

ターゲットセンシングのためのペプチドを利用する電気化学センサー



菅原 一晴

1 はじめに

ペプチドは、20種類の天然アミノ酸を組み合わせることで、様々な特性をもつ機能性分子となる¹⁾。このような配列から成るペプチドはタンパク質と同等の機能を示す可能性がある。また、ペプチドは生体適合性を有しており、生物活性をもち低毒性である。そのため、細胞や組織、器官への影響を軽減しつつ生体内で特定の機能を発現することができる。加えて、熱や光などによる変性に比較的強く、溶液中での立体配座の保持や化学的安定性が高い優れた性質を有している。ペプチドは、Fmoc (フルオレニルメチルオキシカルボニル) あるいは *t*-Boc (*tert*-ブトキシカルボニル) ペプチド固相合成法に基づき、ある程度の制約はあるものの特定のアミノ酸残基から成るペプチドが作製される²⁾。それゆえ、微生物、動植物からのタンパク質の分離精製に対して、多量で高純度なペプチドを得ることもできる。ペプチドの特長の一つとしては分子修飾が容易であり、N-末端のアミノ酸残基の化学反応を介したフルオレセン、ビオチン化、飽和脂肪酸 (Butyric acid (C4) から Stearic acid (C18))、不飽和脂肪酸 (オレイン酸やリノール酸など)、アセチル化、ホルミル化、サクシニル化、C-末端側についてはカルボキシ基のアミド化が達成される。また、セリン、トレオニン、チロシン残基のリン酸化や非通常アミノ酸、D-アミノ酸をペプチド配列に組み込むこともたやすい。ペプチドに特定の分子を結合させる場合には、疎水性のアミノヘキサ酸、親水性のポリエチレングリコールをスペーサーとして使用することも可能である。このようにペプチドを機能化させることは容易で、分析化学において注目されるべきプローブとなっている。

2 電気化学的センシングのためのペプチドの特性

電気化学センサーは、電子工学、化学や生物学を融合

させることで、ターゲットの高感度、高選択的、簡便、迅速なセンシングを実現するためのツールとして高く評価されている。例えば、細胞、タンパク質、金属イオン、細菌、核酸などのセンサーが考案され、疾病診断、食品分析、*in vitro*での薬物添加の評価、環境モニタリングなどに応用されている。ペプチドは、センサーのトランスデューサである電極の表面を修飾することに適しており、チオールとAuとの結合を介して電極表面に自己組織化単分子膜 (SAM) を生成させペプチドを固定化する手法が知られている。また、ポリ-L-リジン、Arg-Gly-Asp ペプチドは、センサー表面の生体親和性、ターゲット測定における感度および精度の向上に寄与している³⁾。一方、ターゲットと特定のペプチド配列とのコンジュゲーションにより電極との電子移動速度を改善することでシグナルを増幅する報告もある。さらに、分子認識や電子伝達性ペプチドなどを金属ナノ材料、カーボンナノ材料、金属酸化物、天然・合成高分子などの支持体に修飾することで電極表面に新たな機能をもたらす⁴⁾。最近では、ペプチドベースの電気化学的測定は、小型化と携帯型モビリティ向けのシンプルなガジェットなどを利用したポイントオブケアテストに対応した装置も試作されている⁵⁾。

3 ペプチドを利用した電気化学的ターゲット測定

3-1 酵素とペプチドとの相互作用に基づいたプロテアーゼの検出

電気化学的センサーは、医療における診断、食品成分の評価、環境モニタリング、ヘルスケアなど多様な分野で広く浸透しているツールやデバイスとなっている。プロテアーゼはがんの罹患に関与しており、その中でもトリプシンの発現レベルが、特定の器官でのがん細胞において増加することが見いだされている。Martín らのグループは、トリプシンをセンシングする取り組みとして、磁性ビーズ表面にN-末端側にフルオレセインイソチオシアネート (FITC) そして8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸-フェニルアラニン-アルギニン-アルギニン-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸-ビオチンから成るプローブをアビジン-ビオチン間結合を介し固定化し、トリプシンによるペプチド部位の切断による電気化学的手法を考案している⁶⁾。ペプチド切断後には、西洋ワサビペルオキシダーゼ-anti-FITC を作用させ、電極の表面にビーズを磁氣的に捕捉し、ハイドロキノン/HRP/H₂O₂ システムを使用して、アンペロメトリーにより検出を行った。トリプシンの検出限界は0.16 mg/mLであり、生抽出物を使用して、膵臓癌^{がん}、子宮頸癌、および腎臓細胞からの溶解物中のトリプシンを直接測定することができた。

3.2 電気化学的サイトセンシングのためのナノ-生体高分子複合材料の考案

サイトセンシングの研究として、ペプチドナノチューブ/キトサン (peptide nanotube-chitosan : PNT-CS) 複合材料を、グラッシーカーボン電極 (Glassy carbon electrode : GCE) 表面に固定化したセンサーによる K562 細胞のセンシングを取り上げた⁷⁾。PNT-CS 修飾センサーは、最初に CS 水溶液中にジフェニルアラニンを溶解し、ナノチューブと反応させた。次に、その溶液を GCE にキャストし乾燥させることで容易に構築された。形態、構造、および特性の評価により、複合材料が 3D ナノ構造、高表面積、安定性、および優れた親水性をもっていることが明らかになった。ターゲット細胞の電気化学インピーダンス分光法により $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ の存在で行われ、PNT-CS 修飾電極での応答は、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^7$ cells/mL で直性となり、検出限界は 630 cells/mL であった。それゆえ、電極の作製が簡便であり、優れた生体適合性を有しているため、このようなプラットフォームは汎用性がある。

3.3 細菌-ペプチド間結合による細菌の電気化学的計測

効果的かつ迅速に病原菌を検出するためにペプチドが応用された。Shi らは、大腸菌 O157 をターゲット細菌株とし、O157:H7 とアフィニティーの強いペプチドを金電極に固定化し、ラベルフリーなバイオセンサの考案を行った⁸⁾。ファージディスプレイペプチドライブラリーのバイオパニングによって O157:H7 に対して高い結合親和性をもつ 12 mer のペプチドが見いだされた。C 末端に三つのグリシン残基と一つのシステイン残基が導入された GLHTSATNLYLHGGGC は、金電極上に自己組織化された。そして、この電極を使うことで大腸菌 O157:H7 の定量的検出のための電気化学インピーダンス分光法 (EIS) が可能となった。ペプチド配列の特異性は、大腸菌 O157:H7 へのペプチドとの結合は静電相互作用を伴う疎水性/親水性相互作用に基づいていた。電極のデザインは、細菌の認識と定量化を実施するために効率的であり、高い感度と特異性を有していた。本センサーの検出限界は 20 CFU/mL であり、 $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^6$ CFU/mL の濃度範囲で O157:H7 の検出がなされた。それゆえ、本センサは公衆衛生、環境、および食品安全で急速に高まるニーズに応じる *in situ* センシングシステムとなる。

4 おわりに

ペプチドベースの電気化学的センシングシステムは、医療・臨床分野、食品分析、環境モニタリングなどにおいて簡便でコストエフェクティブにターゲットを測定するシステムである。そのメリットは、生体適合性が高

く、環境負荷が低いことである。加えて、ターゲットに合わせたペプチド組み立て、そして機能性分子をペプチドに修飾することでその可能性は多様である。また、電気化学システムはマイルド条件で生体内のターゲットをリアルタイムで測定ができるため、今後のいっそうの展開が期待される。

文 献

- 1) Saranya Chandrudu, P. Simerska, I. Toth : *Molecules*, **18**, 4373 (2013).
- 2) A. Karimzadeh, M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia : *Trends. Analyt. Chem.*, **107**, 1 (2018).
- 3) M.A. Kafi, H.-Y. Cho, J.-W. Choi : *Nano Converg.*, **3**, 17 (2016).
- 4) M. Puiu, C. Bala : *Curr. Opin. Electrochem.*, **12**, 13 (2018).
- 5) V. Vanova, K. Mitrevska, V. Milosavljevic, D. Hynek, L. Richtera, V. Adam : *Biosens. Bioelectron.*, **180**, 113087 (2021).
- 6) C. M.-S. Martín, M. Pedrero, M. Gamella, A. Montero-Calle, R. Barderas, S. Campuzano, J. M. Pingarrón : *Anal. Bioanal. Chem.*, **412**, 6177 (2020).
- 7) M. Lian, X. Chen, X. Liu, Z. Yi, W. Yang : *Sens. Actuat. B*, **251**, 86 (2017).
- 8) F. Shi, L. Gan, Y. Wang, P. Wang : *Biotechnol. Lett.*, **42**, 825 (2020).



菅原一晴 (Kazuharu SUGAWARA)

前橋工科大学生命工学領域情報・生命工学群 (〒371-0816 群馬県前橋市上佐鳥町 460-1)。北海道大学理学研究科博士後期課程化学専攻修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》細胞や生体分子センシングのためのアプタプローブの構築。《趣味》スノーボード。

E-mail : kzsuga@maebashi-it.ac.jp.