomacromolecules*, **4**, 1099–1120 (2003).
- 18) Jönsson U., Fägerstam L., Ivarsson B., Johansson B., Karlsson R., Lundh K., Läfas S., Persson B., Roos H., Rönnerberg I., Sjölander S., Stenberg E., Stahlberg R., Urbaniczky C., Ostlin H., Malmqvist M., *BioTechniques*, **11**, 620–627 (1991).
- 19) Hoa X. D., Kirk A. G., Tabrizian M., *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 151–160 (2007).
- 20) Neri P., Nagano S. I., Yokoyama S., Dohi H., Kobayashi K., Miura T., Inazu T., Sugiyama T., Nishida Y., Mori H., *Microbiol. Immunol.*, **51**, 581–592 (2007).
- 21) Goldman E. R., Clapp A. R., Anderson G. P., Uyeda H. T., Mauro J. M., Medintz I. L., Mattoussi H., *Anal. Chem.*, **76**, 684–688 (2004).
- 22) Yamazaki M., Sato S., Gondaira F., Sugiyama J., *Microbiol. Immunol.*, **45**, 621–628 (2001).
- 23) Sauerbrey G., *Z. Phys.*, **155**, 206–222 (1959).
- 24) Dohi H., Nishida Y., Tanaka H., Kobayashi K., *Synlett.*, **2001**, 1446–1448 (2001).
- 25) Kiessling L. L., Cairo C. W., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 234–235 (2002).
- 26) Wang D., Liu S., Trummer B. J., Deng C., Wang A., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 275–281 (2002).
- 27) Fukui S., Feizi T., Galustian C., Lawson A. M., Chai W., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1011–1017 (2002).
- 28) Houseman B. T., Mrksich M., *Chem. Biol.*, **9**, 443–454 (2002).
- 29) Fazio F., Bryan M. C., Blixt O., Paulson J. C., Wong C.-H., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14397–14402 (2002).
- 30) Köhn M., Wacker R., Peters C., Schröder H., Soullère L., Breinbauer R., Niemeyer C. M., Waldmann H., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**, 5830–5834 (2003).
- 31) Park S., Shin I., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 3180–3182 (2002).
- 32) de la Fuente J. M., Barrientos A. G., Rojas T. C., Rojo J., Cañada J., Fernández A., Penadés S., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 2257–2261 (2001).
- 33) Otsuka H., Akiyama Y., Nagasaki Y., Kataoka K., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8226–8230 (2001).
- 34) Mammen M., Choi S. K., Whitesides G. M., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **37**, 2754–2794 (1998).
- 35) Decher G., *Science*, **277**, 1232–1237 (1997).

- 36) Decher G., Lvov Y., Schmitt J., *Thin Solid Films*, **244**, 772–777 (1994).
- 37) Kanekiyo Y., Inoue K., Ono Y., Sano M., Shinkai S., Reinhoudt D. N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**, 2719–2722 (1999).
- 38) Onda M., Lvov Y., Ariga K., Kunitake T., *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 163–167 (1996).
- 39) Uzawa H., *Membrane*, **29**, 34–41 (2004).
- 40) Uzawa H., *Kagaku*, **61**, 18–22 (2006).
- 41) Uzawa H., “Biosensor Chemical Sensor Jiten,” Techno System., Co. Ltd., 2007, pp. 50–62.
- 42) Uzawa H., Ohga K., Shinozaki Y., Ohsawa I., Nagatsuka T., Seto Y., Nishida Y., *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 929–933 (2008).