

コンカナバリン A/糖ポリマー交互累積膜および複合体の
糖応答性に関する研究

佐藤勝彦

本学位論文は、以下の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. **Sugar-Induced Disintegration of Layer-by-Layer Assemblies Composed of Concanavalin A and Glycogen**
Katsuhiko Sato, Yoko Imoto, Jun Sugama, Shunsuke Seki, Hiroyuki Inoue, Tsuyoshi, Odagiri, Tomonori Hoshi, Jun-ichi Anzai
Langmuir, 21, 797-799 (2005).

2. **Sugar-Sensitive Thin Films Composed of Concanavalin A and Sugar-Bearing Polymers**
Katsuhiko Sato, Daisuke Kodama, Jun-ichi Anzai
Anal. Sci., 21, 1375-1378 (2005).

3. **Fluorometric Determination of Sugars Using Fluorescein-labeled Concanavalin A-Glycogen Conjugates**
Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai
Anal. Bioanal. Chem., 384, 1297-1301 (2006).

4. **Electrochemical Determination of Sugars Using Multilayer Thin Films
Composed of Ferrocene-Appended Glycogen and Concanavalin A**
Katsuhiko Sato, Daisuke Kodama, Jun-ichi Anzai
Anal. Bioanal. Chem., 386, 1899-1904 (2006).

5. **Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules Containing FITC-Concanavalin A/
Glycogen Conjugates for Fluorometric Determination of Sugars**
Katsuhiko Sato, Yoshihiro Endo, and Jun-ichi Anzai
Sens. Mater., 19, 203-213 (2007).

目次	4
略語表	6
第 1 章 序論	8
第 2 章 コンカナバリン A/糖ポリマー交互累積膜の調製と糖応答性	
2 - 1 緒言	15
2 - 2 実験方法	
試薬	17
装置	17
Con A と糖ポリマーの交互累積膜の作製方法	19
2 - 3 結果と考察	
Con A と Gly を使用した交互累積膜の調製と糖による分解	20
Con A と Dext および合成糖ポリマー交互累積膜の調製と糖応答性	26
Con A/FcGly 累積膜を使用した糖の電気化学的検出	30
2 - 4 まとめ	35
第 3 章 コンカナバリン A/グリコーゲン複合体の糖応答性	
3 - 1 緒言	37
3 - 2 実験方法	
試薬	40
装置	40
FITC-Con A - Gly 複合体の調製と蛍光測定	40
3 - 3 結果と考察	

FITC-Con A - Gly の複合体形成による蛍光への影響	40
FITC-Con A - Gly 複合体の糖応答性	43
3 - 4 まとめ	47
第4章 コンカナバリンA-グリコーゲン複合体を内包する	
カプセルの調製と糖応答性	
4 - 1 緒言	49
4 - 2 実験方法	
試薬	51
装置	52
FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの調製	52
FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの糖応答性	53
4 - 3 結果と考察	
FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの調製	53
FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの糖応答性	55
FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの再利用性の検討	60
4 - 4 まとめ	63
第5章 結論	64
参考文献	66
謝辞	74

略語表

本論文中では以下に示す記号を略語として用いた。

Con A	コンカナバリン A concanavalin A
CV	サイクリックボルタンメトリー cyclic voltammetry
Dext	デキストラン dextran
Fc	フェロセン ferrocene
FcGly	フェロセンラベル化グリコーゲン ferrocene labeled glycogen
FITC	フルオレセインイソチオシアネート fluorescein isothiocyanate
FITC-Con A	FITC ラベル化コンカナバリン A FITC labeled concanavarin A
Gal	ガラクトース D-galactose
GOD	グルコース酸化酵素 glucose oxidase
Glu	グルコース D-glucose

Gly	グリコーゲン glycogen
Man	マンノース D-mannose
Me-a-Glu	メチル α -D-グルコピラノシド methyl α -D-glucopyranoside
Me-a-Man	メチル α -D-マンノピラノシド methyl α -D-mannopyranoside
PAH	ポリアリルアミン polyallylamine
PBA	フェニルボロン酸 phenylboronic acid
PEI	ポリエチレンイミン polyethyleneimine
PSS	ポリスチレンスルホン酸 polystylenesulfonic acid
QCM	水晶振動子マイクロバランス quartz crystal microbalance
TRITC	テトラメチルローダミンイソチオシアネート tetramethylrhodamineisothiocyanate
TRITC-Con A	TRITC ラベル化コンカナバリン A TRITC labeled Concanavarin A

第 1 章 序論

コンカナバリン A (Con A) はタチナタマメなどに含まれる分子量 104,000 の糖結合性タンパク質 (レクチン) であり、4 量体の各サブユニットに 1 箇所の糖結合部位を有し、 α -D-グルコース残基および α -D-マンノース残基と可逆的に結合することが知られている [1] (Figure 1)。本研究ではこの Con A を用いた交互累積膜および複合体の調製とそれらの糖応答性について調査し、特にグルコース (Glu) の検出について検討した。

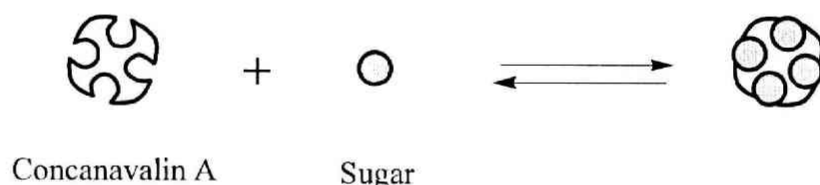


Figure 1. Complexation between concanavalin A and sugar.

Con A を利用した Glu の検出について述べる前に、Con A 以外の材料を利用した Glu 検出法について記しておく。最も代表的な Glu の検出法にグルコース酸化酵素 (GOD) のような酵素を利用した方法がある。酵素を Glu の認識材料として用いることにより高い選択性と、より検出しやすい化合物への変換効果が得られる。この場合の測定原理は、GOD が Glu を酸化してグルコン酸に代謝する反応を触媒し、このとき同時に生成される H_2O_2 濃度を測定することにより Glu を検出する。 H_2O_2 は反応性が高くさまざまな方法で測定することができるが GOD を電極に固定化した場合は、 H_2O_2 を電極表面で酸化して得られる応答電流から Glu を電流信号として検出することができる [2, 3] (Figure 2)。このようなアンペロメトリック方式の検出方法は、装置の構造が単純で高い感度を示すことや応答速度が速いことなどの理由から広く用いれ [4, 5]、市販されている血糖値測定用のグルコースセ

センサーの多くもこの方式を採用している。しかし、 H_2O_2 を電極で酸化する場合に血中に存在するアスコルビン酸や尿酸などの妨害物質の影響を受けてしまうために正確に **Glu** 濃度を測定することが出来い。このため、この欠点を改善するためにフェリシアン酸イオンやフェロセンなどの電子伝達メディエーターを利用する方法[6-8]および妨害物質の透過を制限する薄膜を処理する方法[9, 10]などの研究が現在も行われている。

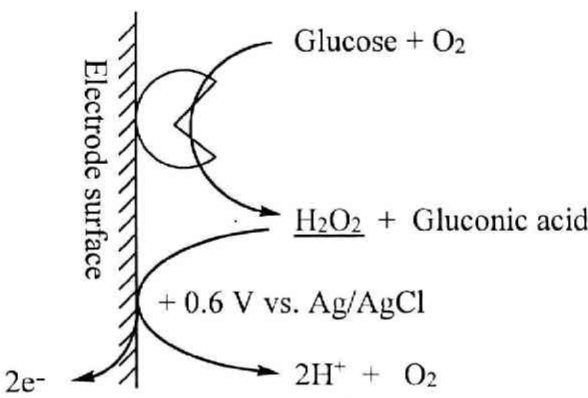


Figure 2. A scheme of the glucose detection by GOD-modified Electrode.

また、**GOD** によって生成する H_2O_2 と反応して呈色や発光するような色素と組み合わせ **Glu** の検出に利用する方法もある。例えば、**TMBZ** (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) や **DA67** は無色分子であるがペルオキシダーゼの存在下で H_2O_2 と鋭敏に反応し、それぞれ 655 nm および 665 nm に吸収極大をもつ色素を形成する[11, 12] (Figure 3)。これらの色素とともに **GOD** を固定化することにより目視によって検出可能な **Glu** 試験紙を作成することもできる。

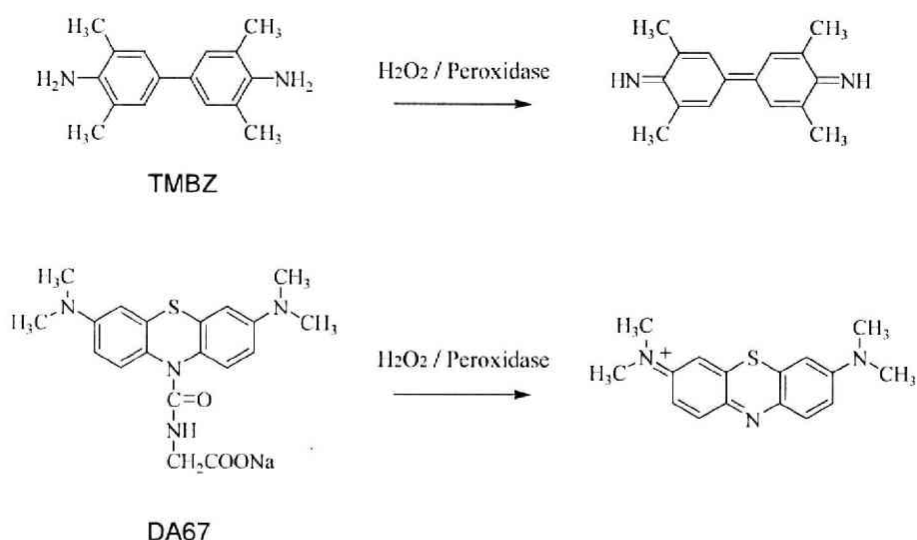


Figure 3. A scheme of TMBZ and DA67 reactions.

GOD から補酵素であるフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を取り除いた Apo-GOD や、グルコース脱水素酵素 (GDH) からニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADP) を取り除いた Apo-GDH などのアポ酵素類も Glu の認識材料として利用されている [13, 14]。これらの Apo-GOD および Apo-GDH を含む水溶液に ANS (8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid) を加えると、疎水的相互作用によって酵素の触媒ポケット内に ANS が取り込まれる。ここにアポ酵素とより強く結合する Glu を加えるとポケット内で ANS と置換し、ANS は水溶液中に追い出されるため蛍光強度が変化する (ANS は周囲の環境が疎水的条件から親水的条件に変化すると蛍光強度が減少する)。この蛍光強度の変化量は濃度依存的であるために Glu を定量することが出来る。これらのアポ酵素はホロ酵素に比べて Glu との特異性は低下するものの触媒能力を持たないため酵素反応を利用した場合とは異なる可逆的結合に基づく検出となる。生体中の酵素種は多岐にわたるため、アポ酵素を利用したセンシングは Glu 以外の基質の検出を設計する上でも興味深い材料であ

るといえる。

酵素を利用した **Glu** の検出は高選択的かつ高感度であるが、タンパク質であるために安定性に問題がある。そこで、フェニルボロン酸 (**PBA**) を利用した **Glu** の検出が開発された[15, 16]。**PBA** は **Glu** などの糖類が持つ 1,2-ジオールおよび 1,3-ジオールと可逆的に結合する性質をもつ (Figure 4) [17, 18]。低分子化合物である **PBA** を用いる利点として、酵素に比べて非常に安定であることや機能性誘導体を自由にデザインすることができることなどが挙げられる。

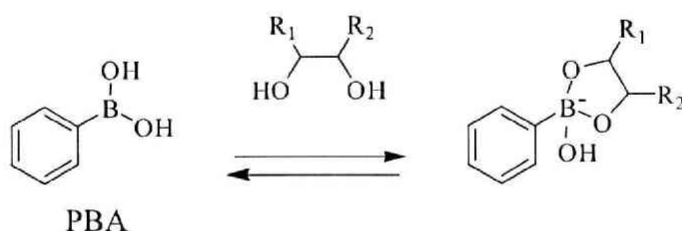


Figure 4. PBA complexation with diol.

このような理由から、**PBA** 色素が多数合成され分光学的な **Glu** の検出が報告されている (Figure 5) [19-25]。**PBA** 色素は **Glu** と結合することにより **B** 原子が電子過剰状態になり色素の発色団に影響を与えるため色調が変化する。しかし、これらの **PBA** 誘導体の **Glu** 特異性は酵素にくらべて非常に小さいことから **Glu** 以外のジオール部位を持つ分子の影響も大きく受けてしまう。このため一分子内に複数の **PBA** を立体制御して配置した化合物をデザインすることにより **Glu** の認識能力を向上させるような研究もなされているが大きな進歩はいまだみられない。

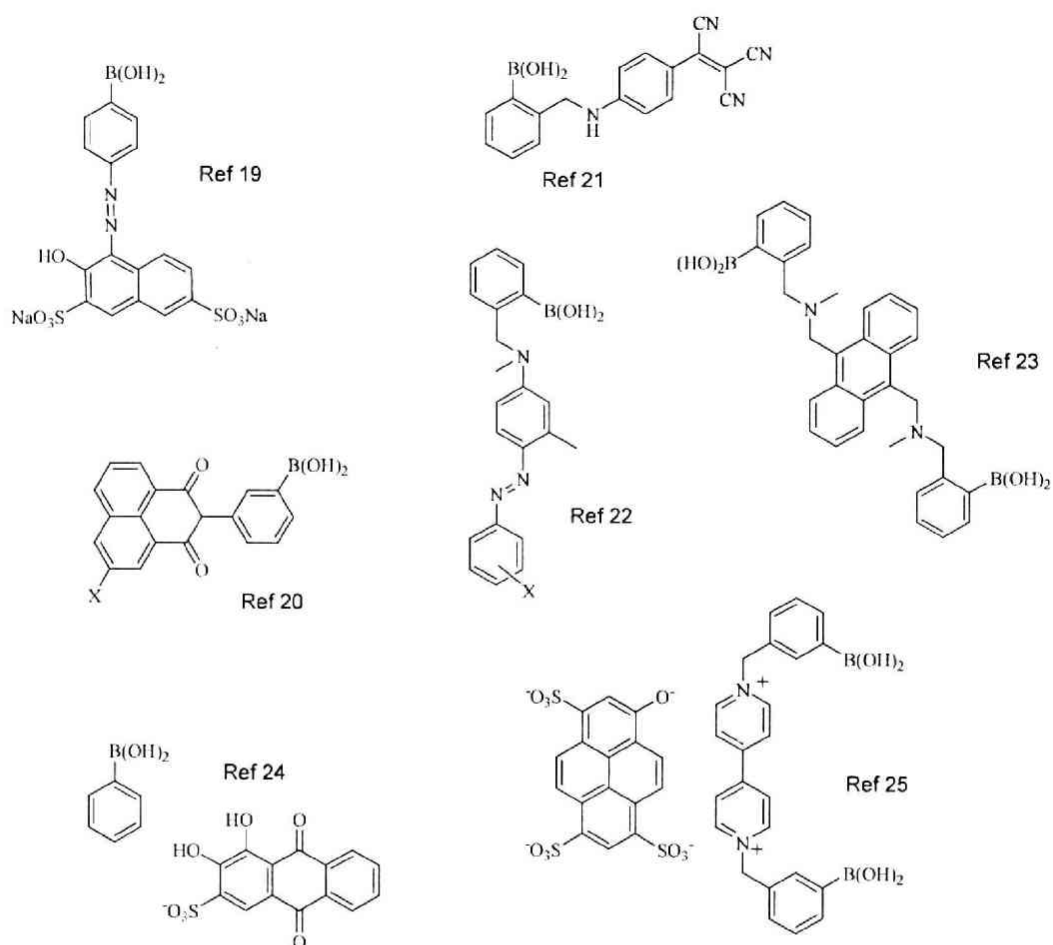


Figure 5. Structure of PBA-dyes.

GOD や PBA を利用した構造色による Glu 検出も報告されている。例えば、pH に応答するポリイソプロピルアクリルアミド・アクリル酸共重合ゲルに GOD を包括固定して調製した Glu 応答性ゲルは、ゲル内に Glu が取り込まれ酵素反応によってグルコン酸が生成されるとゲル内の pH が低下するためゲルは収縮する。この体積変化から Glu を検出することができる[26]。このような Glu 応答ゲルをナノメートルレベルで均一な球状粒子のコロイド結晶を鋳型に調製し粒子を除去すると、ゲルの膨潤度の変化に伴って屈折率が可視光のスケールで変化する（構造色）ことから Glu 濃度に応じて色調変化するゲルを作製することができる[27]。同様に、

PBA を用いて構造色変化を利用したものも報告されている [28-31]。

先にも述べたが、本研究では **Con A** を認識材料として利用した **Glu** の検出方法について検討した。レクチンである **Con A** を利用することで酵素を利用した場合に見られるような高選択性が期待できる。また、**Con A** と糖類は可逆的に結合するため **PBA** のような **Glu** との競合的作用にもとづいた検出となる。

これまで、**Con A** による糖類検出は分光学的方法を中心に報告されている。近年開発された例として、**Con A** の糖結合部位の近くに位置しているトリプトファン 100 やリジン 101 に光アフェニティラベル化法などの方法でダンシル基やフルオレセインなどの環境応答性蛍光色素を導入することにより糖の結合を蛍光強度と波長の変化で検出することに成功している [32-35] (Figure 6)。**Con A** の糖結合部位近くに修飾されたこれらの蛍光色素は疎水的な相互作用によって **Con A** の中に入り込むが、より強く結合する **Glu** 分子が接近すると色素は置換されて **Con A** 外（水溶液中）に追い出されるため蛍光特性が変化することを利用して検出する。また、これらの反応では同時に消光試薬を用いることで大きな蛍光変化が得られ目視による検出が可能となる [33]。しかし、**Con A** は単糖類の検出よりも、むしろ他種のレクチン（**WGA**, **GSL-2**, **AAL**, **UEA-1**, **GSL-1**）と組み合わせることによって、糖鎖認識特性を利用した細胞およびウイルス（**AISS**, **influenza**, **E-coli**, **O-157 etc**）の検出に用いられる傾向がある [32, 33]。

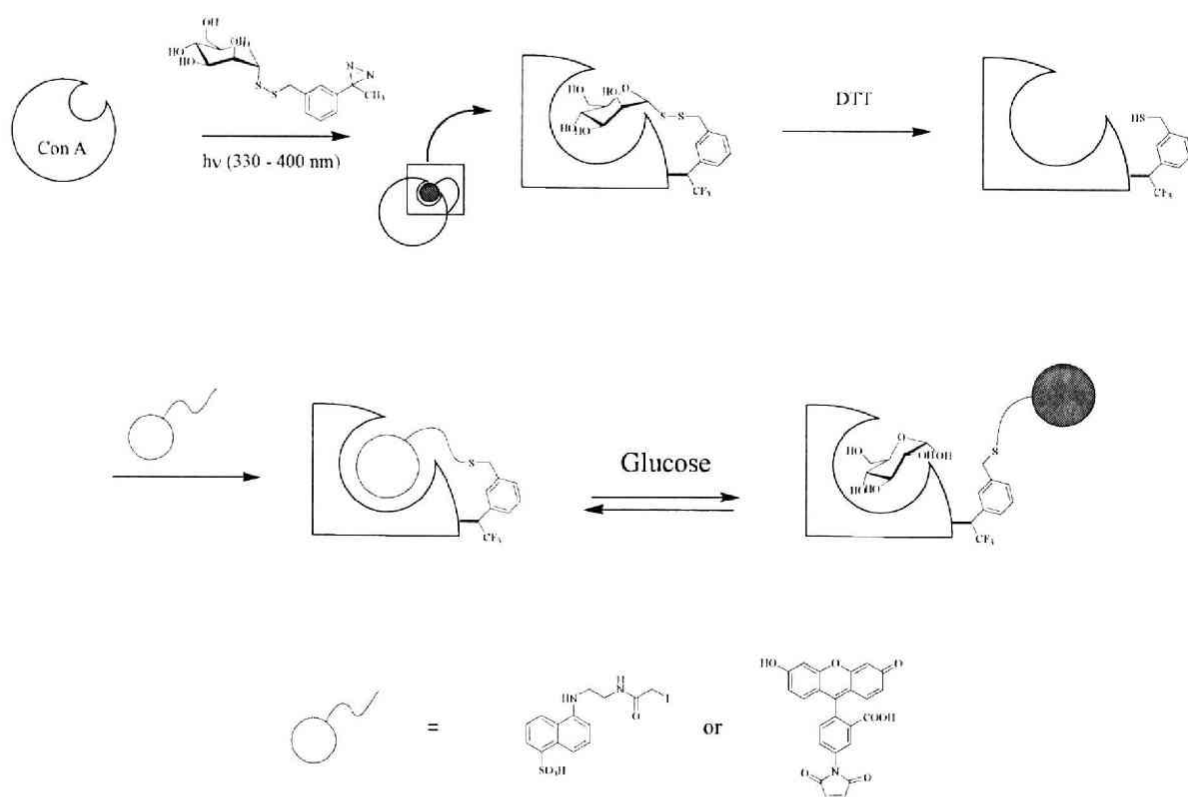


Figure 6. Detection of sugar by Con A.

しかし、これらの蛍光色素の **Con A** への修飾は複雑な化学反応が必要でありタンパク質の変性に伴う活性低下の危険性があるためできるだけ避けるべきである。そこで、著者は **Con A** と糖ポリマーの特異的な結合を利用することにより、簡便な操作や最低限の修飾反応での **Glu** の検出系の確立を目指した。

初めに、**Con A** と糖ポリマーを用いた交互累積膜を作製し糖類に対する応答性を調査した。次に、環境応答性の蛍光色素を修飾した **Con A** と糖鎖の形成する複合体を利用した **Glu** の蛍光検出を検討した。最後に、この複合体をマイクロカプセルに封入することによりくり返し利用の可能性を検討した。

2-1 緒言

交互累積膜法は薄膜作製方法のひとつで、適当な基板をポリカチオンとポリアニオンの溶液に交互にひたすことにより静電的相互作用によって基板表面にナノメートルレベルの多層膜を作製することができる[36-39] (Figure 7)。多層膜形成の駆動力として静電的相互作用の他にも抗原-抗体結合[40]やアビジン-ビオチン結合[41]などの生物学的な親和性およびポリメタクリル酸-ポリビニルピロリドン間に見られる水素結合[42]などの弱い結合を利用することもできる。この方法は、薄膜を構成する材料を自由に選択できることや特殊な技術や装置を必要としないことなどの利点があるため幅広い分野で用いられている。このようにして、合成高分子[43, 44]、タンパク質[45-47]、DNA[48-50]、ナノ微粒子[51-54]などさまざまな材料から交互累積膜が調製され、光学および電気化学センサーの表面修飾[55-59]、選択透過性を利用した分離精製[60-62]、タンパク質ナノアーキテクチャーの構築[63-66]およびカプセル作成と放出制御[67-72]などの機能性薄膜の開発に利用されている。

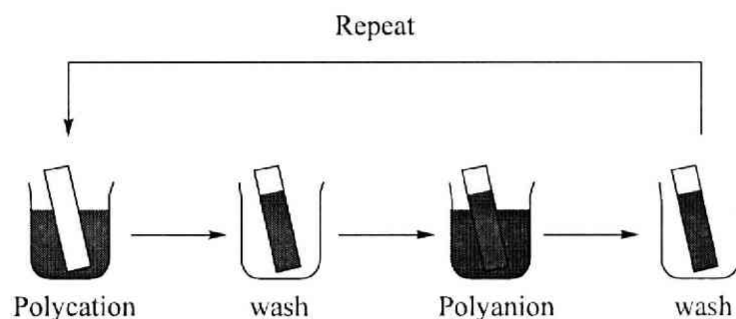


Figure 7. An experimental procedure of layer-by-layer deposition of thin films.

そこで、著者は **Con A** とグリコーゲン (**Gly**) により糖の刺激に応答して分解する累積膜の作製を試みた。**Gly** は **Glu** ユニットが連なった糖鎖であり **Con A** と特異的に結合し凝集することが知られている[73]。すでに、著者が所属する研究室では酵素やアビジンなどの糖タンパク質と **Con A** との特異的結合を利用した交互累積膜を調製し報告している[74-77]。特に、**GOD** をこの方法で電極上に固定化した場合は **Glu** の応答電流が得られるためグルコースセンサーの作製に成功している。このため、**Con A-Gly** 結合からも交互累積膜を作製することができると考えた。

さらに、この結合は可逆的であることから、この累積膜に **Glu** を添加することによって累積膜内部で **Con A** と結合している **Gly** が **Glu** と置換するため、**Con A-Gly** 結合が切断され累積膜が **Figure 8** のように分解すると期待できる。

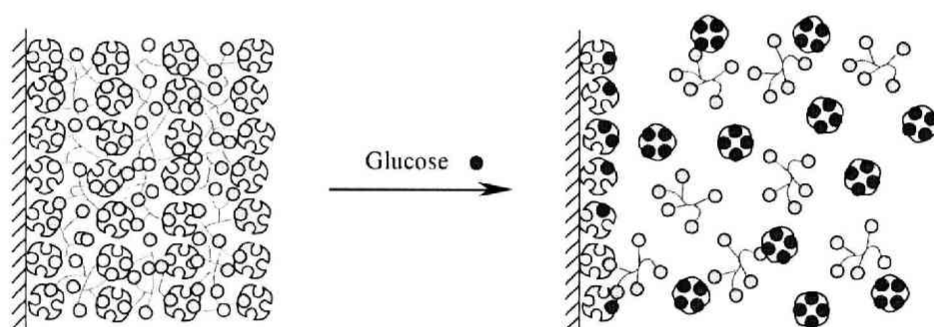


Figure 8. A schematic illustration of sugar-induced disintegration of **Con A**/sugar-polymer multilayer assembly.

本研究では、初めに **Con A** と **Gly** を用い、次にデキストラン (**Dext**) や糖が修飾された合成高分子を用いて調製した交互累積膜について調製条件や糖応答性を紫外可視分光法や水晶振動子マイクロバランス (**QCM**) 法から詳細に検討した。また、これらの累積膜を用いた **Glu** 検出の応用例として、電気化学的マーカーであ

る **Fc** を化学的に修飾した **Gly** (**FcGly**) を合成し、**FcGly** と **Con A** の累積膜を使って糖の電気化学的検出を試みた。電極表面に被覆された **Con A/FcGly** 累積膜は **Glu** によって分解し **FcGly** が電極上から脱離することに伴い **Fc** の応答電流が減少することを利用して **Glu** を検出する。

2 - 2 実験方法

試薬

Con A (フナコシ)、**Gly** (東京化成)、**Dext** (東京化成)、糖修飾ポリマー (**PV-MA**、**PV-MEA**、**PV-G**) (和光)、その他の試薬類は市販品をそのまま使用した。緩衝液は **Tris-HCl** 緩衝液 (0.1 M、pH 7.4、1 mM MnCl_2 と 1 M CaCl_2 を含む) を使用した。**フェロセン** (**Fc**) を修飾した **Gly** (**FcGly**) は Figure 10 のようにして合成した。まず、エチレンジアミン (2.5 mL) とフェロセンアルデヒド (0.8 g) をメタノール (60 mL) に溶解し 2 時間室温でかく拌した。その後、反応溶液を氷冷しながら NaBH_4 (0.3 g) 加えてシッフ塩基を還元して化合物 **1** を合成した。次に、**Gly** (0.1 g) と NaIO_4 (13.2 mg) を蒸留水 (100 mL) に溶解し 2 時間かく拌した。この溶液に化合物 **1** (63.7 mg) と NaCNBH_3 (20 mg) およびリン酸緩衝液 (20 mL、0.5 M、pH 5.0) を加えさらに 24 時間反応させた、フェロセン修飾グリコーゲン (**FcGly**) を合成した。**FcGly** は蒸留水で 2 日間透析することにより精製した。化合物 **1** のモル吸収係数 ($4,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 250 nm) から **Fc** の修飾率を計算すると 4.3 % (**Glu** 単位に対しての **Fc** のモル修飾率) であった。

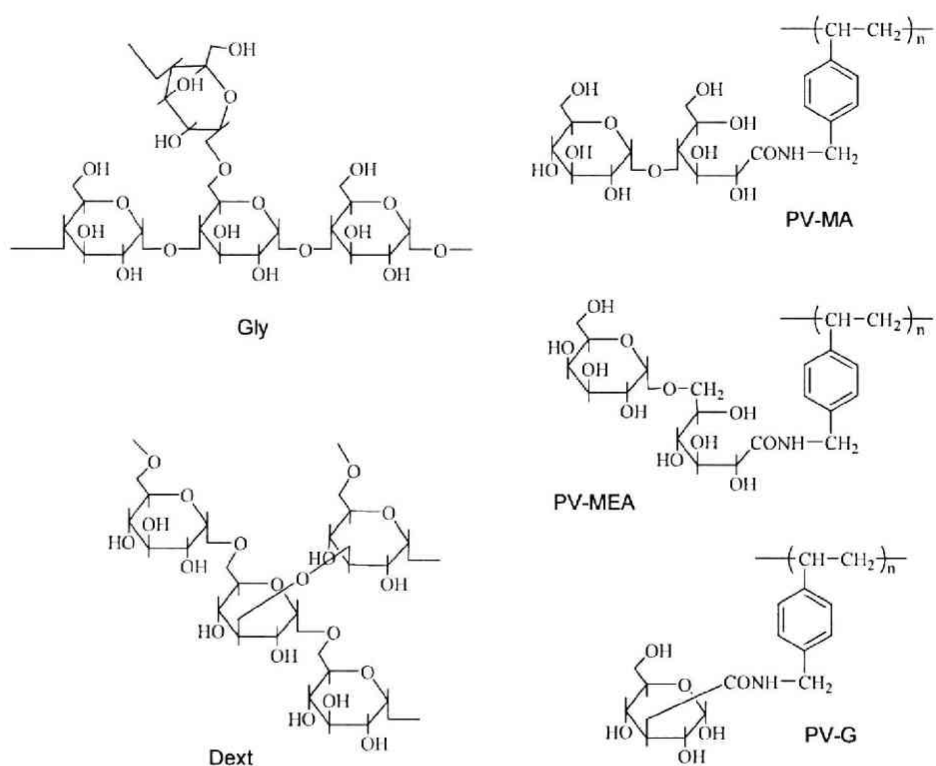


Figure 9. The chemical structures of sugar-bearing polymers.

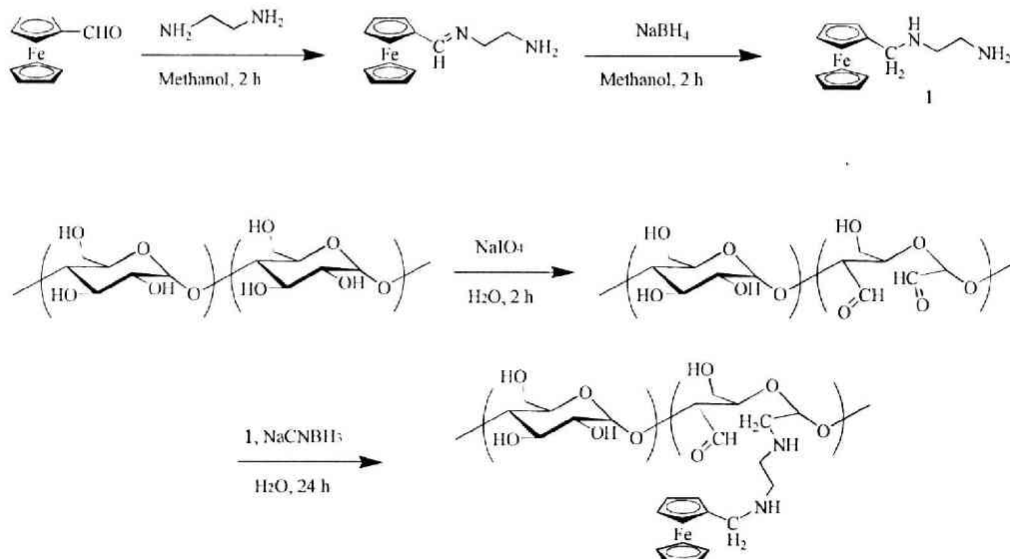


Figure 10. A synthetic scheme for the ferrocene modified glycogen.

装置

紫外可視吸収スペクトルの測定は UV-3100PC 分光光度計（島津）で行った。電気化学測定（サイクリックボルタンメトリー:CV）は ALS model 660B（BAS）を使用し、作用電極（WE）にグラッシーカーボン電極、参照電極（RE）に Ag/AgCl（3 M KCl）および対極（CE）に白金線を用いた三電極系で測定した。交互累積膜の評価は 440EQCM（BAS）を用い水晶振動子マイクロバランス（QCM）法にて評価した。使用した水晶振動子は面積が 0.196 cm^2 の金薄膜を被覆した水晶振動子を使用した。本振動子は 1 Hz の共振周波数の減少に対し 1.34 ng の物質の吸着量を示す（Figure 11）。

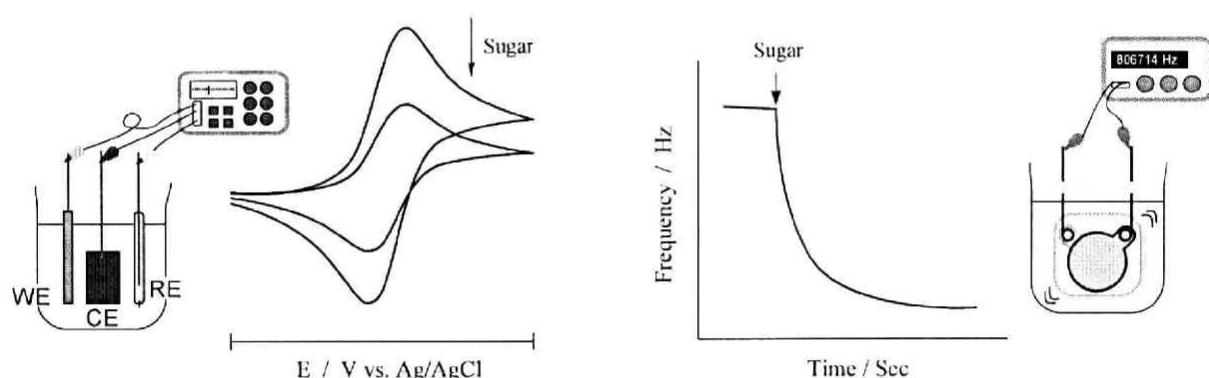


Figure 11. An apparatus of the measurement of CV (left) and QCM (right).

Con A と糖ポリマーの累積膜の作製方法

Con A と糖ポリマーの交互累積膜は以下の方法で作製した。まず、累積膜を作製

する基板を **Con A** 溶液 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) に 30 分間ひたして 1 層目の **Con A** を吸着させた後、蒸留水に 5 分間ひたすことにより弱く結合した **Con A** を洗浄した。次に糖ポリマーの溶液 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) にひたして表面に吸着させ、同様に蒸留水に 5 分間ひたすことにより弱く結合した糖ポリマーを洗浄した。この操作をくり返し行うことにより **Con A**-糖ポリマーの交互累積膜を積層した。薄膜を積層する基板として石英板 ($5 \times 1 \times 0.1 \text{ cm}$)、**QCM** 測定用の金被覆水晶振動子およびグラッシーカーボン電極を使用した。石英板は、加熱乾燥後にジクロロジメチルシラン (脱水トルエンの 10 % 溶液) に 12 時間ひたして表面を疎水化した。また、グラッシーカーボン電極はアルミナで研磨し表面を清浄化した。全ての実験は室温 (およそ 20°C) で行った。

2-3 結果と考察

Con A と **Gly** を使用した累積膜の調製と糖による分解

Con A と **Gly** の結合を利用した累積膜はすでに Y. Lvov らによって報告され、**QCM** 法による重量分析法によって詳細に調査されている (これらの報告では糖による累積膜の分解特性は検討していない) [78, 79]。そこで、著者は石英基板上に **Con A** と **Gly** の累積膜を作製し分光学的手法から調査した。

Figure 12a は **Con A** と **Gly** の溶液に石英基板をくり返しひたしたときの各操作後の吸収スペクトルである。**Con A** 由来の 280 nm の吸収が積層操作ごとに増加していることから、分光学的手法からも **Con A**/**Gly** 累積膜の形成が確認できた。また、このとき **Con A** 溶液中に 10 mM の **Glu** を共存させて同様に積層操作した場合は 280 nm の吸収は増加することはない累積膜は形成しなかった (Figure 12b)。こ

これは、**Con A** の糖結合部位が溶液中の **Glu** によって占領されているために **Con A-Gly** 結合を形成できないためである。この結果は、**Con A/Gly** 累積膜形成の駆動力が疎水的吸着などの非特異的な吸着ではなく、**Con A** と **Gly** の間の糖-レクチン結合によるものであることを示している（一層目の石英板と **Con A** は疎水的相互作用で吸着している）。

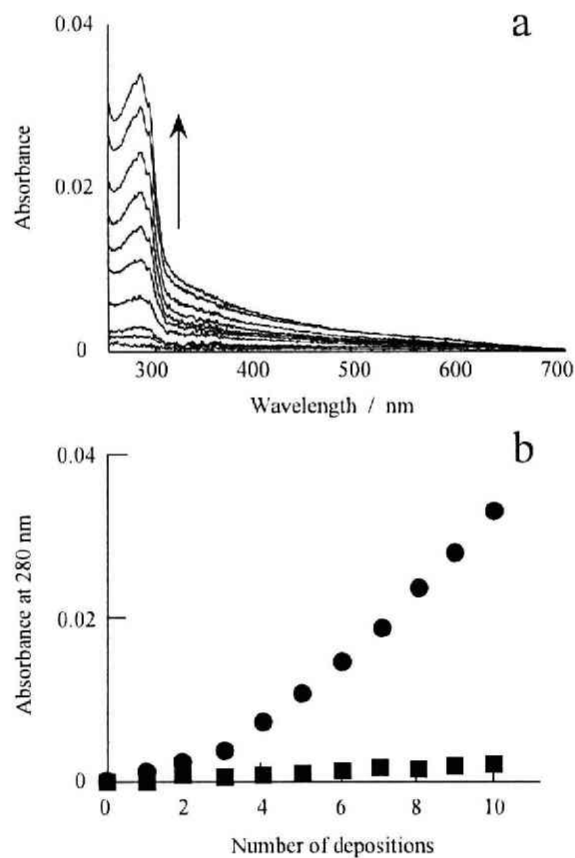


Figure 12. UV-visible absorption spectra of Con A-Gly multilayer films on surface of quartz slide (a). Absorbance of films at 280 nm as a function of the number of depositions (●), and plot ■ is the data for the film prepared using a Con A solution containing 10 mM D-glucose.

積層操作ごとの **Con A** 吸着量の吸光度 280 nm の傾きから **Con A/Gly** 膜中の **Con**

A の固定化量を計算した (Figure 12b)。Con A のモル吸光係数 ($\epsilon = 1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 280 nm) をもとに計算すると固定化量は 1 層あたり平均 $1.4 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ であった。もし、Con A が隙間なく単分子層を形成したとすると、Con A の分子サイズは $8.4 \times 7.8 \times 4.0 \text{ nm}$ [1]であるため固定化量は $0.5 \sim 1.1 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2} \text{ layer}^{-1}$ となる。これらの数値を比較すると Con A の累積膜中の固定化量は単分子層を形成した場合よりもわずかに多いことがわかる。この理由として、Gly はランダムに枝分かれた構造であることから累積膜表面から飛び出している Gly 鎖も存在し、そこへ Con A が立体的に吸着しているためと考えられる。

Con A/Gly の累積膜の安定性を評価した。まず、Con A/Gly 累積膜を大過剰量の緩衝溶液中 (pH 6, 7, 8, ca. 20 °C) に 3 時間ひたしたときの 280 nm の吸光度の変化を調査した (Figure 13)。Glu 添加前の Con A/Gly 累積膜の吸光度を 100 % として評価した。Con A/Gly 膜を pH 7 および pH 8 の緩衝液にひたした場合の吸光度はほとんど変化なく、これらの中性～弱アルカリ性では安定な累積膜であることが分かる。しかし、pH 6 の溶液に浸した場合、280 nm の吸光度は 3 時間で約 20 % の減少が見られ累積膜からの Con A の脱離が確認された。Con A は pH 5～6.7 より高い pH では 4 量体を形成しているが、これより低い pH では 2 量体となることが報告されている[80]。このため pH 6 の緩衝液中では Con A は 2 量体で存在していると考えられ、Con A 分子の結合点が 4 から 2 へと半減することにより Gly との結合力が低下するため累積膜から脱離してしまったと考えられる。

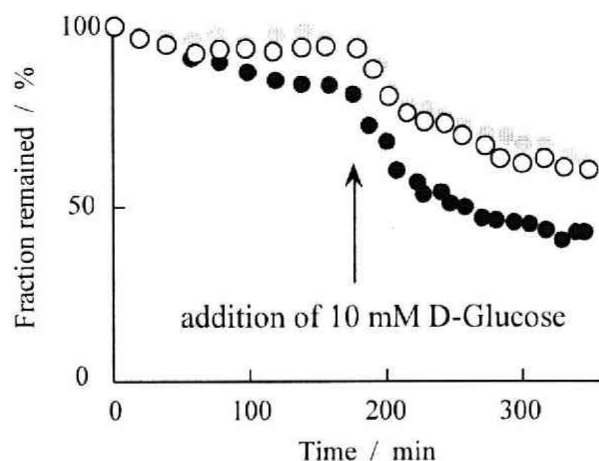


Figure 13. Disintegration of the Con A-Glycogen multilayer film (10 bilayers) in the presence of 10 mM D-glucose at pH 6(●), 7(○), and 8(◐).

次に、Con A/Gly 累積膜の Glu 応答性を調査した。緩衝溶液に累積膜を 3 時間ひたした後に 10 mM となるように Glu を添加すると、すべての緩衝溶液中で累積膜の 280 nm の吸光が減少した (Figure 13)。これは、Con A/Gly 累積膜が Figure 8 のように Glu によって分解していることを示している。つまり、添加された Glu は Con A 累積膜の糖結合部位ですでに結合している Gly と置換し、その結果、累積膜形成の駆動力である Con A-Gly 結合が切断されるため累積膜が分解したと考えられる。そこで、この累積膜の分解応答が Con A と糖の親和性に基づいていることを確認するために糖種の差異による Con A/Gly 累積膜の分解特性を調査した。Figure 15 は Con A/Gly 累積膜をそれぞれの糖を含む緩衝溶液にひたしときの 280 nm の吸光度変化を示している。グルコース (Glu)、マンノース (Man)、メチル α -D-グルコピラノシド (Me- α -Glu)、メチル α -D-マンノピラノシド (Me- α -Man)、ガラクトース (Gal) の 5 種類の糖について調査した。

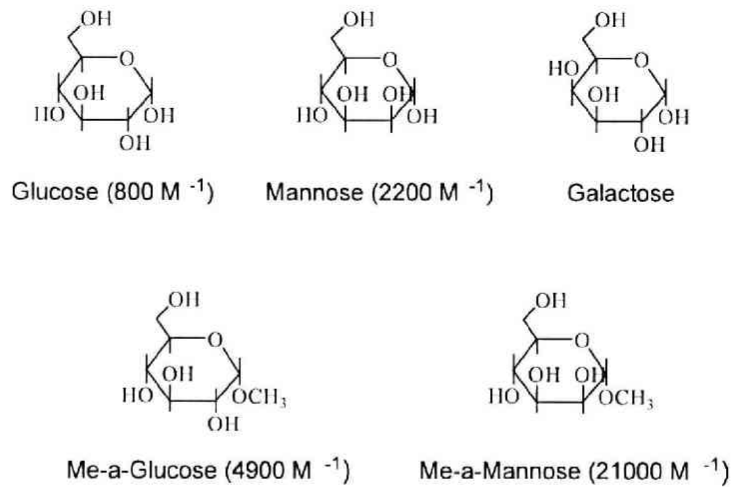


Figure 14. The chemical structures of sugars used.

Con A/Gly 累積膜の分解は Gal を除いたすべての糖類で見られ、これらの分解速度は Con A と糖類との親和性の強さに依存していた。すなわち、Me-a-Man と Me-a-Glu は1位がメチル化されているため Con A と非常に高い親和性をもつことから添加後の10分間でほぼ完全に分解した (Me-a-Man と Me-a-Glu の結合定数はそれぞれ $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $4.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ [81])。また、Man も Glu より高い親和性をもつため Gly とよく置換することが推測でき、Glu の場合よりも速く累積膜は分解した (Man と Glu の結合定数はそれぞれ $2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $0.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ [82])。一方、Con A/Gly 累積膜は Gal ではほとんど分解しなかった。この理由として、Con A は Man 結合型レクチンであるため Gal とほとんど結合せず Con A-Gly 結合に影響しなかったと考えられる [83]。これらの結果は、明らかに Con A と糖の親和性の程度に依存して Con A/Gly 累積膜が分解していることを示している。

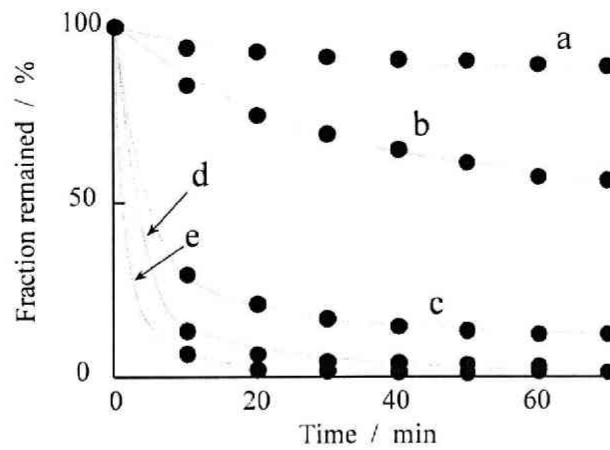


Figure 15. Disintegration of the Con A-glycogen multilayer film (10 bilayers) in the presence of 10 mM D-galactose (a), D-glucose (b), D-mannose (c), Me-a-Glu (d), and Me-a-Man (e) at pH 7.4.

Figure 16 は **Con A/Gly** 累積膜の糖の種類と濃度の差異に応じた分解特性を示している。検証したすべての種類の糖類 (**Glu**、**Man**、**Me-a-Glu**、**Me-a-Man**) を高濃度にすると累積膜は完全に分解する。例えば、**Glu** では 50 mM で、**Man** と **Me-a-Glu** でも 20 mM で完全に累積膜が分解し、最も結合力の強い **Me-a-Man** では 2 mM で完全に分解した。

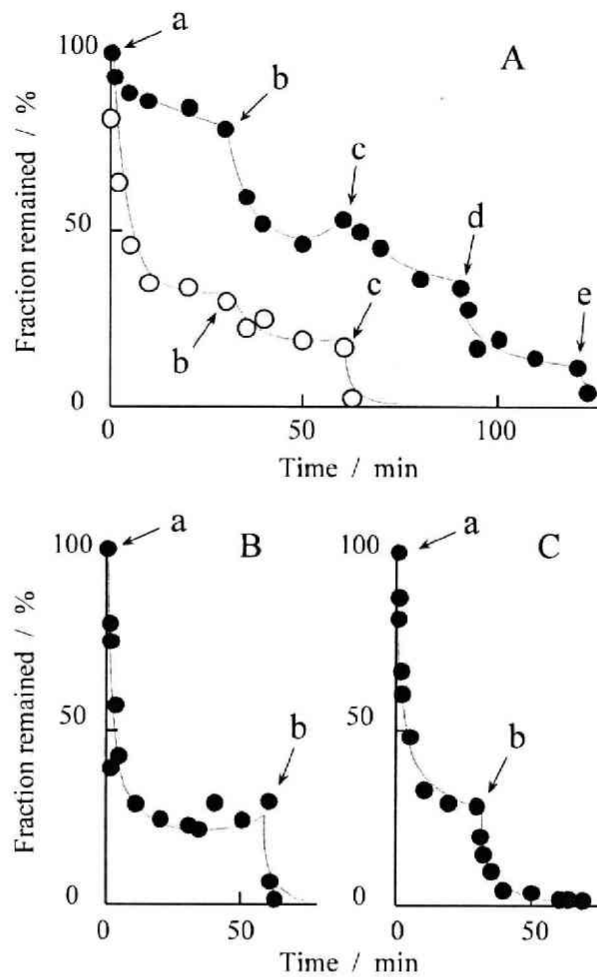


Figure 16. Effects of the concentration of D-glucose (● in panel A), D-mannose (○ in panel A), Me-α-Glu (panel B), and Me-α-Man (panel C) on the rate of disintegration of the Con A-glycogen multilayer film (10 bilayers). The concentration of the sugar was follows: (panel A)(a) 5 mM. (b) 10 mM, (c) 20 mM, (d) 50 mM, and (e) 100 mM; (panel B) (a) 5 mM and (b) 20 mM; (panel C) (a) 1 mM and (b) 2 mM.

Con A と Dext および合成糖ポリマー交互累積膜の調製と糖応答性

先に検討した Gly にかわり、天然糖鎖であるデキストラン (Dext) および 3 種

類の合成ポリマー（PV-MA、PV-MEA、PV-G）について同様に Con A との累積膜調製の検討を行った。これらの糖ポリマーを用いて Con A と積層操作を行ったところ Glu が修飾されている PV-MA でのみ薄膜の形成が紫外可視分光法および QCM 法から確認できた。しかし、他の 3 種類（Dext、PV-MEA、PV-G）の糖ポリマーを用いた場合は累積膜を調製することができなかった。一般的に、Con A が Man や Glu と結合する場合は 3 位と 4 位の水酸基の立体配置が重要であることが知られている [83]。PV-MEA は修飾されている糖は Gal であるため、また、PV-G は Glu を有しているが 3 位に水酸基が存在しないために Con A と結合することができない。また、Dext は Gly と同様にグルコースユニットから構成されるため親和性を持つと考えられるが、主鎖や分岐位置および分子の形状の違いから累積膜を形成する程度の結合力を持たないことが推測できる（Gly は主鎖が α -1,4 結合であり α -1,6 結合で分岐している。Dext は主鎖が α -1,6 結合であり α -1,3 結合で分岐している Figure 9）。

Con A/PV-MA 累積膜について固定化量の検討を行った。累積膜中の Con A 固定化量は Con A/Gly 累積膜の場合と同様にして計算したところ $0.5 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ であり、この値は Gly を用いた場合 ($1.4 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$) に比べるとおよそ 35% 程度である。この吸着量の違いは PV-MA と Gly の分子構造の違いに由来していると考えられ、直鎖状の PV-MA は Gly に比べて平滑な薄膜表面を形成し Con A は平面的に吸着するために固定化量が減少したと考えられる。

緩衝溶液中の Con A/PV-MA 累積膜の安定性も Con A/Gly 累積膜の場合と同様に調査したところ Con A が 2 量体を形成する領域 (pH 6) では 3 時間で約 30% 分解したが、中性付近の pH 7, 8 で安定であることを確認した (Figure 17)。また、緩衝溶液中に累積膜を 3 時間浸した後に Glu を添加したところ吸光度の減少がみられ、Glu の作用による累積膜からの Con A の脱離を確認した。

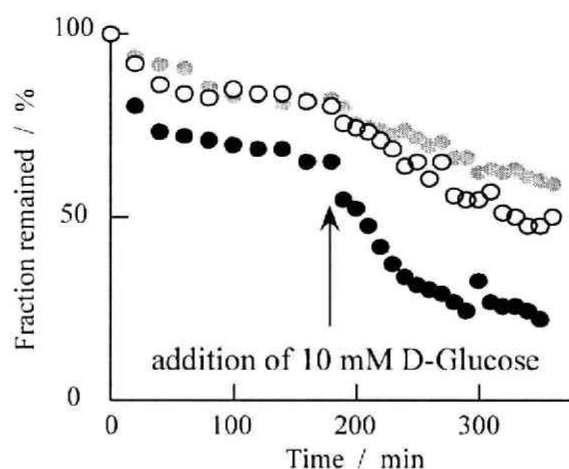


Figure 17. Disintegration of the Con A/PV-MA multilayer film (5 bilayers) in the presence of 10 mM D-glucose at pH 6(●), 7(○), and 8(○).

そこで、Con A/PV-MA 累積膜の糖応答性を紫外可視分光法 (Figure 18) および QCM 法 (Figure 19) によって検討した。どちらの検討方法でも大きな差は見られず Con A/PV-MA 累積膜の糖類による分解特性も Con A/Gly 累積膜の場合とほぼ同等であり Con A と加えられた糖類との親和性に依存した応答性を示した。QCM 法により検討し場合では、これまでの結果と比較するとわずかに分解速度が遅くなる場合もあるが、これは測定法の違いによるものである。

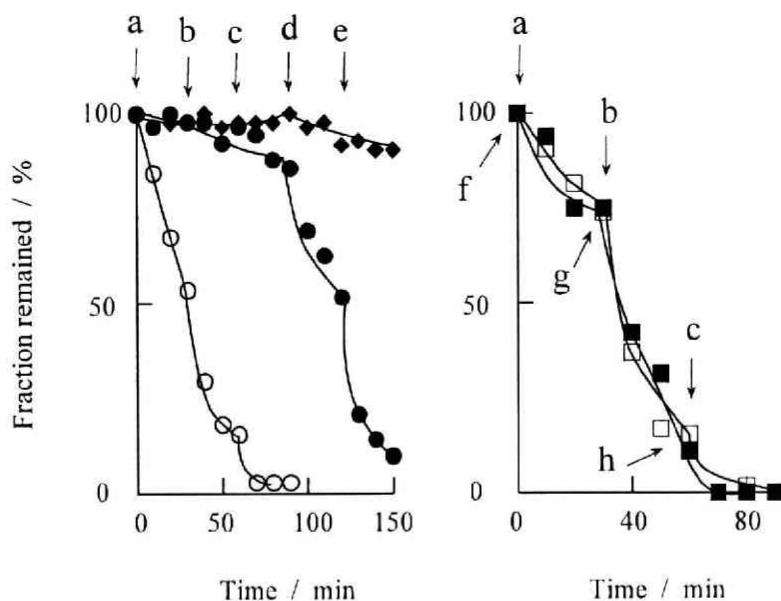


Figure 18. Effects of the concentration D-galactose (◆), D-glucose (●), Me- α -Glu (○), D-mannose (■), and Me- α -Man (□) on the rate of disintegration of Con A/PV-MA film (5 bilayers). The concentration of the sugar was as follow: (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 50, (e) 100, (f) 1, (g) 2, and (h) 3 mM.

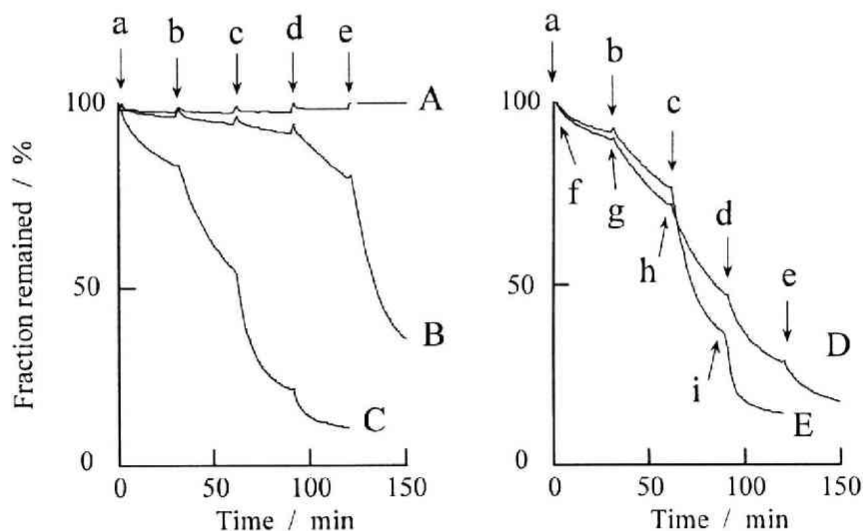


Figure 19. Sugar-induced disintegration of the Con A/PV-MA multilayer film (5 bilayers) monitored by a quartz crystal-microbalance. The sugars were used D-galactose (A), D-glucose (B), Me- α -Glu (C), D-mannose (D), and Me- α -Man (E). The concentration of the sugar was as follows: (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 50, (e) 100, (f) 1, (g) 2, (h) 3 and (i) 5 mM.

Con A/FcGly 累積膜を使用した糖の電気化学的検出

これまでの研究によって、**Con A** が **Gly** と累積膜を形成することを明らかにした。そこで、**Gly** に電気化学的なマーカーであるフェロセン (**Fc**) を化学的に修飾して電気化学的な **Glu** の検出を試みた。**Fc** は鉄 (II) イオンにシクロペンタジエニルアニオンが上下に 2 残基配位結合した構造で、きわめて安定な酸化還元特性を示すため、**Fe(III)/Fe(II)** のレドックス電位はサイクリックボルタンメトリー (CV) 測定の際に基準として用いられる。

初めに、**Fc** を修飾した **Gly** でも累積膜が調製可能であることを QCM 法により調べた。Figure 20 は積層操作ごとの周波数変化を示し、操作ごとに周波数の減少が見られ累積膜の調製が確認できた。このときの **Con A** の吸着量は $220 \text{ ng layer}^{-1}$ ($1.1 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$)であり、未修飾 **Gly** の場合 ($1.4 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$)にくらべてわずかに少ない。**Gly** への **Fc** の修飾により **Con A** が結合できる部位が減少していることと **Fc** により立体的に込み合うため **Con A** が結合しにくくなったためと推測できる。一方、**FcGly** は $375 \text{ ng layer}^{-1}$ の吸着が見られた。フェロセンの修飾率 4.3%を考慮するとおよそ 16 ng layer^{-1} の **Fc** が吸着していると計算できる。

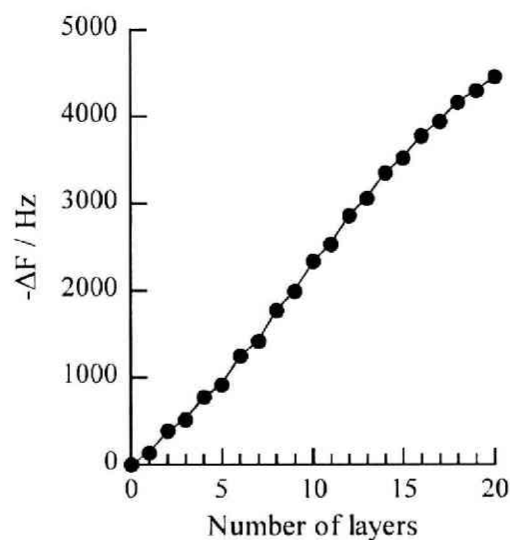


Figure 20. QCM frequency changes during formation of multilayer film from Con A and ferrocene-modified glycogen. The odd layer numbers correspond to deposition of Con A and the even number to deposition of FcGly.

Figure 21 は Con A/FcGly 累積膜の積層操作ごとの CV を示している。およそ 0.34 V 付近に見られる Fc の酸化還元ピークが積層数ごとに増加していることから電極上への累積膜の形成が確認できる。また、積層数が 1〜3 の累積膜では酸化および還元ピーク電位が一致しており電極上に固定化された Fc の特徴的な CV 形を示した [84, 85]。また、Con A/FcGly 累積膜の CV から電荷量 (Q) を求め (Figure 22) 累積膜中に固定化された Fc 量を計算した。

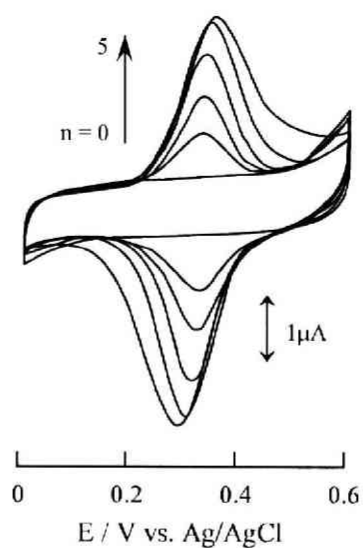


Figure 21. Cyclic voltammograms of (Con A/FcGly) n film-coated electrodes in 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (pH 7.4) at a scan rate of 100 mVs $^{-1}$

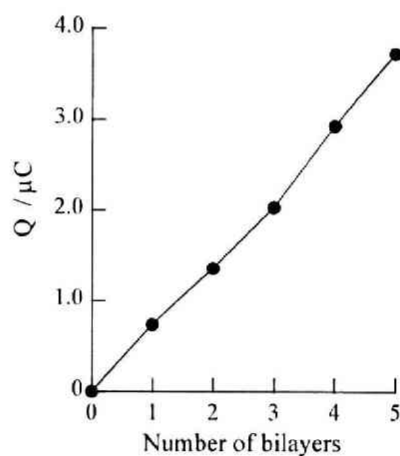


Figure 22. Q values of CV for (Con A/FcGly) n film-coated electrodes in 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (pH 7.4). The scan rate was 100 mV s $^{-1}$.

QCM 法により累積膜の重量変化から計算した Fc の固定化量と CV での電荷量 (Q) から計算した Fc の固定化量の比較を Table 1.に示す。すべての層について CV から導かれる Fc の固定化量は QCM 法の 1/4 ほどである。また、QCM 法から計算された値は 1 層当たり平均で $4.8 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ であり、CV からの値は $1.1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ であった。これは累積膜中の Fc のすべては電極反応をせず、電気化学的活性を持たないことを示している。おそらく、累積膜中で Fc が存在する環境に差異がありこれらの Fc は電極との電子移動が難しい状態になっているものと考えられる。このような現象は Fc を修飾した高分子で作製した交互累積膜によく見られることであり、たとえば、Fc-polyamine/PVS 累積膜や Fc-polyamine/DNA 累積膜などでも報告されている [86, 87]。

Table 1. Loading of Fc in each layer in the Con A/FcGly film

Bilayer number	Loading of Fc residues in each layer / $10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$		
	from CV ^a	from QCM ^b	CV/QCM ^c
1	1.1	4.0	0.28
2	0.9	4.1	0.22
3	1.0	5.1	0.20
4	1.3	5.5	0.24
5	1.2	5.4	0.22

^a Obtained from Q values. ^b Obtained from data in Figure 22. ^c Ratio of loading obtained from CV to that obtained from QCM.

次に Con A/FcGly 累積膜の糖応答性を検討した。この累積膜も前述の Con A/Gly 累積膜と同様に糖の作用により分解すると考えられ、この分解に伴い電極上に固定化された FcGly が電極上から脱離することによるピーク電流値の減少が期待できる。実際に、電極上の 3 層 Con A/FcGly 累積膜に 100 mM Glu 添加前後の CV を Figure 23a に示す。Glu 添加前は Fc のピーク電流値は 0.34 V に 2.3 μ A を示してい

るが、Glu を添加することで $1.1 \mu\text{A}$ まで減少した。同様に、電極上の 5 層 Con A/FcGly 累積膜でも Glu によるピーク電流値の減少が見られた (Figure 23b)。これらのことから、この累積膜によって Glu を電気化学的に検出できることが示唆された。

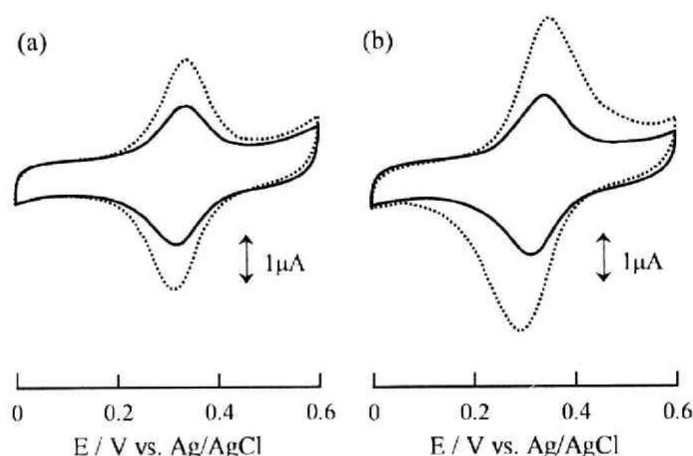


Figure 23. Cyclic voltammograms of (Con A/FcGly)₃ (a) and (Con A/FcGly)₅ films (b) in the presence (solid line) and absence (dotted line) of 100 mM D-glucose. The 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (pH 7.4) was used. The scan rate was 100 mVs^{-1} .

次に糖の種類や濃度に対する電荷量 (Q) の糖応答性について調査を行った (Figure 24)。Glu、Man、Gal、Me-a-Glu、Me-a-Man の 5 種について調査した。 Q_0 と Q はそれぞれ糖添加前後の Con A/FcGly 累積膜の電荷量であり、糖応答性は Q/Q_0 で評価した。 Q/Q_0 はこれまでの累積膜と同様に Con A との親和性と糖の濃度に依存した応答性があるため糖の検出に利用できることが確認できた。しかし、糖応答による Q/Q_0 の減少が完全にゼロになることはなかった。これは一部の FcGly が電極と非特異的な吸着によって結合しているため、完全に累積膜が分解しないからである。このため、Glu は 10 mM 以下の濃度は検出することは出来なか

った。

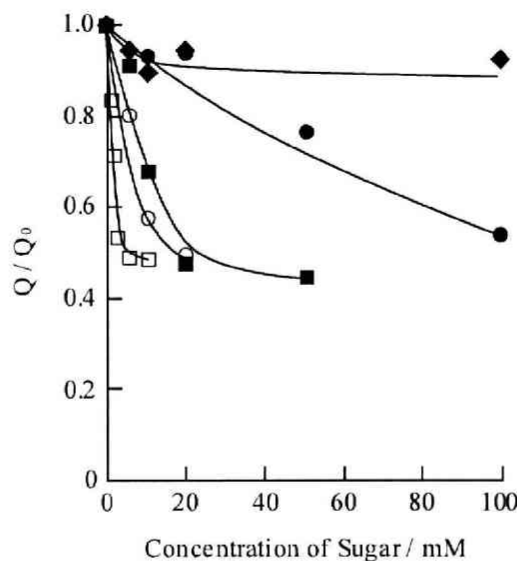


Figure 24. The response of the (Con A/Gly)₃ film-coated electrode to D-Galactose (◆), D-Glucose (●), D-mannose (■), Me-α-Glu (○), and Me-α-Man (□). The Q/Q_0 shows the relative value of the electric charge passed in the presence of sugar to that observed in the absence of sugar. Each point in the plot was obtained from a different electrode. The 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (pH 7.4) was used. The scan rate was 100 mVs⁻¹.

2 - 4 まとめ

Con A と Gly や糖ポリマーを用いて交互累積膜調製および糖類に対する応答性について検討した。初めに、Con A と Gly を石英板に交互に吸着させ紫外可視吸収スペクトルから累積膜の調製を確認した。このとき Con A 分子はほぼ単分子層を形成していた。Con A/Gly 累積膜を緩衝液に浸して Glu および Man を添加すると 280 nm の吸光度が減少し、累積膜が糖の種類や濃度に依存して分解することを確認した。

また、**Con A** を用いた累積膜は **Gly** だけでなく、糖を含有する合成ポリマーである **PV-MA** を用いても調製可能であり **Con A/Gly** 累積膜の場合と同様の糖応答性を示した。しかし、**Con A** と結合しにくい **PV-MEA**、**PV-G**、**Dext** からは累積膜を調製することができなかった。

これらの結果をもとにして、**Fc** を修飾した **Gly** を合成し電気化学的な **Glu** の検出を試みた。**FcGly** と **Con A** の累積膜をグラッシーカーボン電極上に被覆すると固定化された **Fc** に特徴的な **CV** がみられ、糖の作用で累積膜が分解することで **Fc** の電荷量も減少した。この **CV** 応答も糖の種類や濃度に依存しており、これにより糖類の電気化学的な検出ができることを確認した。

第3章 コンカナバリンA/グリコーゲン複合体の糖応答性

3-1 緒言

分光学的な糖類の検出は光信号の取り扱いが容易であり高感度なため広く研究されている[88-91]。特に優れたアプローチのひとつとして **Con A** と **Dext** が複合体を形成することにより誘起される蛍光エネルギー転移 (**FRET**: Fluorescence resonance energy transfer) を利用したものがあげられる[92-97]。**FRET** はある蛍光分子から他の分子へと励起エネルギーが移動する現象で、エネルギーを与える分子はドナー(供与体)、受け取る分子はアクセプター(受容体)と呼ばれる。**FRET** が起こるためにはドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルに重なりがあること、ドナーとアクセプターが接近 (1 nm~10 nm) して存在することが必要でありドナーとアクセプターの相対的な向きも **FRET** 効率に影響を与える。**FRET** が誘起されたときドナーの蛍光は弱まり、アクセプターが蛍光分子であればその蛍光が観察されることから、ドナーの蛍光強度とアクセプターの蛍光強度をモニタすることで **FRET** の測定が行える。

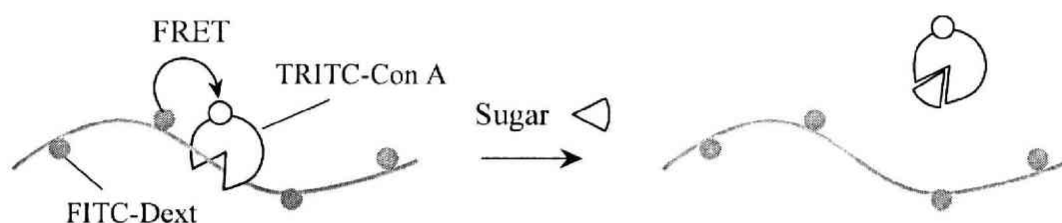


Figure 25. FRET of TRITC-Con A and FITC-Dext.

Con A と **Dext** の **FRET** を用いた糖検出の原理は以下のとおりである。ドナーと

して FITC をラベル化したデキストラン (FITC-Dext) とアクセプターとして TRITC をラベル化したコンカナバリン A (TRITC-Con A) は糖-レクチン結合により複合体を形成する。この状態では FRET が観測されるが、ここに Glu などの糖類が存在すると複合体が分解し色素間の距離が離れてしまため FRET は解消されアクセプターである TRITC の蛍光強度は減少する。この FRET の応答は糖の種類および濃度に対して鋭敏に応答するために糖類を検出することができる (Figure 25)。これら FITC や TRITC 以外の色素としてマラカイトグリーン、アロフィコシアニン、カスケードブルー、テキサスレッド、AMCA (7-amino-4-methyl-coumarin) [92, 98] などの蛍光色素やエオシンのような無蛍光性分子 (消光剤) などさまざまな組み合わせが検討され糖類の検出に利用されてきた。

しかし、糖の検出に FRET を用いる場合は必ず 2 種類以上の蛍光色素を使用し、さらに、ドナーとアクセプターである蛍光色素はそれぞれドナーの蛍光波長とアクセプターの吸光波長が重なっていることが必要であるため色素を自由に選択することができない。また、生体試料への化学修飾はタンパク質の変性などによる活性の低下の危険性があるためできるだけ避けるべきである。

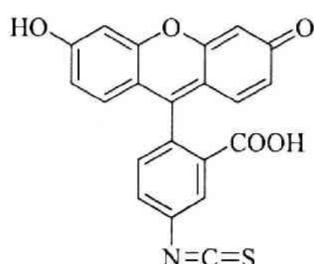


Figure 26. The chemical structure of FITC.

そこで、著者は FRET システムのこれらの欠点を改善するべく FITC-Con A と

Gly の形成する複合体を用いた糖類の蛍光検出を検討した。蛍光色素である FITC は色素の存在する環境の影響を受け蛍光強度が変化し、リボソーム内に高濃度に封入された場合[99]やタンパク質の表面への吸着や接近すること[100, 101]で消光されることが知られている。たとえば、FITC のこのような性質を応用し FITC-ビオチンを用いてアビジンの結合様式の決定に利用されている[102-104]（この時、FITC-ビオチンの蛍光強度はアビジンに結合することで 84～88 %消光される）。これらのことから FITC-Con A の複合体形成に伴う蛍光特性変化を利用することで FRET のように 2 種類の色素を用いることを避け、単一の色素のみでの糖の検出が可能と考えた。

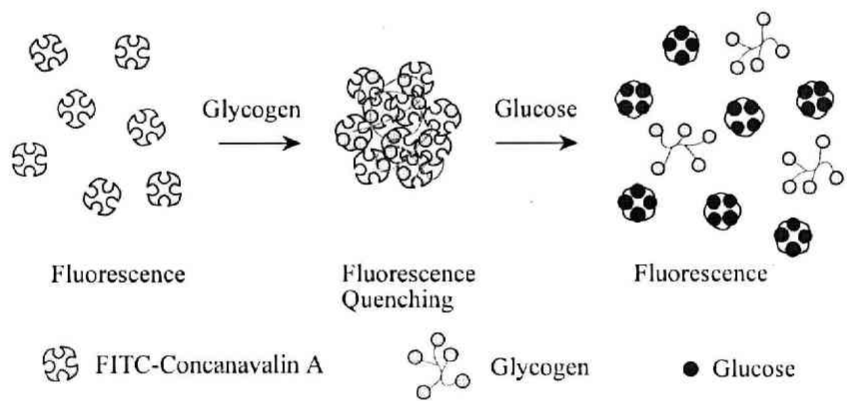


Figure 27. Formation of FITC-Con A - glycogen conjugate and its decomposition by sugar.

本研究では FITC-Con A の蛍光は Gly と複合体を形成することによって消光され、蛍光強度が減少すること、この消光作用が糖の作用による複合体の分解ですみやかに回復することを明らかにした（Figure 27）。

3 - 2 実験方法

試薬

FITC-Con A (フナコシ)、**TRITC-Con A** (フナコシ)、**Gly** (東京化成)、**Dext** (東京化成)、その他の試薬類は市販品をそのまま使用した。緩衝液はすべて **Tris-HCl** 緩衝液 (0.1 M、pH 7.4、1 mM MnCl_2 と 1 mM CaCl_2 含む) を使用した。

装置

蛍光スペクトル測定は **RF-5300PC** 分光蛍光光度計 (島津) を使用した。

FITC-Con A - Gly 複合体の調製と蛍光測定

FITC-Con A または **TRITC-Con A** と **Gly** または **Dext** 溶液を混合し 30 分間おだやかにかく拌して複合体を形成させた。この複合体溶液に糖類を加え蛍光スペクトルを測定した。**FITC-Con A** と **TRITC-Con A** はそれぞれ 488 nm と 555 nm で励起した。全ての実験は室温 (およそ 20 °C) で行った。

3 - 3 結果と考察

FITC-Con A - Gly 複合体形成による蛍光への影響

FITC の蛍光強度は色素が存在する環境の影響を受けて変化するため **FITC** を **Con A** にラベル化した **FITC-Con A** の蛍光強度も糖鎖と複合体を形成することによ

って変化すると考えられる。そこで、まず初めに **Con A** と結合することが知られている **Dext** および **Gly** によって **FITC-Con A** の蛍光強度がどのように影響を受けるかを調査した。

Figure 28A は $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ **FITC-Con A** 溶液と $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ **Dext** または **Gly** 溶液を混合後の蛍光スペクトルである。すべてのスペクトルは 488 nm と 515 nm に 2 つのバンドが見られた。488 nm の鋭いバンドは励起光の波長と正確に一致していることから励起光の散乱光であることが分かる ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ よりも高濃度溶液では散乱光の影響が大きくなり **FITC-Con A** の蛍光を測定しにくくなる)。一方、515 nm の蛍光バンドは **FITC-Con A** 由来の蛍光であるが、この蛍光強度は **Gly** の存在で明らかに減少し、これは **FITC-Con A** と **Gly** が複合体を形成したためであると考えられる。また、488 nm のバンドが大きく上昇していることから複合体の形成が示唆される (大きな複合体を形成することで散乱光は増大する [73])。この蛍光強度の減少が複合体形成による **FITC-Con A** 沈降のせいでないことを確認するために **Gly** を加える前後の **FITC-Con A** 溶液の **FITC** 由来の吸収スペクトルを測定したところ、これらは同一の吸収スペクトルを示した。このことから、蛍光強度減少の理由が複合体形成による沈降ではなく **FITC** が消光されたためであることが示唆された。しかし、**Dext** の場合は **Gly** に比べて **FITC-Con A** の蛍光強度への影響が少なく消光作用が小さい。これは **Con A** との結合能力の小さい **Dext** では **FITC** が消光するのに十分な複合体を形成することが出来ないためであり散乱光の上昇も少ないことから示唆される。

次に、**FITC-Con A** のかわり **TRITC-Con A** を使用して同様の実験をおこなったところ、**TRITC-Con A** は **Gly** を添加しても蛍光強度に影響を受けないことが明らかになった (Figure 28B)。**FITC-Con A** と **TRITC-Con A** の励起光 (それぞれ 488 nm と 555 nm) の散乱光は **Gly** の添加後に同様に増加していることから複合体の形成は確認できる。このことから、**TRITC-Con A** の蛍光強度が減少しなかった理由が明

白でないが消光作用の差異は色素の化学構造に依存していることが明らかあり、FITC-Con A は Gly と複合体を形成したため消光されたことが強く示唆された。

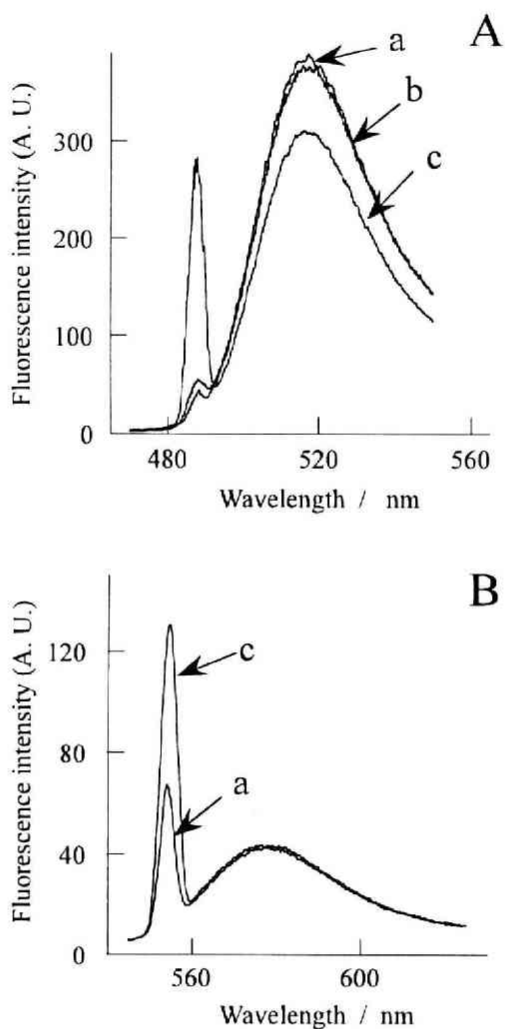


Figure 28. Fluorescence spectra of FITC-Con A (A) and Rho-Con A (B) before (a) and after addition of dextran (b) or glycogen (c). Concentrations of FITC-Con A, Rho-Con A, dextran, and glycogen are $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. FITC-Con A and TRITC-Con A were excited by 488 and 555 nm light, respectively.

Figure 29 は、 $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ の FITC-Con A 溶液に最終濃度が $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ となるように Gly または Dext を添加した後の蛍光強度の経時変化である。 I_0 と I はそれぞれ

れ Gly 添加前後の FITC-Con A の蛍光強度であり消光効果は I / I_0 で評価した。糖鎖添加後、 I / I_0 が定常状態に達するまでに 30 分以上も必要であり、Gly を添加した場合は 0.7 まで減少したが、Dext では 0.95 であった。これら消光作用に対する Gly と Dext の異なる影響はそれぞれの糖鎖構造の違いに由来していると考えられ (Figure 9)、FITC-Con A は Dext に比べて Gly とより強く結合するため消光効果が大きく現れたと示唆された。この結果からも Dext は Con A と結合して FRET を誘起することは出来るが消光作用を与えるほど強く結合できないことが推測できる。これらの理由から、以後の実験では糖鎖として Gly を用いて FITC-Con A 複合体を調製した。

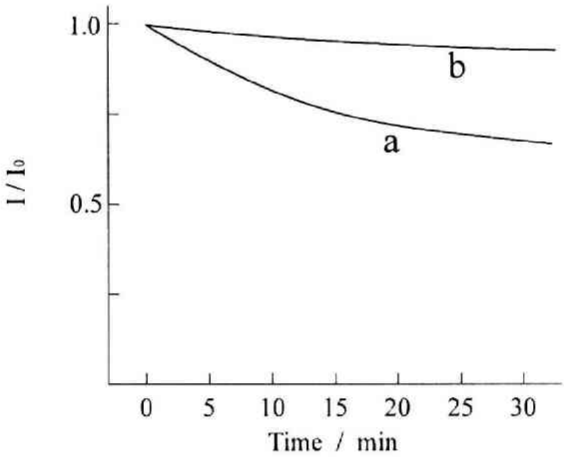


Figure 29. A time-course of changes in fluorescence intensity of $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ of FITC-Con A upon addition of $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ of glycogen (a) or dextran (b). I_0 and I denote the fluorescence intensity at 515 nm before and after addition of the polysaccharides, respectively.

FITC-Con A-Gly 複合体の糖応答性

FITC-Con A - Gly 複合体に Glu を添加すると、FITC-Con A の糖結合部位で Glu

は Gly と置換するため複合体が分解し、この結果 FITC-Con A の消光が解消されて蛍光強度が回復すると考えられる。Figure 30 は、FITC-Con A - Gly 複合体への Glu の影響を示している。2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A 溶液と 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Gly 溶液を混合して複合体を形成し、最終濃度が 0、10、20、50、100 mM となるように Glu を加えた 1 分後の蛍光スペクトルである。結果、FITC-Con A の蛍光強度は仮説のように加えられた Glu の量に依存して増加し、FITC-Con A - Gly 複合体によって Glu を検出できることが示された。

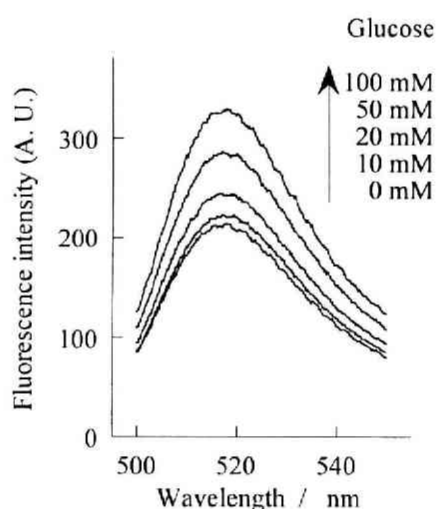


Figure 30. Effects of D-glucose on the fluorescence spectra of FITC-Con A-glycogen conjugate. The conjugate was prepared from 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A and 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ glycogen. The fluorescence spectra were recorded at one-minute after addition of glucose.

次に、FITC-Con A - Gly 複合体に Glu を加えた時の蛍光強度の経時変化を測定した (Figure 31)。FITC-Con A - Gly 複合体の分解に伴う蛍光強度の増加速度は複合体の形成反応に比べて速く、100 mM と 50 mM では Glu 添加後それぞれ 30 秒と 120

秒で最大値に達した。しかし、10 と 20 mM では 200 秒以上でも平衡には至らず Glu 濃度に大きく依存していた。Glu 検出目的では各濃度の糖添加後の蛍光強度差の大きい 60 秒後に蛍光強度を計測することにした。

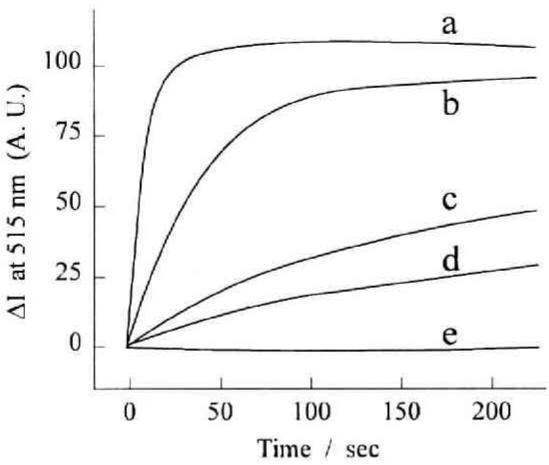


Figure 31. A time-course of changes in fluorescence intensity of FITC-Con A-Glycogen conjugate upon addition 100 (a), 50 (b), 20 (c), and 10 mM D-glucose (d). A line e shows a blank data recorded without D-glucose. The conjugate was prepared from $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A and $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ glycogen.

Figure 32 は FITC-Con A - Gly 複合体の糖の種類と濃度に対する蛍光強度回復への影響を示している。Glu、Gal、Man、Me-a-Glu、Me-a-Man の 5 種類の糖類について調査した。FITC-Con A の蛍光強度は Glu で 5～50 mM の濃度範囲に対して増加し、この濃度範囲で Glu の検出に利用できることが示された。また、蛍光強度の回復量（複合体の分解量）は第 2 章で述べた Con A/Gly 交互累積膜と同様の序列を示し、これらの応答は糖類と Con A との親和性に大きく依存していた。この結果は、FITC-Con A - Gly 複合体の蛍光応答は Con A の生物学的な特異性にもとづいた現象であり、複合体が糖の作用によって分解していることを確認した。

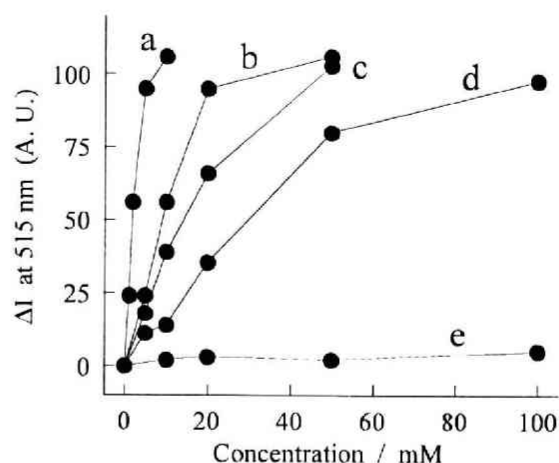


Figure 32. Effects of the type of sugars on fluorescence of FITC-Con A-glycogen conjugate. The fluorescence intensity observed at one-minute after adding Me- α -man (a), Me- α -Glu (b), D-mannose (c), D-glucose (d) and D-galactose (e) was plotted. The conjugate was prepared from $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A and $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ glycogen.

これら複合体の糖に対する反応は、Gly と Glu の競合的な平衡反応にもとづいて
 いるため FITC-Con A - Gly 複合体の濃度をコントロールすることにより Glu の感
 度と検出範囲は制御可能であると考えられる。このような理由から、FITC-Con A
 と Gly の濃度をそれぞれ 0.2 、 1.0 、 2.0 、 10 と $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ とした FITC-Con A - Gly
 複合体を調製し Glu による蛍光強度変化を測定した (Figure 33)。 $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ の
 FITC-Con A - Gly 複合体の反応は FITC-Con A が少量であるためほとんど応答がな
 いが、 $1.0 \sim 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ の FITC-Con A と Gly で調製した複合体は Glu 濃度に依存し
 た蛍光強度の増加が見られた。しかし、蛍光強度の大小はあるが糖応答性は複合
 体濃度の影響を受けることはなく Glu の感度と検出範囲は制御することができな
 かった。また、同様に複合体中の FITC-Con A と Gly の重量比を変化させて複合体
 を調製してもこれらを制御することができなかった。この理由として、Gly がラン

ダムに枝分かれした構造のため、Con A や FITC の濃度や重量比を反映し制御された複合体を再現性よく形成することが難しいためと考えられる。今後 Gly にかわるような配列を制御した糖修飾高分子をデザインすることでこれらの問題は克服することができ、目的に応じた感度や検出範囲をもつ複合体が調製できると考えられる。

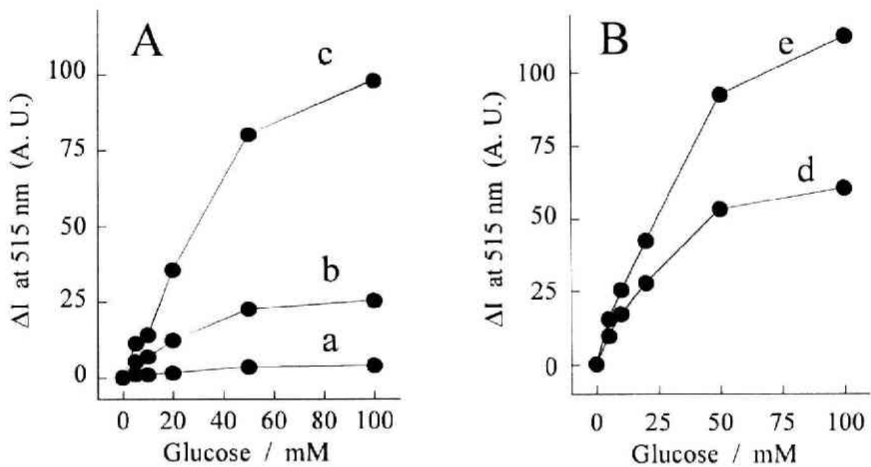


Figure 33. Effects of the concentration of FITC-Con A and glycogen from which the conjugate was prepared on the fluorescence response to D-glucose. The conjugates were prepared from 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A + 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ glycogen (a), 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A + 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ glycogen (b), 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A + 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ glycogen (c), 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A + 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ glycogen (d), and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-Con A + 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ glycogen (e).

3 - 4 まとめ

FITC-Con A は Gly と特異的な親和性によって複合体を形成することで FITC-Con A 由来の蛍光が消光されることを明らかにした。また、この FITC-Con A

- Gly 複合体は Glu によって分解し、このとき消光されていた FITC の蛍光強度は Glu の濃度依存的に回復した。このことを利用して Glu の蛍光検出ができることを確認した。この現象は単一の色素 (FITC) の蛍光強度変化にもとづいており FRET に必要な 2 種の蛍光色素の Con A および糖鎖への修飾を避けられる点で優れている。今後は、Gly にかわる構造の制御された糖鎖をデザインすることによって感度の向上や検出範囲の制御、FITC よりも環境影響を受けて特性が大きく変化する蛍光色素を用いることにより目視による検出が期待できる。

第4章 コンカナバリンA-グリコーゲン複合体を内包する

カプセルの調製と糖応答性

4-1 緒言

近年、交互累積膜法を用いたマイクロカプセルの調製方法が開発された。この方法は、初めに、ナノ～マイクロメートルサイズの球状微粒子の表面にポリカチオンとポリアニオンの高分子電解質を静電的相互作用によって1層ずつ被覆してカプセル膜を形成し、その後微粒子を適当な方法で溶解除去することによりカプセルを調製するものである (Figure 34)。カプセルの作製法は他にも界面重合法、液中乾燥法、コアセルベーション法、オリフィス法、噴霧乾燥法などさまざまあるが、この方法はカプセル作製のすべての工程を水溶液中でおこなえること、カプセル膜の材料を自由に選択できることなどの利点があり機能性マイクロカプセルの開発に広く用いられているようになった。このような理由からこれまで、さまざまな種類の機能性カプセルが開発され、酵素[105-107]や薬物[108, 109]を内包するカプセル、pHに応答するカプセル[110-112]、PBAを用いた糖刺激で分解するカプセル[113]、Glu検出カプセル [114-116]、レクチン結合性カプセル[117]など多数報告されている。

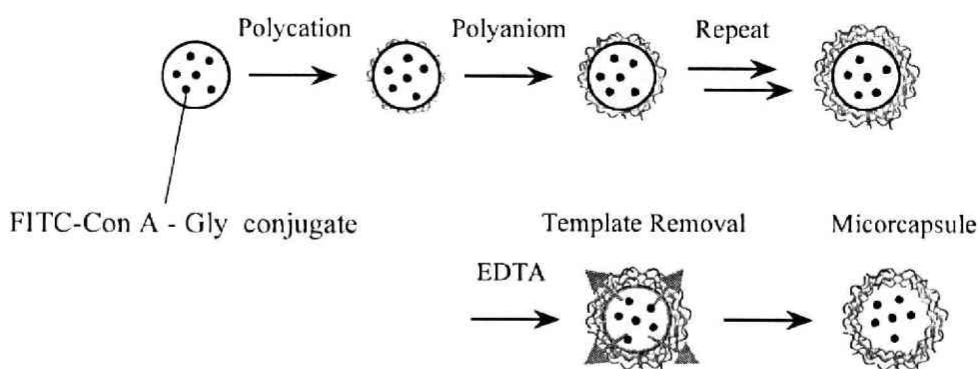


Figure 34. Preparation process of FITC-Concanavalin A - Glycogen microcapsule.

そこで、本研究では第3章で検討した **FITC-Con A - Gly** 複合体をカプセルに封入することで **Glu** 検出マイクロカプセルの調製を試みた。この複合体をカプセル化することにより **Glu** 反応後に洗浄するだけで **Glu** を取り除くことができるため、くり返しの利用が期待できる。また、**FITC-Con A - Gly** 複合体を見かけ上固体として取り扱うことができるため基板に固定化することが可能になると考えられる。

しかし、この交互累積膜を用いたカプセル調製方法は問題点が二つある。一つ目の問題点は、カプセルのテンプレートとなる芯物質を溶解するための反応に過酷な条件を必要とすることで、通常芯物質に用いられるメラミン-ホルムアルデヒド樹脂[118, 119]や二酸化ケイ素[108, 110]の微粒子はそれぞれ強酸性条件やフッ化水素によって溶解する必要がある。したがって、これらの芯物質を用いた場合は酵素や抗体などのタンパク質が変性する危険性があるため機能性を維持したままカプセルに封入することが難しい[105]。また、アルギン酸-カルシウムマイクロゲルやデキストランマイクロゲルを芯物質として使用したカプセルもあるが、交互累積膜を被覆した後も内部にこれらの高分子が残るために完全なカプセルとは言いがたい[120, 121]。二つ目の問題点は、微粒子である芯物質にカプセル膜材料を被覆してカプセルを調製するため内包させたい物質を高濃度に封入することが難しい

ことである。実際、メラニン-ホルムアルデヒド樹脂に内包させたい物質である **TRITC-Con A** と **FITC-Dext** の累積膜（**FRET** を利用した **Glu** の検出）を調製し、その後カプセル膜である **PAH/PSS** 累積膜を被覆、塩酸処理することで調製した糖応答性マイクロカプセルが報告されているが、この方法では糖の検出に必要十分量の **TRITC-Con A** と **FITC-Dext** をカプセル内に封入することができず蛍光強度変化は均一系条件と比べて極微量であった[114]。

そこで、本研究ではこれらの問題点を克服するために芯物質となる粒子に CaCO_3 を用いてカプセルを調製することにした。 CaCO_3 粒子は CaCl_2 と $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 溶液を混合することで容易にマイクロメートルサイズの粒子を形成し[107, 122]、**EDTA** を用いることで温和(**pH** 7.4)な条件で溶解させることが可能であるため生体試料のカプセル化に有効である[107, 122]。また、 CaCO_3 は形成するとき内部に物質を取り込むことから高濃度で **FITC-Con A - Gly** 複合体を封入することができると考えた[123]。この方法は、カプセルに内包させたい物質を微粒子に被覆する方法で封入した場合に比べてカプセル内への充填率が 5 倍以上大きくなると報告されている[124]。複合体を封入するカプセル膜についてはポリカチオンとして直線状の **PAH** および分岐状の **PEI** を用い、ポリアニオンとして **PSS** を用いた。このようにして調製した糖応答性カプセルは蛍光顕微鏡と走査電子顕微鏡で粒子サイズや形状を観察し、**Glu** 応答性と再利用性について蛍光強度から検討した。

4-2 実験方法

試薬

FITC-Con A（フナコシ）、**TRITC-Con A**（フナコシ）、**Gly**（東京化成）、**PSS**

(Scientific polymer products, inc)、PAH (日東紡)、PEI (ナカライテスク) その他試薬類は市販品をそのまま使用した。緩衝液はすべて Tris-HCl 緩衝液 (0.1 M、pH 7.4、1 mM MnCl_2 と 1 mM CaCl_2 含む) を使用した。PAH と PEI を TRITC でラベル化しそれぞれ TRITC-PAH と TRITC-PEI を合成した。

装置

蛍光スペクトル測定は RF-5300PC 分光蛍光光度計 (島津) を使用した。カプセルは蛍光顕微鏡 (IX70, OLYMPUS) と走査電子顕微鏡 (S-3200N, HITACHI) で観察した。

FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの調製

初めに FITC-Con A - Gly 複合体を含有する CaCO_3 粒子を調製した。FITC-Con A (200 μg) と Gly (200 μg) を緩衝液 (10 mL) に加え混合し、一時間おだやかにかく拌して複合体を形成させた。この溶液に CaCl_2 (222 mg) を溶解させ、FITC-Con A - Gly 複合体を含む CaCl_2 溶液を調製した (溶液 A)。また、PSS (40 mg) と $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (192 mg) を緩衝液 (10 mL) に溶解し溶液 B を調製した。溶液 B をかく拌しながら、溶液 A を素早く注ぎ 30 分間かく拌し CaCO_3 粒子を調製した。PSS を共存させることで綺麗な球状粒子となる。この CaCO_3 粒子を遠心分離して集め緩衝液で洗浄することによって FITC-Con A-Gly 複合体を含有する CaCO_3 粒子を得た。

次に、この CaCO_3 粒子に高分子電解質の累積膜を被覆してカプセルを調製した。 CaCO_3 粒子を PEI (2 mg mL^{-1}) 溶液に分散し 15 分間おだやかに攪拌し CaCO_3 粒子表面に PEI を吸着させた。これを遠心分離して粒子を沈め上清の PEI 溶液を除い

た後、緩衝液を加えて洗浄した。同様に PSS (2 mg mL^{-1}) 溶液に分散し、PEI との静電的相互作用により CaCO_3 粒子に吸着させた。これらの操作をくり返し行いカプセル膜を作製した。最後に、過剰量の EDTA (0.1 M , $\text{pH } 7.4$) 溶液で CaCO_3 粒子を溶解し FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルを作製した。

FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの糖応答性評価

カプセルは、 600 nm において O.D. 0.15 になるように希釈し、励起波長を 488 nm として糖を加えた 5 分後の蛍光スペクトルを測定した。

カプセルの再利用性の検討は以下のようにして行った。カプセルを使い捨てセルに分散し Glu (100 mM) を加え 5 分後の蛍光強度を測定した。次に、カプセルが分散しているセルを遠心分離し Glu を含む上清を捨て、緩衝液でカプセルを洗浄し蛍光強度を測定した。再び、Glu (100 mM) を加え蛍光強度を測定した。これらの操作をくり返し行いカプセルの再利用性の検討を行った。

4 - 3 結果と考察

FITC-Con A-Gly 複合体を内包したカプセルの調製

CaCO_3 微粒子は CaCl_2 と $(\text{NH}_4)_4\text{CO}_3$ の溶液を混合すると瞬時に形成し、このとき内部に溶液中の物質を取り込むことが知られている。そこで FITC-Con A - Gly 複合体を含む CaCl_2 溶液と $(\text{NH}_4)_4\text{CO}_3$ 溶液を混合して CaCO_3 粒子を調製し、蛍光顕微鏡および走査電子顕微鏡によって観察した (Figure 35)。どちらの観察でも球状の

微粒子の形成が確認でき平均粒子サイズは 3~5 μm ほどであった。また、蛍光顕微鏡からは FITC-Con A 由来の蛍光が確認できるため、FITC-Con A - Gly 複合体が CaCO_3 粒子内に取り込まれていることを確認した (Figure 35a)。これらのことから、このようにして調製した CaCO_3 粒子をカプセル調製のための芯物質として利用することにした。

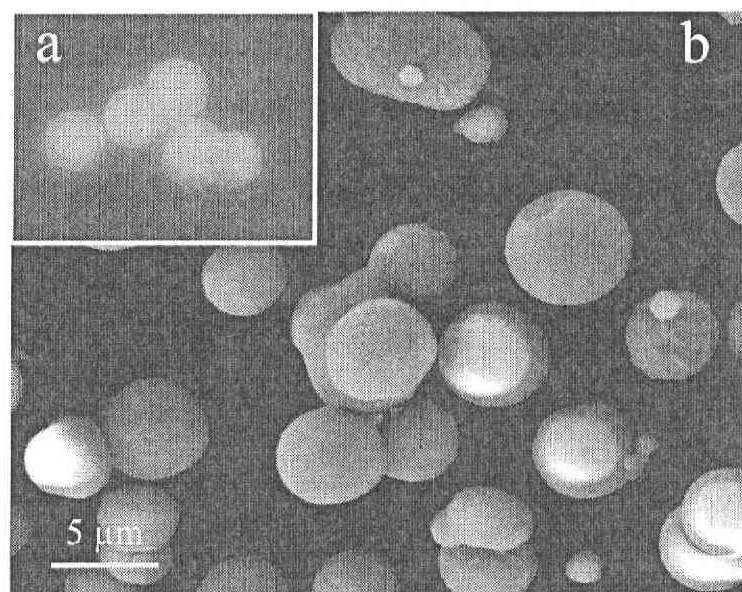


Figure 35. Fluorescence microscope (a) and SEM (b) images of calcium carbonate particles containing FITC-Con A - Glycogen conjugates.

この FITC-Con A - Gly 複合体を含有する CaCO_3 粒子を芯物質としてカプセルを調製した。カプセル膜はポリアニオンである PSS とポリカチオンである TRITC-PAH および TRIC-PEI の交互累積膜を静電的相互作用により調製した (蛍光顕微鏡観察のためポリカチオンに TRITC を標識した)。カプセル膜形成の確認は、まず蛍光顕微鏡で行った。TRITC-PAH/PSS 累積膜、TRITC-PEI/PSS 累積膜のどちらのカプセルも積層数が 1~3 層の場合ではカプセル膜が薄すぎるために力学的強度が足りず CaCO_3 粒子を溶解除去するための EDTA 処理中に壊れてしまいカプ

セルは形成しなかった。しかし、積層数が 4 以上の場合は、TRITC-PAH/PSS 累積膜、TRITC-PEI/PSS 累積膜のどちらをカプセル膜としても球状のカプセル形成が確認できた。このときの蛍光顕微鏡の観察では TRITC の蛍光がカプセルの外側に強く発光し、FITC の緑の蛍光がカプセルの内側で強く発光していたことから、カプセル内に FITC-Con A - Gly 複合体が封入されていることが確認できた。また、電子顕微鏡では球状であり芯物質である CaCO_3 とほぼ同サイズの 3~5 μm のカプセルの形成が確認できた。カプセルの蛍光顕微鏡と走査電子顕微鏡写真の例を Figure 36 に示す。

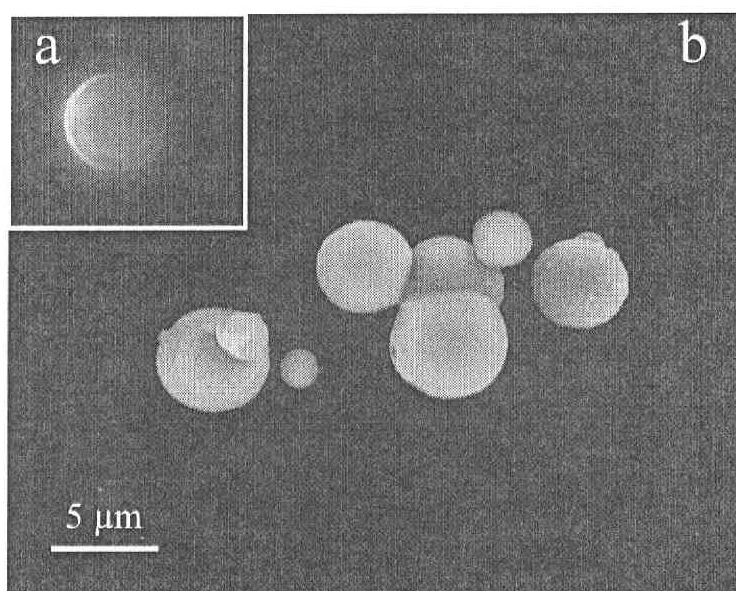


Figure 36. Fluorescence microscope (a) and SEM (b) images of FITC-Con A - Glycogen (PEI/PSS)₄ microcapsules.

FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの糖応答性

FITC-Con A - Gly 複合体を内包するカプセルを調製することができたので、次

に糖類に対する応答性を調査した。カプセルを分散した緩衝液に最終濃度がそれぞれ 0、10、20、50、100 mM となるように Glu を添加した 5 分後の蛍光スペクトルを Figure 37 に示した（カプセル膜は(PEI/PSS)₄）。第 3 章の結果と同様に FITC-Con A 由来の蛍光強度が濃度依存的に増加した。これは溶液中の Glu 分子がカプセル膜を透過して内部の複合体に作用し分解したためと考えられ、FITC-Con A - Gly 複合体のカプセル封入と糖応答性が示唆された（Figure 38）。

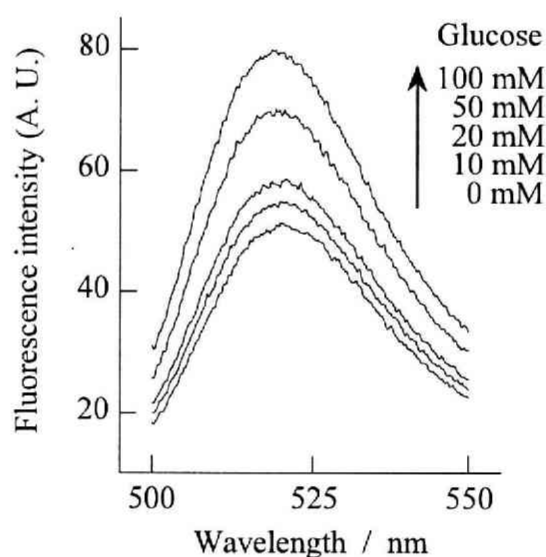


Figure 37. Effect of D-glucose addition on the fluorescence spectrum of FITC-Con A - Glycogen microcapsule. Each fluorescence spectrum was recorded five minute after the addition of glucose.

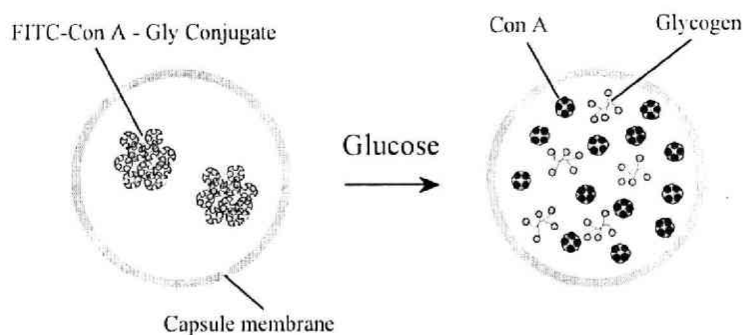


Figure 38. An illustration of Reaction of FITC-Con A - Glycogen microcapsule.

そこで、カプセル膜を構成する累積膜の違いによる Glu 応答性への影響を調査した。カプセル膜を PAH/PSS および PEI/PSS 累積膜として調製したカプセルを分散した緩衝溶液に 100 mM となるように Glu を添加した 5 分後の蛍光強度の変化を Table 2.に示す。累積操作回数は 4~6 とした。Glu の応答性は緩衝液中での蛍光強度と Glu 添加後の蛍光強度をそれぞれ I_0 および I として I / I_0 を用いて評価した。

Table 2. Fluorometric response of microcapsules containing FITC-Con A - Glycogen conjugates : Effects of type of the polycation and thickness of capsule membrane.

capsule membrane	I / I_0		
	n = 4	n = 5	n = 6
(PEI/PSS)n	1.55	1.42	0.94
(PAH/PSS)n	1.08	1.06	0.96

カプセル膜が PEI/PSS で積層数が 4 の場合では、 I / I_0 は Glu 添加後に 5 分ほど

で定常状態の 1.55 まで増加し **Glu** に対する高い応答性を示した。しかし、**PEI/PSS** の積層数が 5 および 6 の場合、 I/I_0 はそれぞれ 1.42 および 0.92 と減少した（1 より小さいのは測定誤差と考えられる）。これは、積層数が多く厚いカプセル膜では **Glu** の膜透過性が減少し、内部の複合体に **Glu** が作用しにくくなるためである。また、同様に **PAH/PSS** を用いたカプセルでは **Glu** の応答性は **PEI/PSS** に比べて低く、最も良好だった **(PAH/PSS)₄** 累積膜でも 1.13 であった。このカプセル膜による応答性の差は **PEI** と **PAH** の構造の違いにもとづいていると考えられる。Figure 39 に示したように **PEI** は枝分かれ構造の高分子であり **PAH** は直線状の高分子であるため、**PEI/PSS** 累積膜は **PAH/PSS** 累積膜に比べて疎な膜構造となり透過性の良い累積膜を形成することが知られている [125]。以後の実験では最も優れた **Glu** 応答性を示した **(PAH/PSS)₄** 累積膜についてカプセルを調製し応答性を詳細に検討した。

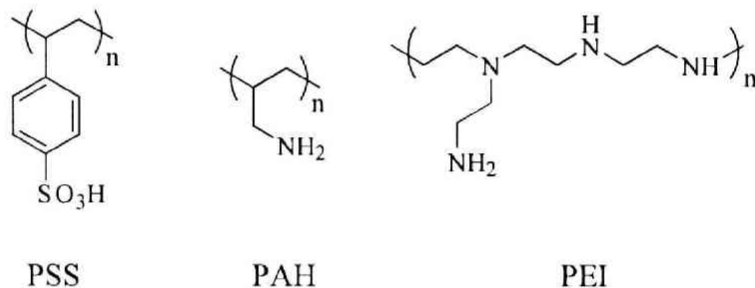


Figure 39. Chemical structures of PSS, PAH, and PEI.

各種糖類に対しての蛍光応答性を Figure 40 に示した。結果は、第 2 章および第 3 章と同様に **Con A** と糖類の親和性に依存した応答性を示し、カプセルの蛍光強度 (I/I_0) は、**Me-Man** では 10 mM、**Me-Glu** では 20 mM、**Man** では 50 mM、**Glu** では 100 mM で応答が飽和した。また、**Con A** と作用しない **Gal** では応答が見られなかった。これら各種糖に対する糖応答性は均一系とほぼ同等であり、**FITC-Con A** が変性することなく活性を維持したままカプセル内に封入されていることを確

認した。

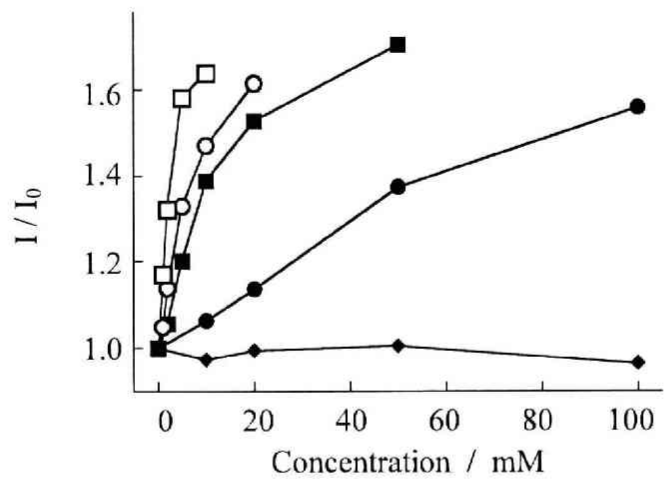


Figure 40. Response of FITC-Con A - Glycogen microcapsule to D-galactose (◆), D-Glucose (●), D-mannose (■), Methyl-α-Glucose (○), and Methyl-α-mannose (□).

また、このとき芯物質である CaCO_3 を EDTA 処理しなければ Glu による応答は最大でも I/I_0 は 1.2 程度であり十分な応答性が得られなかった (Figure 41)。この理由としては、十分な EDTA 処理後では CaCO_3 がすべて取り除かれるため Glu がカプセル内部の大部分の FITC-Con A - Gly 複合体と自由に反応できるのに対し、処理前では CaCO_3 粒子内部の複合体に接近できないために作用することができず、一部の粒子外側付近に存在する複合体のみに作用するため蛍光回復量が減少したと考えられる。このことからカプセルの機能性発現には十分な EDTA 処理が必要であることが示唆され、本実験で用いたカプセルは EDTA 処理で CaCO_3 が取り除かれていることが確認できた。

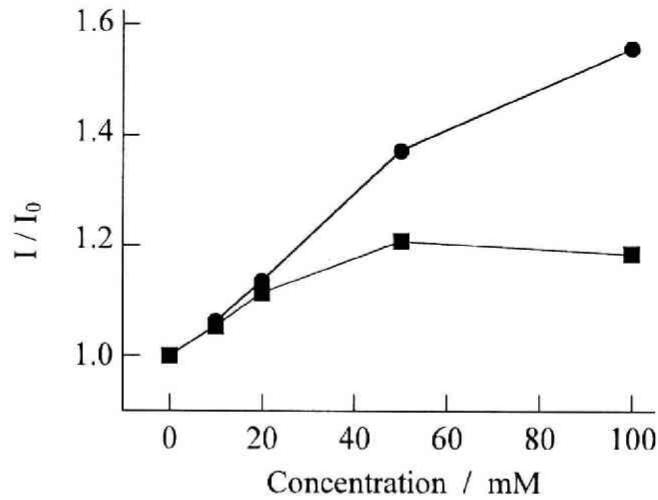


Figure 41. Response of microcapsules to D-Glucose in the presence (■) and absence (●) of CaCO₃ in the capsules.

FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルの再利用性の検討

FITC-Con A と Gly は可逆的結合により複合体を形成しているため、反応後にカプセル内部から Glu を除去すると分解した FITC-Con A と Gly が再び複合体を形成すると考えられる。このため、このカプセルは Glu を緩衝液で洗浄することでくり返しのカプセル応答が期待できることからカプセルの再利用性を検討した (Figure 42)。この結果、FITC-Con A - Gly 複合体を含むカプセルの 100 mM Glu の応答は 4 回のくり返し使用まで見られ、蛍光強度は一つ前の Glu 洗浄後の緩衝液にくらべて Glu 添加後に上昇した。このことから洗浄操作により Glu をカプセル内部から除くと、FITC-Con と Gly は再び複合体を形成し、くり返しのカプセル利用が示唆された。しかし、Glu による反応は Glu 添加と洗浄をくり返す度に蛍光強度が大きく減少していった。この理由として、Glu と反応し複合体から解離した FITC-Con A がカプセルから漏れ出していることが考えられる。

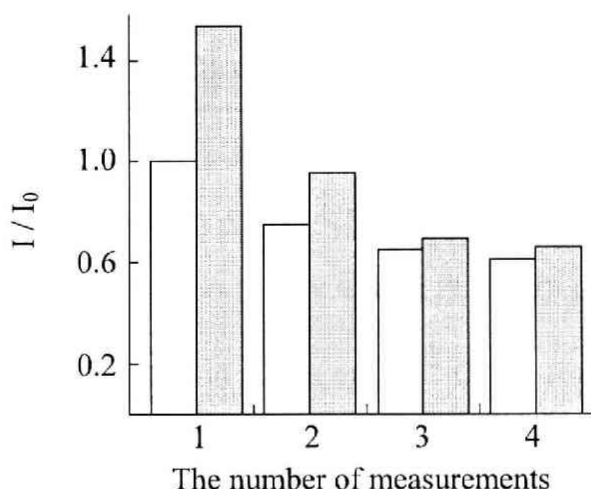


Figure 42. Reusability of FITC-Con A - Glycogen microcapsule. Fluorescence intensity of in FITC-Con A - Glycogen microcapsule in buffer solution (white square) and 100 mM D-Glucose solution (Gray square).

そこで、カプセルからの FITC-Con A の漏出量を調査した。カプセルから漏出した FITC-Con A の蛍光強度の推移の結果を Figure 43 に示す。カプセルを使い捨てセル中に分散し穏やかにかく拌して一定時間ごとに遠心操作をおこない上清の蛍光強度を測定することで FITC-Con A の漏出量を評価した。カプセルは遠心操作によりセルの底に沈み、漏出した FITC-Con A は上清に存在する。初めの 120 分間の蛍光強度は変化が少なく複合体の状態では FITC-Con A はカプセルから漏れ出さないことが分かる。また、遠心操作ではカプセル膜が壊れて中の FITC-Con A が漏れ出さないことも明らかになった。しかし、100 mM Glu を添加すると上清の蛍光強度が大きく増加していることから FITC-Con A の漏出が確認できた。これらのことから、FITC-Con A は Gly と複合体形成している状態では、複合体がカプセル膜の隙間に対して十分に大きいためカプセルから漏出することはないが、Glu と反応し複合体が分解すると FITC-Con A はカプセルから漏れ出してしまうと考え

られる（同時に **Gly** も漏出していることが推測できる Figure 44）。このような理由から Figure 43 のようにくり返し操作ごとに蛍光強度が減少していったと考えられる。本研究ではカプセル膜は **Glu** との応答性から **(PEI/PSS)₄** を利用したが **FITC-Con A** を漏出させず **Glu** と速やかな応答を示す累積膜の探索が必要である（厚い、もしくは密なカプセル膜を用いることで **FITC-Con A** の漏出を防ぐことが出来るが一般的に **Glu** の透過性が減少するため応答性は低下する）。

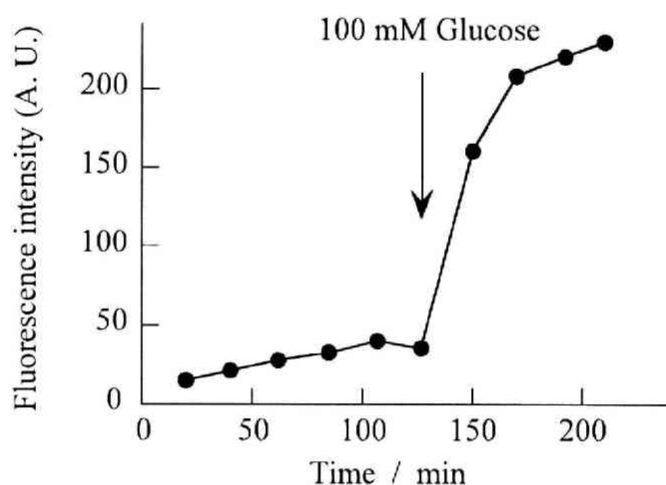


Figure 43. The amount of a leak of FITC-Con A from microcapsule containing FITC-Con A - Glycogen conjugates.

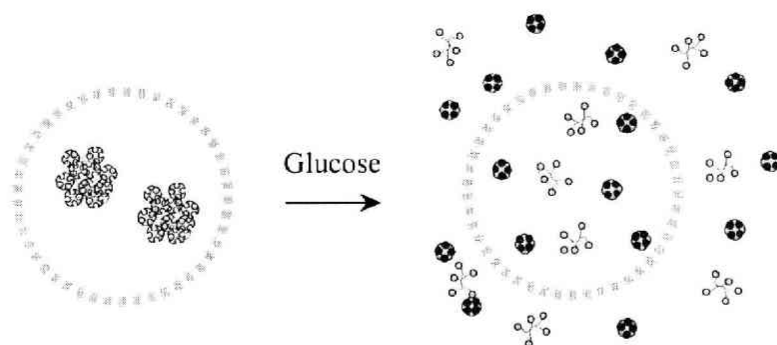


Figure 44. An illustration of a leak of FITC-Con A from a capsule.

4 - 4 まとめ

本章では FITC-Con A - Gly 複合体を内包したカプセルを調製し Glu 応答性を調査した。初めに FITC-Con A - Gly 複合体を含有した CaCO_3 粒子を調製し、これを芯物質として交互累積膜法を用いてカプセル膜を被覆した。次に EDTA で CaCO_3 を完全に溶解することで粒子サイズが 3~5 μm の Glu 応答性カプセルを調製した。カプセル膜に PEI/PSS および PAA/PSS を用いた場合は積層操作が 4 以上でカプセルの形成を確認した。これらのカプセルの Glu 応答性は (PEI/PSS)₄ 膜が最も優れており 5 分以内で速やかな蛍光強度の増加が見られた。また、この応答は Con A と糖の親和性に由来し、FITC-Con A は活性を維持したままカプセルに封入できることを示した。このカプセルはくり返し利用できる可能性が示唆されたが、糖と応答するたびに FITC-Con A の漏出が認められた。

第 5 章 結論

本研究では **Con A** を利用した **Glu** 検出方法を検討した。初めに、**Con A** と **Gly** の親和性（糖-レクチン結合）を駆動力として交互累積膜を作製し、糖応答性を検討した。この累積膜は **Glu** や **Man** などの糖類によって **Con A-Gly** 結合が切断されるため分解し、この糖応答性は加える糖の種類や濃度に依存していた。さらに、糖ポリマーである **PV-MA**、**PV-MEA**、**PV-G**、**Dext** を用いて **Con A** と積層操作を行ったところ **PV-MA** のみ **Gly** と同様の糖応答性を示した。また、**Gly** に **Fc** を修飾した **FcGly** と **Con A** 累積膜を電極上に調製することで **Glu** の電気化学的検出に成功した。

次に、**FITC-Con A - Gly** 複合体を利用した **Glu** の蛍光検出方法を検討した。**Con A** にラベル化された **FITC** は **FITC-Con A** が **Gly** と複合体を形成すると消光されることを明らかにした。また、この **FITC-Con A - Gly** 複合体は累積膜と同様に **Glu** によって分解し、このとき消光されていた **FITC** の蛍光は **Glu** の濃度依存的に回復するため、この性質を利用した **Glu** の蛍光検出を確認した。この現象は単一の蛍光色素（**FITC**）のみの蛍光変化にもとづいているため、常用される **FRET** システムに必要な 2 種の蛍光色素の使用を避けられる点で優れている。今後、より効果的な消光作用をもつ糖鎖をデザインすることや複合体の形成で色調の大きく変化する環境応答性色素を利用することでこれらを改善し目視による **Glu** の検出が期待できる。

最後に、この **FITC-Con A - Gly** 複合体を内包するマイクロカプセルの調製を検討した。カプセルの芯物質に CaCO_3 微粒子を用い、 $(\text{PEI}/\text{PSS})_4$ 累積膜を被覆することで **FITC-Con A** を変性することなく活性を維持したままカプセル化することができた。また、**Glu** の応答性も均一系の場合と同程度であった。この方法は **Con A** 以外の生体試料を用いた場合でも応用可能であり今後の機能性カプセルの開発に

有用であると考えられる。しかし、(PEI/PSS)₄カプセル膜では FITC-Con A が漏れ出てしまいくり返しの Glu 検出が出来なかった。PAH などの高分子を用いることや累積操作回数を増やすことで FITC-Con A を漏出させないことは可能であるが、この場合は Glu 応答性が著しく減少する。今後は、封入した FITC-Con A を漏出させることなく Glu の透過性が良いカプセル膜を検討することで完全にくり返して利用できるカプセルの調製を目指すことが必要である。

Con A を認識材料に用いて Glu の検出方法を検討してきたが、今回検討した方法のほかにもいろいろな応用が期待できる。しかし、Glu の検出感度は認識材料と Glu との親和性に大きく依存するため Con A を使用する限り大きな感度上昇は期待できない。本研究では安価なレクチンであり比較的安定な生体試料であるという理由から Con A を利用してきたが、今後は、より親和性の大きいレクチンを検討することでこれらを改善できると考える。

参考文献

- 1 J. W. Becker, G. N. Reeke Jr, and G. M. Edelman, *Nature*, **259**, 406 (1976).
- 2 鈴木周一編, バイオセンサー, (1989), 講談社.
- 3 長哲郎, 安斉順一, 季刊化学総説 No. 1, バイオセンサーの原理と設計, **68** (1988), 学会出版センター.
- 4 D. J. Harrison, R. F. B. Turner, and H. P. Baltes, *Anal. Chem.*, **60**, 2002 (1998).
- 5 C. Henry, *Anal. Chem.*, **70**, 594 (1998).
- 6 O. A. Raitman, F. Patolsky, E. Katz, and I. Willner, *Chem. Comm.*, 1936 (2002).
- 7 M. Zayats, E. Katz, and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2120 (2002).
- 8 I. Willner, and A. Riklin, *Anal. Chem.*, **66**, 1535 (1994).
- 9 T. Hoshi, H. Saiki, S. Kuwazawa, C. Tsuchuya, Q. Chan and J. Anzai, *Anal. Chem.*, **73**, 5310 (2001).
- 10 T. Hoshi, H. Saiki, and J. Anzai, *Talanta*, **61**, 363 (2003).
- 11 V. R. Holland, B. C. Saunders, F. L. Rose, and A. L. Walpole, *Tetrahedron*, **30**, 3299 (1974).
- 12 M. Onda, K. Ariga, and T. Kunitake, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 69 (1999).
- 13 S. D'Auria, P. Herman, M. Rossi, and J. R. Lakowicz, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **263**, 550 (1999).
- 14 S. D'Auria, N. D. Cesare, Z. Gryczynski, I. Gryczynski, M. Rossi, and J. R. Lakowicz, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **274**, 727 (2000).
- 15 J. P. Lorand, and J. O. Edwards, *J. Org. Chem.*, **24**, 769 (1959).
- 16 M. Wilchek, and E. A. Bayer, *Anal. Biochem.*, **171**, 1 (1988).
- 17 J. P. Lorand, and J. O. Edwards, *J. Org. Chem.*, **24**, 769 (1959).
- 18 J. O. Edwards, G. C. Morrison, V. Ross, and J. W. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*,

- 77, 266 (1955).
- 19 N. DiCesare, and J. R. Lakowicz, *Org. Lett.*, **3**, 3891 (2001).
- 20 H. Cao, T. McGill, and M. D. Heagy, *J. Org. Chem.*, **69**, 2959 (2004).
- 21 C. J. Ward, P. Patel, and T. D. James, *Org. Lett.*, **4**, 477 (2002).
- 22 C. J. Ward, P. Patel, and T. D. Jams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 462 (2002).
- 23 T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, R. Iguchi, and S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 8982 (1995).
- 24 G. Springsteen, and B. Wang, *Tetrahedron*, **58**, 5291 (2002).
- 25 D. B. Cordes, S. Gamsey, Z. Sharrett, A. Miller, P. Thoniyot, R. A. Wessling, and B. Singaram, *Langmuir*, **21**, 6540 (2005).
- 26 H. Suzuki, and A. Kumagai, *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 1289 (2003).
- 27 Nakayama D, Takeoka Y, Watanabe M, Kataoka K, *Angewa. Chem. Int. Edit.*, **42**, 2647-2650 (2003).
- 28 V. L. Alexeev, A. C. Sharma, A. V. Goponenko, S. Das, I. K. Lednev, C. S. Wilcox, D. N. Finegold, and S. A. Asher, *Anal. Chem.*, **75**, 2316 (2003).
- 29 S. A. Asher, V. L. Alexeev, A. V. Goponenko, A. C. Sharma, I. K. Lednev, C. S. Wilcox, and D. N. Finegold, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3322 (2003).
- 30 V. Lapeyre, I. Gosse, S. Chevreux, and V. Ravaine, *Biomacromolecules*, **7**, 3356 (2006).
- 31 Y. J. Lee, S. A. Pruzinsky, and P. V. Braum, *Langmuir*, **20**, 3096 (2004).
- 32 E. Nakata, Y. Koshi, E. Koga, Y. Katayama, and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13253 (2005).
- 33 Y. Koshi, E. Nakata, H. Yamane, and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10413 (2006).
- 34 I. Hamachi, T. Nagase, and S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**,

12065 (2000).

- 35 O. Hayashida, and I. Hamachi, *Chem. Lett.*, **32**, 632 (2003).
- 36 G. Decher, *Science*, **277**, 1232 (1997).
- 37 G. Decher, J. D. Hong, and B. Bunsenges, *Phys. Chem.*, **95**, 1430 (1991).
- 38 G. Decher, J. D. Hong, and J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **210-211**, 831 (1992)
- 39 G. Decher, Y. Lvov, and J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **244**, 772 (1994).
- 40 T. Hoshi, H. Saiki, and J. Anzai, *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 623-628 (2000).
- 41 J. Anzai, T. Hoshi, and N. Nakamura, *Langmuir*, **16**, 6306 (2000).
- 42 S. Clark, and P. T. Hammond, *Langmuir*, **16**, 10206 (2000).
- 43 S. S. Shiratori and M. F. Rubner, *Macromolecules*, **33**, 4213 (2000).
- 44 K. Lowack, and C. A. Helm, *Macromolecules*, **31**, 823 (1998).
- 45 J. Anzai and Y. Kobayashi, *Langmuir*, **16**, 2851 (2000).
- 46 S. Disawal, J. Qiu, B. B. Elmore, and Y. M. Lvov, *Colloids Surf. B*, **32**,
145 (2003).
- 47 J. Zhang, B. Senger, D. Vvautier, C. Picart, P. Sxhaaf, J.C. Voegel, and
P. Llavalle, *Biomaterials*, **26**, 3353 (2005).
- 48 G. B. Sukhorukov, M. M. Montrel, A. I. Petrov, L. I. Shabarchina, and
B. I. Sukhorukov, *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 913 (1996).
- 49 G. B. Sukhorukov, M. M. Montrel, A. I. Petkov, L. I. Shabarchina, and
B. I. Sukhorukov, *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 913 (2005).
- 50 T. Trimaille, C. Pichot, and T. Delair, *Colloids Surf. B*, **221**, 39 (2003).
- 51 J. F. Hicks, Y. Seok-Shon, and R. W. Murray, *Langmuir*, **18**, 2288 (2002).
- 52 Y. Liu, Y. Wang, and R. O. Claus, *Chem. Phys. Lett.*, **298**, 315 (1998).
- 53 M. D. Musick, D. J. Pena, S. L. Botsko, T. M. McEvoy, J. N. Richardson, and
M. L. Natan, *Langmuir*, **15**, 844 (1999).

- 54 A. A. Mamedov, A. Belov, M. Giersig, N. N. Mamedova, and N. A. Kotov, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7738 (2001).
- 55 S. H. Lee, J. Kumar, and S. K. Tripathy, *Langmuir*, **16**, 10482 (2000).
- 56 M. J. McShane, J. Q. Brown, K. B. Guice, and Y. M. Lvov, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2**, 1 (2002).
- 57 A. Liu, and J. Anzai, *Anal. Chem.*, **76**, 2975 (2004)..
- 58 T. Chen, K. A. Friedman, I. Lei, and A. Heller, *Anal. Chem.*, **72**, 3757 (2000).
- 59 T. Noguchi, T. Hoshi, and J. Anzai, *J. Sens. Lett.*, **3**, 164 (2005).
- 60 H. Katayama, Y. Ishihama, and N. Akasaka, *Anal. Chem.*, **73**, 5310 (2001).
- 61 J. Meier-Haack, W. Lenk, D. Lehmann, and K. Lunkwiz, *J. Membr. Sci.*, **184**, 223 (2001).
- 62 L. Krasemann, A. Toutianoush, and B. Tieke, *J. Membr. Sci.*, **181**, 211 (2001).
- 63 M. Morpurgo, H. Hofstetter, E. A. Bayer, and M. Wilchek, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12734 (1998).
- 64 J. Anzai, and Y. Kobayashi, *Langmuir*, **16**, 2851 (2000).
- 65 J. Anzai, T. Hoshi, and N. Nakamura, *Langmuir*, **16**, 6306 (2000).
- 66 E. J. Calvo, C. Danilowicz, C. M. Lagier, J. Manrique, and M. Otero, *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 1219 (2004).
- 67 C. Sxhuer, and F. Caruso, *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 750 (2000).
- 68 Y. Lvov, and F. Caruso, *Anal. Chem.*, **73**, 4212 (2001).
- 69 X. Qiu, S. Leporatti, E. Donath, and H. Möwald, *Langmuir*, **17**, 5375 (2001).
- 70 H. Ai, S. A. Jones, M. M. deVilliers, and Y. M. Lvov, *J. Controlled Release*, **86**, 59 (2003).
- 71 A. Antipof, and G. B. Sukhishvili, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **111**, 49 (2004).
- 72 Z. Lu, T. Shutava, N. Sahiner, V. John, and Y. Lvov, *Chem. Lett.*, **34**,

1536 (2005).

- 73 S. Z. Zhang, F. L. Zhao, K. A. Li, and S. Y. Tong, *Talanta*, **54**, 333 (2001).
- 74 T. Hoshi, S. Akase, and J. Anzai, *Langmuir*, **18**, 7024 (2002).
- 75 J. Anzai, Y. Kobayashi, T. Hoshi, and H. Saiki, *Chem. Lett*, 365 (1999).
- 76 J. Anzai, and Y. Kobayashi, *Langmuir*, **16**, 2851 (2000).
- 77 J. Anzai, Y. Kobayashi, N. Nakamura, and T. Hoshi, *Sensors and Actuators B*, **65**, 94 (2000).
- 78 Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, and T. Kunitake, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 2313 (1995).
- 79 Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, and T. Kunitake, *Thin Solid Films*, **284-285**, 797 (1996).
- 80 A. Kalb, and A. Lustig, *Biochim. Biophys. Acta.*, **168**, 11209 (1968).
- 81 F. P. Schwarz, K. D. Puri, R. G. Bhat, and A. Surolia *J. Biol. Chem.* **268**, 7668 (1993).
- 82 D. K. Mandel, N. Kishore, and C. F. Brewer, *Biochem.*, **33**, 1149 (1994).
- 83 ナタン・シャロン、ハリナ・リス、レクチン、(1990)
- 84 J. Anzai and Y. Kobayashi, *Langmuir*, **16**, 2851 (2000).
- 85 A. Liu, Y. Kashiwagi, and J. Anzi, *Electroanalysis*, **15**, 1139 (2003).
- 86 A. Liu and J. Anzai, *Langmuir*, **19**, 4043 (2003).
- 87 F. P. Schwarz, K. D. Puri, R. G. Bhat, and A. Surolia, *J. Biol. Chem.* **268**, 7668 (1993).
- 88 D. L. Meadows, and G. Hall, *Biosensors*, **111**, 122 (1993).
- 89 N. D. Cesare, and J. R. Lakowicz, *Prog. SPIE*, **4625**, 152 (2002).
- 90 R. J. Russell, M. V. Pishko, C. C. Gefrides, M. J. McShane, and G. L. Cote, *Anal. Chem.*, **71**, 3126 (1999).

- 91 M. J. McShane, *Diabetes Technol. Ther.*, **4**, 533 (2002).
- 92 J. R. Lakowicz, and B. Maliwali, *Anal. Chim. Acta*, **271**, 155, (1993).
- 93 J. S. Schultz and G. Sims, *Biotechnol. bioeng. Symp.*, **9**, 65 (1979).
- 94 S. Mansouri and J. S. Schultz, *Biotechnology*, **2**, 885 (1984).
- 95 D. L. Meadows and J. S. Schultz, *Talanta*, **35**, 145 (1988).
- 96 D. L. Meadows and J. S. Schultz, *Anal. Chim. Acta*, **280**, 21 (1993).
- 97 R. Ballerstadt and J. S. Schultz, *Anal. Chim. Acta*, **345**, 203 (1997).
- 98 L. J. McCartney, J. C. Pickup, O. J. Rolinski, and D. J. S. Birch, *Anal. Biochem.*, **292**, 216 (2001).
- 99 R. F. Chen, and J. R. Knutson, *Anal. Biochem*, **172**, 61 (1998).
- 100 J. H. Wu, and S. L. Diamond, *Anal. Biochem*, **224**, 83 (1995).
- 101 J. A. Garcia-Barrado, J. L. Gata, E. Santano, J. I. Solis, M. C. Pinto, and P. Macias, *Biochem. Bioph. Res. Co*, **256**, 489 (1999).
- 102 H. J. Gruber, G. kada, M. Marek, and K. Kaiser, *Biochim. Biophys. Acta*, **1381**, 203 (1998).
- 103 G. Kada, H. Falk, and H. J. Gruber, *Biochim. Biophys. Acta*, **1427**, 33 (1999).
- 104 G. Kada, K. Kaiser, H. Falk, and H. J. Gruber, *Biochim. Biophys. Acta*, **1427**, 44 (1999).
- 105 H. Zhu, and M. J. McShane, *Langmuir*, **21**, 424 (2005).
- 106 O. P. Tiourina, and G. B. Sukhorukov, *Inte.J. Pharm.*, **242**, 155 (2002).
- 107 E. W. Stein, D. V. Volodkin, M. J. McShane, and G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules*, **7**, 710 (2006).
- 108 Y. Itoh, M. Matsusaki, T. Kida, and M. Akashi, *Biomacromolecules*, **7**, 2715 (2006).
- 109 Q. Zhao, S. Zhang, W. Tong, C. Gao, and J. Shen, *European Polymer Journal*,

- 42, 3341 (2006)
- 110 T. Mauser, C. Déjugant, H. Möhwald, and G. B. Sukhorukov, *Langmuir*, **22**, 5888 (2006).
- 111 P. M. Biesheuvel, T. Mauser, G. B. Sukhorukov, and H. Möhwald, *Macromolecules*, **39**, 8480 (2006).
- 112 Z. An, H. Möhwald and J. Li, *Biomacromolecules*, **7**, 580 (2006).
- 113 B. G. D. Geest, A. M. Jonas, J. Demeester, and S. C. D. Smedt, *Langmuir*, **22**, 5070 (2006).
- 114 S. Chinnayelka, and M. J. McShane, *Journal of Fluorescence*, **14**, 585 (2004).
- 115 S. Chinnayelka, and M. J. McShane, *Anal. Chem.*, **77**, 5501 (2005).
- 116 E. W. Stein, P. S. Grant, H. Zhu, and M. J. McShane, *Anal. Chem.*, **79**, 1339 (2007).
- 117 F. Zhang, Q. Wu, Z. C. Chen, Z. Li, Z. M. Jiang, and X. F. Lin, *Langmuir*, **22**, 8458 (2006).
- 118 A. Voigt, H. Lichtenfeld, G. B. Sukhorukov, H. Zastrow, E. Donath, H. Bäuml, and H. Möhwald, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **38**, 4037 (1999).
- 119 L. Dähne, S. Leportatti, E. Donath, and H. Möhwald, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5431 (2001).
- 120 H. Zhu, R. Srivastava, and M. J. McShane, *Biomacromolecules*, **6**, 2221 (2005).
- 121 B. G. Geest, E. Verhorvrn, G. B. Sukhorukov, A. M. Jonas, J. Plain, J. Demeester, and S. C. D. Smedt, *Journal of Controlled release*, **116**, 159 (2006).
- 122 A. I. Petrov, D. V. Volodkin, and G. B. Sukhorukov, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 918 (2005).
- 123 C. Wang, C. He, Z. Tong, X. Liu, B. Ren, and F. Zeng, *Int. J. Pharma.* **308**, 160 (2006)

- 124 A. I. Petrov, D. V. Volodkin, and G. B. Sukhorukov, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 918 (2005).
- 125 T. Hoshi, H. Saiki, S. Kuwazawa, C. Tsuchiya, Q.Chan, and J. Anzai, *Anal. Chem.*, **73**, 5310 (2001).

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬ御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 安斉順一教授に心から感謝いたします。また、本論文に対して有益な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 岩田鍊教授ならびに三浦隆史准教授に深く感謝いたします。

また、有益な御批評、御討論をいただきました東北大学大学院薬学研究科物性解析科学分野の皆様にも深く感謝いたします。