

# バイオセンシングと超分子化学における分子認識デバイス

Molecular Recognition Devices in Biosensing and Supramolecular Chemistry

工学部 機能材料工学科 飯田 武揚

Department of Functional Materials Science,

Faculty of Engineering

Takeaki Iida

Studies on molecular recognition devices in biosensing using thermophilic enzymes and in supramolecular chemistry using face-to-face cyclodextrin dimers have been reviewed. Application of thermophilic enzymes to biosensing receptors has attracted much attention, because the thermophilic functions at high temperatures are incomparable, and also the sensor durability is exclusively high against various buffer solutions containing organic solvents, inorganic salts, detergents and metal complexes at various temperatures. We have also been working on molecular recognition devices of metal complexes as enzyme models and face-to-face cyclodextrin dimers as molecular capsules.

## 1. 分子認識デバイスによる分子情報処理

分子は原子を空間的に結合配列させて、一定の立体構造をとると同時に、特異的な分子情報を有している。これらの分子は、それぞれが持っている分子情報を他の分子認識デバイスに読み込ませ、それを電気あるいは分子信号 (**molecular signal**) に変換させて、分子情報を伝達することができる。これらの研究を行う分野は、分子信号の生成や処理、移動、変換、検出の化学であって、セミオケミストリー (**semiochemistry**) とよばれる。分子と分子が衝突してお互いの分子情報を交換して反応し、よりエネルギー的に安定な分子を形成する分子間の化学反応でさえも、エネルギー差があれば進行するのではなく、触媒分子を含めた分子相互の分子認識デバイスとその場での化学結合の組み換えが起こらなければ進行しない。

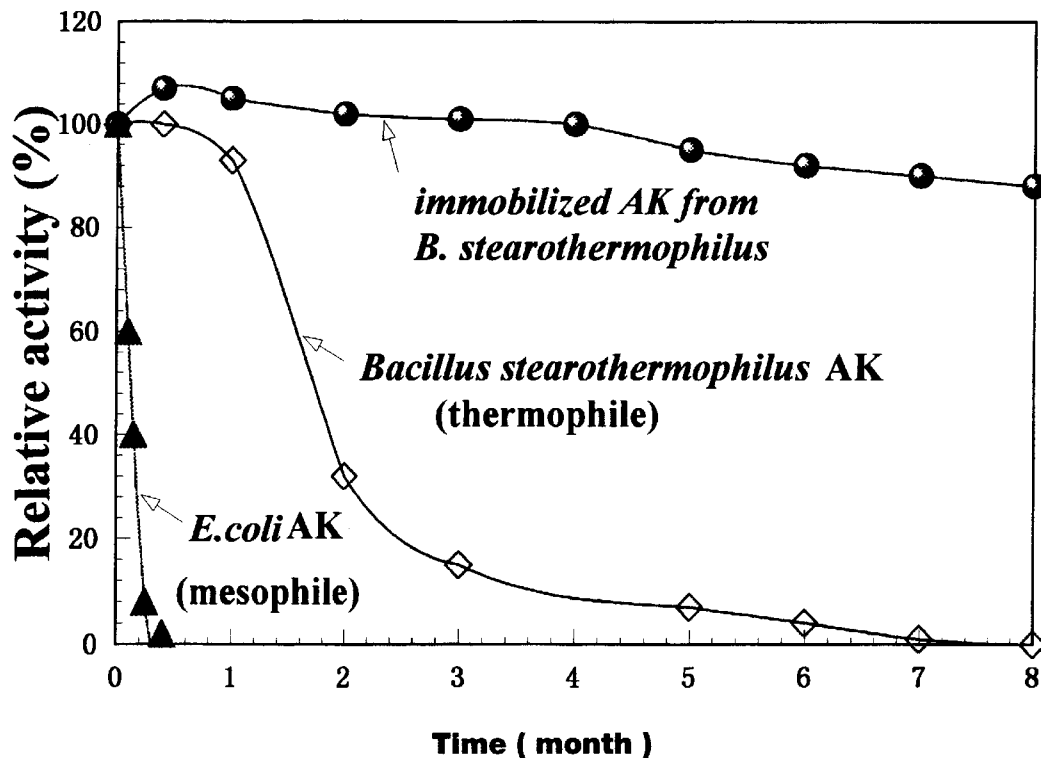
超分子で構築された分子認識デバイスでは分子と超分子が非共有結的に相互作用し合い、より特異的に分子認識が行われる。超分子認識されることにより分子は電気化学的、イオンの、光学的、配座的な性質に変化をきたす。この変化を物理・化学的手法で計測すると分子センサという分子デバイスが設計される。バイオセンシングでは、生体高分子、例えば酵素、抗体、核酸、多糖類などを分子認識デバイスのレセプターとして用いて、基質分子を反応・転位する際に生じる化学種を巧みに捕らえて、生体高分子の分子認識デバイスでそれら読みとり、分子情報を電気信号あるいは分子信号に変換する分子認識デバイスとしてのバイオセンサを構成する。

この総説では、著者らの1980年からの耐熱性酵素の分子認識デバイスを用いるバイオセンサの研究、酵素活性をもつ人工酵素金属錯体および超分子化学におけるシクロデキストリンダイマーを用いる分子認識デバイスとそれらの応用研究についてレビューする。

## 2. 分子レセプターとしての耐熱性酵素

好熱性細菌が産生する耐熱性酵素は生体系としては高温の60～110℃で基質分子を認識して反応・転位する。また耐熱性酵素はpH、化学的変性剤、界面活性剤、有機溶媒などに対して高い耐性をもっている。このような耐熱性酵素の高い耐性はタンパク質工学などから、タンパク質の中心コアのポリペプチド鎖が水素結合、疎水結合、配位結合などで総合的に強化されていることが明らかにされている。 Fig. 1 に今堀

和友先生らによる好熱性細菌から精製された耐熱性酵素、酢酸キナーゼ (AK) をバイオリアクタに利用したときの酵素の長期間にわたる安定性の結果を示す<sup>1)</sup>。



**Fig.1 Comparison of the stability of thermophilic and mesophilic acetate kinases ( AK ). AKs were dissolved in 100mM Tris-Cl pH 7.5.**

Fig.1から分かるように、常温菌 (mesophile)である大腸菌由来の酢酸キナーゼは4℃の緩衝液中に保存するとほぼ1-2週間で酵素活性を失うのに対して、好熱性細菌 (thermophile) 由来の耐熱性酢酸キナーゼは同じ溶液条件下でも3ヶ月以上も活性を保持している。耐熱性酵素をセファロースなどの表面に共有結合を用いて固定化すれば、1年以上経っても90%の活性が保持される。この結果は、耐熱性酵素をバイオセンサ、バイオリアクタ、臨床検査用試薬、酵素免疫測定用試薬、DNAの鑑定に使われるポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法などに応用するとき、重要な特性になってくる。

### 3. 耐熱性酵素を利用するバイオセンサの応用研究の開始

著者らは1980年から世界で最初に耐熱性酵素をバイオセンサのレセプターとして応用する研究を開始した。最初はユニチカ(株)中研の中島宏氏などの協力を得て、中等度好熱性細菌 *Bacillus stearothermophilus* を培養して、菌体から耐熱性トレオニンデアミナーゼを精製した。トレオニンは家畜の飼料に大量に添加される必須アミノ酸の一つである。トレオニンデアミナーゼはつぎの反応を触媒する。

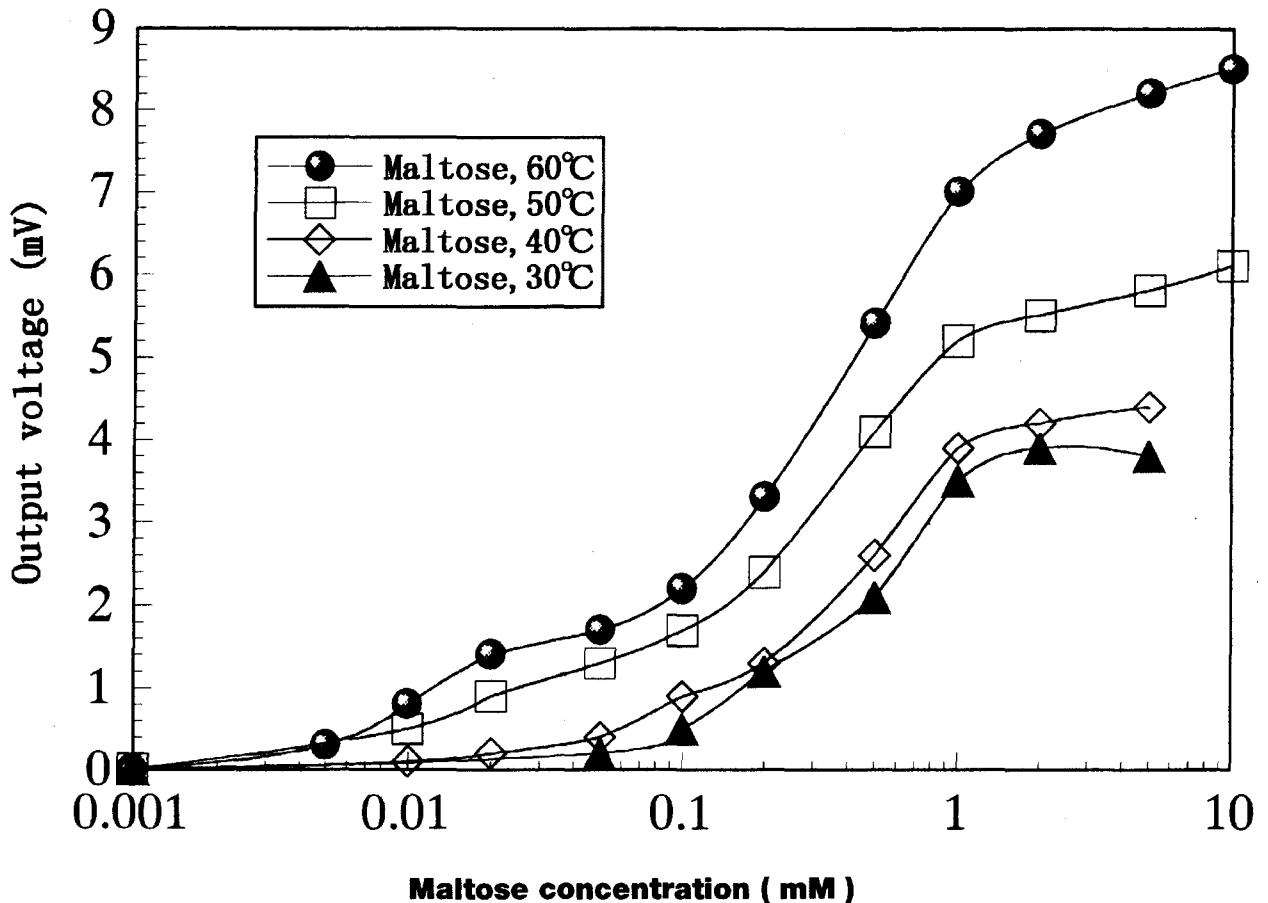


酵素反応によって生成するアンモニアをアンモニアガス電極で測定すれば、トレオニンセンサが構成できる。このセンサは最適pHが11にあり、温度を高温の60℃へ上昇させると、室温の2~3倍の出力を示した。生体系としては高温作動のバイオセンサであり、この耐熱性酵素をポリアクリルアミドゲル膜に固定すると1年経っても90%の活性を保持していた。幸運にも最初の研究から、高温で作動する長寿命バイオセンサの目標は凶星であった。また、耐熱性酵素の基質特異性は常温生物由来の酵素とかなり異なっており、60℃で30分間の低温殺菌処理にも十分耐えるので、体内埋め込み型のバイオセンサや人工臓器用バイオセンサなどに使えるユニークなバイオセンサであった。著者らは早速これらの結果をまとめて、1983年の第1回化学センサ国際会議で発表した<sup>2)</sup>。当時世界で耐熱酵素をバイオセンサに応用した研究例はなく、これが世

界最初の応用研究例であった。

#### 4. 耐熱性酵素を利用するバイオセンサの研究の進展

さらに1986年ごろから、バイオセンサの微少化、多機能化という観点から、バイオセンサの信号変換部位であるトランスデューサとして、Si半導体素子を用いたマイクロバイオセンサが開発されて、盛んに利用されるようになってきた。その中でもイオン感応電界効果トランジスタ (Ion Sensitive Field Effect Transistor, ISFET)を用いるバイオセンサは各種の化学分析、医療検査計測、環境計測、食品分析などの広範な分野に応用研究され、多項目を同時計測できるワンチップ多機能ISFETバイオセンサとして研究されてきた。



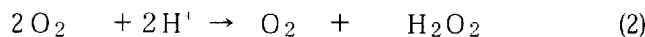
**Fig.2 Calibration curves for the ISFET maltose sensor measured at various temperatures and at pH 8.4 (16).**

そこでこのISFETを用いるセンサ技術を導入して、耐熱性酵素を用いるバイオセンサの研究を進めた。1985年に耐熱性トレオニンデアミナーゼを用いるISFET型トレオニンセンサ<sup>3)</sup>、耐熱性グルタミンシンテターゼを用いるグルタミン酸センサ<sup>4-7)</sup>、耐熱性ピルビン酸キナーゼと耐熱性アデニル酸キナーゼを共役させてAMP, ADP, ATPなどの核酸類を計測できるISFET型ヌクレオチドセンサ<sup>8)</sup>、耐熱性グルコキナーゼを用いるグルコースセンサ<sup>9, 11, 12)</sup>、さらに肝機能ならびに心筋梗塞の指標に使われるグルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) 活性センサ<sup>10)</sup>、オキサロ酢酸センサとグルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) 活性センサへの応用<sup>11-12)</sup>、耐熱性スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を用いるスーパーオキシドセンサ<sup>13)</sup>また、Fig.2に耐熱性グルコキナーゼと耐熱性マルターゼを共役固定化したISFET型マルトースセンサのマルトースに対する検量線の温度依存性の例を示す。これから分かるように、これらの耐熱性酵素を用いるバイオセンサは温度の上昇とともに酵素が活性化し、センサの出力が増大し、高温安定型の特性をもっているのが特徴である<sup>16)</sup>。これらの一連の研究の中でグルタミン酸センサはユニチカ(株)との共同で実用化し、食品工業などで使われている<sup>17)</sup>。

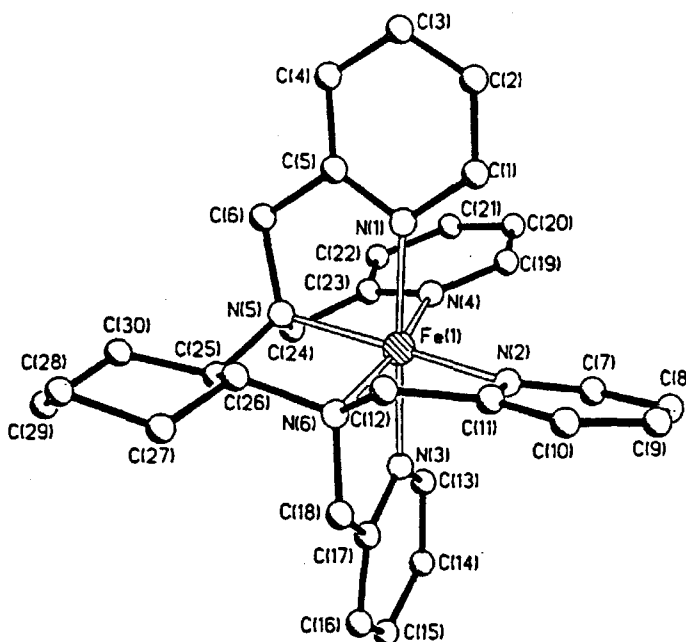
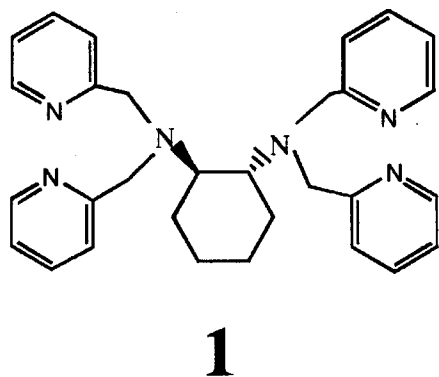
好熱性細菌は高温環境で生息するために溶存酸素を活用するオキシダーゼ系の耐熱性酵素をほとんど産生しない。そのため現在は好熱性細菌の耐熱性キナーゼ系および耐熱性デヒドロゲナーゼ系の酵素を用いる電流計測型のバイオセンサの開発とその応用の研究を進めている。

## 5. スーパーオキシドジスムターゼ活性を有する分子錯体の分子認識

生体中には白血球などからでるスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) という活性酸素種が存在して、免疫作用、特に病原菌の殺菌作用などに重要な役割を演じている。スーパーオキシドは殺菌作用後に酸化力が強いために、生体中に残存すると細胞のDNAなどに損傷を与えて、発がんなどに関係してくるので、直ちに消去しなければならない。スーパーオキシドを消去する酵素はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) で、つぎの不均化反応を触媒する。



自然界には広く存在するSODは金属酵素で、活性中心の配位金属の種類により3種類に大別される。配位金属としてはFe, Mnなどの1核金属酵素とCu-Znの2核金属酵素などの3種類が知られている。著者らは1992年からSOD模擬人工酵素を目指して、ジアミン類を配位子とした遷移金属錯体を合成して、SOD活性を調べていった。エチレンジアミンを3分子配位させたトリスエチレンジアミンFe(II)錯体でも弱いSOD活性を示した。



**Fig.3 Structures of TPCN (1) and  $[Fe(TPCN)](ClO_4)_2$  based on a single-crystal X-ray structure (19).**

種々文献を調査しながら配位子を検討したが、著者らはFig.3に示すように光学活性なシクロヘキサレンジアミンを基本骨格としたテトラキス(2-ピリジルメチル)-トランス-1,2-シクロヘキサレンジアミン(TPCN) (1)を配位子とするFe(II)錯体  $[Fe(TPCN)]$  がスーパーオキシドを分子認識して、天然のスーパーオキシドジスムターゼに匹敵するような高いSOD活性を示すことを見出した<sup>18)</sup>。この錯体は1993年にMcCuskerらによりX線解析が行われ、 $[Fe(TPCN)]$ の3次元構造はFig.3に示すように決定された<sup>19)</sup>。そこでこの錯体がなぜSOD活性が高いのかという原因について調べるため、著者らは酸化還元電位、可視紫外吸収スペクトルの時間変化などの測定を行い、中心金属のFe(II)がFe(III)に周期的に酸化還元されていることを明らかにした<sup>20)</sup>。天然の酵素も中心金属の酸化還元サイクル機構によって高速度でスーパーオキシドを不均化しているので、 $[Fe(TPCN)]$ の高SOD活性の原因の一部が酵素錯体モデルによって解明されたことは意義深い。さらに、 $[Fe(TPCN)]$ をナフィオン膜に吸着固定化するとスーパーオキシドを計測できるスーパーオキシドセンサを構築

することができることも示された<sup>1,3)</sup>。

しかし [Fe(TPCN)] のようなSOD酵素模擬金属錯体の場合、過酸化水素とかヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ ) 共存下では (2) の反応以外の副反応も促進することがあり、SOD酵素のようにスーパーオキシドだけに高い分子認識機能をもたせることは困難であることも分かった。近年SODがスーパーオキシドだけを分子認識して不均化するの、酵素の活性中心の入り口のタンパク部位に存在しているスーパーオキシドだけを認識するチャンネル構造が重要な役割を演じていることが明らかにされている。

## 6. 超分子化学との出会い

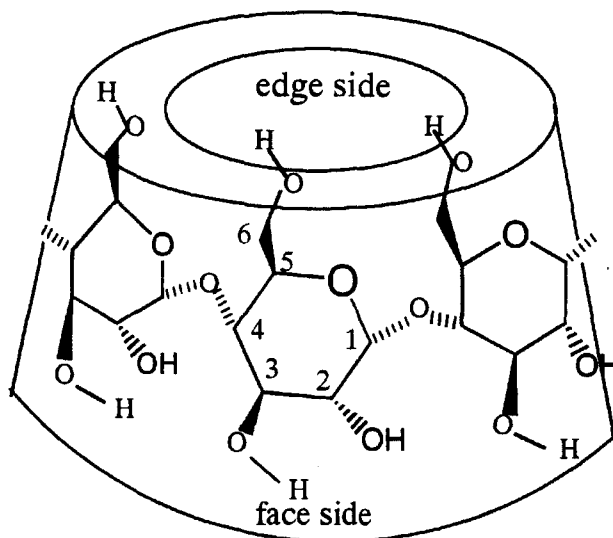
著者は埼玉大学に赴任してから2年目の1978年10月に当時フランスのストラスブール大学のJean-Marie Lehn教授の講演を埼玉大学で拝聴し、感銘を受けた経験がある。Lehnは1978年に超分子化学を提唱して世界を股に掛けて講演され、日本にも立ち寄られ、熱気あふれる講演をされた。講演内容は人工酵素触媒設計、電子チャンネルの分子設計、金属レセプターの多重認識などであったが、印象深いものがあった。

Lehnは1987年にこれらの研究成果が評価されて、超分子化学 (supramolecular chemistry) の研究でノーベル化学賞を受賞している。生体の分子認識デバイスとその特異性は実に巧妙で精緻なものであるが、一つ一つの機能はblack boxの中に覆われ解明が困難なものが多い。Lehnのコンセプトは分子設計の手法で合成できる人工モデル系を構成し、非共有結合的な分子認識を基本にとらえれば、解明困難な生体系の現象はより具体的に明らかにされるという発想が中核になっている。

著者らは埼玉大学工学部に学際科学をめざす機能材料工学科を新設するように努力し、1992年にその夢を実現させた。新学科には機能量子工学と機能生体分子工学の2大講座を配置し、5つの研究分野が設けられた。このうち機能生体分子工学講座には分子設計工学、分子デバイス工学、生体高分子工学の3研究分野が設置された。著者は分子デバイス工学の分野を担当することになった。これを機会に新進気鋭な石丸雄大助手を共同研究者に招いて、長年抱いていた生物無機化学の研究を一段と進展させる超分子化学の研究を開始した。

## 7. 超分子シクロデキストリンダイマーの分子認識機能

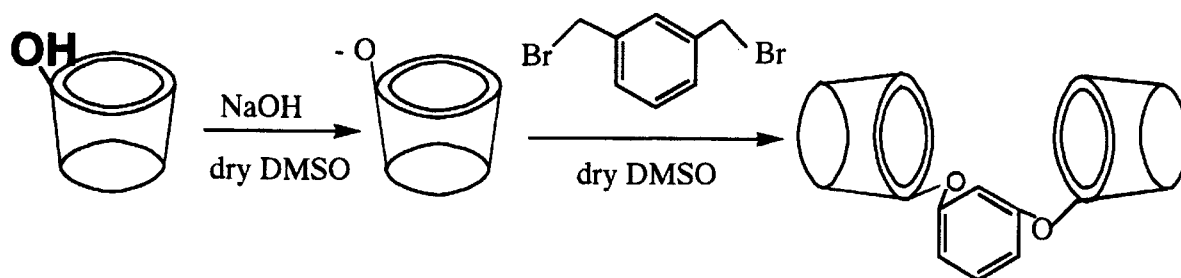
シクロデキストリン (CD) は一般にD-グルコースが $\alpha$ 1-4で連結したグルコース残基が6から8個からなる円環状のオリゴ糖分子で、環の中の空洞は疎水的であり、キャビティーに疎水分子を特異的に分子認識・包接するので、超分子化学の立場から人工酵素の結合部位または抗体モデルとして研究されている。



**Fig.4 Structure of cyclodextrin**

CDの1分子にはFig.4に示すように18~24個の水酸基があり、face側の水酸基はグルコースの2, 3位の炭素に結合した二級水酸基であり、edge側の水酸基はグルコースの6位炭素に結合した一級水酸基である。

Breslowらはedge-to-edge CD 2量体がある種のホスト分子と抗原-抗体の結合に匹敵するほどの大きな結合定数  $10^8 \text{ M}^{-1}$  をもつことを見出し、抗原-抗体の強い結合も人工モデル系で実現できることを実証している<sup>21)</sup>。



**Fig.5 Synthetic scheme of a secondary face-to-face cyclodextrin at each 2-position ( 22 ).**

そこでわれわれの研究室ではFig.5に示すように、2モルのCDをdry-DMSO中でNaOH存在下で2,2'-ビスブromoメチルベンゼンのようなリンカーと反応させるとそれぞれのCDの2位の炭素の水酸基に結合したface-to-face CDダイマーが収率よく合成されることを見出した<sup>22)</sup>。この新しいface-to-face CDダイマーはホスト分子を高い結合定数で分子認識することができるだけでなく、各種のホスト分子をダイマー分子カプセルとして包接するので、食品化学、物質分離材料、医薬品、化粧品、農薬、繊維および樹脂などのコーティング剤、ドラッグデリバリーシステム (DDS)などの広範な分子デバイス分野に応用されることが期待される。

## 8. おわりに

ここで紹介したように、近年バイオセンサもレセプターとして超分子の分子認識デバイスを利用する研究が多く報告されるようになり、両者のバイオミメティックな接点はますます密接さを増し、分子認識デバイスとしての応用を拡げつつある。今後の超分子デバイス分野の研究の進展に期待したい。

最後に耐熱性酵素を利用するバイオセンサの研究では国立リハビリテーションセンター研究所の碓山義人研究部長、本学情報システム工学科の勝部昭明教授と機能材料工学科の伏見謙教授に有益なご助言をいただいた。またスーパーオキシドデスムターゼ模擬人工酵素錯体の研究は、いつもお世話になっている分析センターの佐藤勝助教授との共同研究である。さらにシクロデキストリンの研究に関して機能材料工学科の葛原弘美教授から有益なご助言をいただいた。研究に果敢に挑戦し、推進してくれた本学大学院生、留学生、卒研究生と共に感謝申し上げます。

## References

- 1) K.Imahori et al, *Scientific Reports for Subsystem of Bioreactor*, 101-110 (1979)
- 2) T.Iida, S.Machida, N.Iijima, T.Mitamura, *Proc. of 1st Internat. Meeting on Chemical Sensors, Fukuoka*, 613-636 (1983)
- 3) T.Kawabe, T.Iida, N.Iijima, T.Mitamura, M.Hara, T.Katsube, *Denki Kagaku*, **53**, 514-515 (1985)
- 4) T.Iida, N.Iijima, M. Hisatomi, T.Mitamura, *Denki Kagaku*, **54**, 290-291 (1986)
- 5) T.Iida, T.Kawabe, M.Hisatomi, T.Mitamura, *Proc. of 2nd Internat. Meeting on Chemical Sensors, Bordeaux*, 592-595 (1986)
- 6) M.Hisatomi, T.Iida, T.Mitamura, K.Nagata, K.Tomita, *Denki Kagaku*, **55**, 67-68 (1987)
- 7) T.Iida, T.Kawabe, F.Noguchi, T.Mitamura, K.Nagata, K.Tomita, *Nippon Kagaku Kaishi*, **1987**, 1817-1821
- 8) T.Kawabe, T.Iida, F.Noguchi, T.Mitamura, T.Katsube, K.Tomita, *Denki Kagaku*, **55**, 446-451 (1987)
- 9) T.Kawabe, T.Iida, F.Noguchi, T.Mitamura, T.Katsube, K.Tomita, *Nippon Kagaku Kaishi*, **1987**, 1719-1724

- 10) T.Iida, Y.Ogura, H.Kobayashi, T.Mitamura, K.Nagata, K.Tomita, *Denki Kagaku*, **56**, 1118-1119 (1988)
- 11) T. Iida, K.Kikumoto, M.Yazawa, *Sci. Eng. Reports, Saitama University*, **24**, 46-50 (1990)
- 12) T.Iida, K.Kikumoto, Y.Mori, *Reports of Asahi Glass Foundation*, **59**, 279-284 (1991)
- 13) T.Iida, T.Yamanaka, M.Nakagawa, H.Hokazono, Y.Mori, M.Sato, *Proc. of 4th Internat. Meeting on Chemical Sensors, Tokyo* 654-655 (1992)
- 14) T.Iida, K.Aoki, S.Matsuoka, Y.Ishimaru, *Proc.of 6th Internat. Meeting on Chemical Sensors, Gaithersburg, USA*, 10 (1996)
- 15) T.Iida, K.Aoki, T.Kawabe, Y.Ishimaru, *Sci, Eng, Reports,Saitama University*, **30**, 9-14 (1997)
- 16) T.Iida, K.Aoki, Y. Ishimaru, *Proc. 7 th Internat. Meeting on Chemical Sensors, Beijing* , 915-917 (1998)
- 17) T.Iida, *CACS Forum*, **6**, 29-38 (1986), T. Kawashima, T. Iida, *Sensor Technology*, **6**, 45-54 (1986), T.Iida, *Chemical Industry*, **32**, 257-262 (1987), T.Iida, *Cell Technology*, **17**, 559-564 (1988) T.Iida, *BIO INDUSTRY*, **6**,53-61 (1989)
- 18) M.Sato, Y.Mori, T.Iida, *Synthesis*, 539-540 (1992), Y.Mori, M.Sato, T.Iida, *Chem. Lett.* 469-472 (1992)
- 19) J.K.McCusker, H.Toftlund, A.L. Rheingold, D.N. Hendrickson , *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1797-1804 (1993)
- 20) M.Nakagawa, K.Hanaoka, A.Terasaki, Y.Mori, H.Hokazono, M.Sato, T.Iida, *Chem. Lett.*, 1721-1724 (1994)
- 21) R.Breslow, N.Greenspoon, T.Guo, R.Zarzycki, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8296-8302 (1986)
- 22) Y.Ishimaru, T.Masuda, T.Iida, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3743-3744 (1997)