

## 疾病診断に向けてのガレクチン-3 センシング†

菅原一晴\*, 門屋利彦\*\*

### 1 はじめに

ガレクチン-3(Gal-3)は、 $\beta$ -ガラクトシドと結合するガレクチンファミリーの一つであり、単一の糖認識ドメインをもつ分子量 26kDa のタンパク質である<sup>1)</sup>。動物の生体内に存在する Gal-3 は、細胞内では核と細胞質に分布し、正常組織ならびに種々の腫瘍で広く発現している<sup>2)</sup>。Gal-3 は、好中球<sup>3)</sup>、肥満細胞<sup>4)</sup>および好酸球のマクロファージ<sup>5)</sup>と結合して活性化することが知られている。また、細胞の増殖、接着、分化、アポトーシスや血管新生、免疫応答、新生物形質転換および転移を含む様々な生物学的プロセスに関係している<sup>6)</sup>。例えば、Gal-3 の血清中の濃度レベルは、腫瘍の炎症で上昇する<sup>7)</sup>。一方で、血清中での Gal-3 濃度の増加は急性非代償性心不全や慢性心不全で死亡するリスクを高める<sup>8)</sup>。このようなバックグラウンドから、血液中の Gal-3 含量変化をモニターすることは、種々の腫瘍や心血管疾患に関する疾病診断ならびに進行を予測するために重要である。一般的に Gal-3 の定量分析は、酵素結合抗体免疫測定法(ELISA)が使われる。ELISA には、高感度・高選択的な手法であるが、操作が煩雑であり熟練を要する。そこで本トピックスでは、Gal-3 をターゲットとした電気化学的イムノアッセイ、ラベルフリーグラフェン酸化物を用いた表面プラズモン共鳴センサ、蛍光ナノ粒子やフォトプローブと蛍光物質を組み合わせた手法を取り上げ紹介する。

### 2 N-GNRs-Fe-MOFs@Au ナノ粒子と AuPt-メチレンブルーナノロッドを用いた Gal-3 検出のためのイムノセンサ

Tang らは、心臓疾患のバイオマーカーである Gal-3 を検出する電気化学的イムノセンサを考案した<sup>9)</sup>。電気化学的免疫センサは、高い測定感度とその操作性などからバイオマーカーを測定する手法として広く使用されている。最初に窒素がドーピングされた多層カーボンナノチューブから N-グラフェンナノリボンが合成された(N-GNRs)。N-GNRs は、電極の表面の伝導率を向上させるために用いられる。金属有機的なフレームワーク(MOFs)は、結晶質の多孔性材料であり触媒作用とセンサ材料として有用である。その中で、高い安定性と大きな表面積をもつ Fe ベース有機金属フレームワーク(Fe-MOFs)を選択した。Fe-MOFs は、塩化鉄と 2-アミノテレフタル酸から調製された。これに塩化金酸を加え水素化ホウ素ナトリウムと反応させることで Fe-MOFs@Au ナノ粒子が得られた。N-GNRs-Fe-

MOFs@Au ナノ粒子は、Fe-MOFs@Au ナノ粒子と N-GNRs を水中に加え超音波をかけ、遠心することで調製された。そして、この粒子をグラッシーカーボン電極表面に修飾し、電極表面に Gal-3 に対する一次抗体(Gal-3-Ab1)を固定化した。一方で、選択的応答と増幅機能を有するサンドウィッチ型センサを構築するため、MB に塩化金酸と塩化白金酸を作用させ合成した AuPt-MB に Gal-3 に対しての二次抗体(Gal-3-Ab2)を結合させた。Gal-3 が溶液に加えられるとき、電極表面では Gal-3 が各抗体と結合し(AuPt-MB-Ab2)-Gal-3-(N-GNRs-Fe-MOFs@AuNPs-Ab1)が形成するため感度よく Gal-3 が検出される。その検量線は 100 fg/mL から 50 ng/mL であり、検出限界は 33.33 fg/mL (S/N=3)であった。デザインされたセンサは、高い選択性と再現性、安定性を有している。また、ヒト血清サンプル中に Gal-3 を添加した際の回収率は 98 - 105%であった。ELISA 法によって得られた Gal-3 の測定値と電気化学的手法での測定値とを比較したところよい一致を示した。

### 3 心臓病のバイオマーカーである Gal-3 を検出するためのラベルフリーグラフェン酸化物を用いた表面プラズモン共鳴イムノセンサの開発

Primo らは、バイオ認識機能をもつ抗 Gal-3 抗体と Gal-3 の結合情報を変換する表面プラズモン共鳴法(SPR)を使って心臓病のバイオマーカーとなる Gal-3 を検出するセンサを構築した<sup>10)</sup>。本バイオセンサの特長は、リアルタイムで迅速にラベルフリーな検出を可能にすることにある。センサの作製法は以下の通りである。まず、Au 基板をナトリウム 3-メルカプト-1-プロパンスルホン酸塩でチオール修飾[Au/3-メルカプト-1-プロパンスルホン酸ナトリウム(MPS)]した。続いて、ポリ(アリアルジメチル)アンモニウム(PDDA)とグラフェンを交互積層法によって固定化した。その後、3-アミノフェニルボロン酸を共有結合によって修飾した。形成された表面には抗 Gal-3 抗体を固定し、ターゲットである Gal-3 がトラップして SPR 測定を行った。3-アミノフェニルボロン酸を使用することの意義は、抗 Gal-3 抗体の配向を制御するためである。具体的には、抗 Gal-3 抗体の Fe 領域でセンサと固定し、抗体と Gal-3 が特異的に結合し易くしている。センサの特性は、先の交互積層数に影響されることが電子顕微鏡や電気化学的スキャン顕微鏡、SPR 測定によって明らかとなった。構築されたバイオセ

† 原稿受理 令和2年2月28日 Received February 28, 2020

\* 教職センター(Teaching Profession Center)

\*\* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

ンサの性能については, Gal-3 の測定範囲は 10.0 から 50.0 ng/mL で直線関係となり検出限界は 2.0 ng/mL であった. 30.0 ng/mL となるように Gal-3 を添加し 3 倍に希釈されたヒト血清サンプル中での回収率は 108% になった. これらの結果は, 本センサがヒト血清サンプル中の Gal-3 のセンシングに適用できることを示している.

#### 4 Gal-3 に関する糖質-置換テトラフェニルエテンに基づいた蛍光ナノ粒子プローブの構築

凝集誘導発光-活性ナノ粒子プローブは, バクテリアや核酸などの検出において非常に有用性が高い. そのプローブとしてテトラフェニルエテン(TPE)は, 470 nm 付近に蛍光応答を示すため, 蛍光プローブとして広く使われている. Zhang らの研究グループは, このような TPE の性質を踏まえて Gal-3 と結合する糖質である *N*-アセチルラクトサミン(LacNAc)に TPE を修飾した蛍光ナノ粒子プローブをデザインすることで Gal-3 測定方法を開発した<sup>11)</sup>. 最初に TPE にガラクトシド残基である LacNAc を二分子修飾したプローブを合成した. 次に Gal-3 と LacNAc-TPE プローブを反応させると, Gal-3-LacNAc-TPE 複合体を形成して均一なナノ粒子として凝集する. TPE と Gal-3 との結合と同時に, 上記複合体形成に基づいて TPE の蛍光強度が増大するために, 蛍光強度の変化から Gal-3 がセンシングされる. この蛍光アッセイによる Gal-3 の検出は迅速で感度が高く, 特異的検出が可能となる. 健常者の血清中の Gal-3 濃度レベルは 20 - 313 ng/mL である. 一方, ガン患者の血清中の Gal-3 の濃度は 950 ng/mL 程度であり高いレベルの値を示す. TPE(LacNAc)<sub>2</sub> を用いた Gal-3 の検出限界は 430 ng/mL (n=3) で病理上のレベルはクリアしている. また, 本アッセイは干渉物質の影響が小さいため血清サンプルへ適用できることから, ガン診断の有用なツールとなる.

#### 5 高性能ペプチドフォトプローブによる Gal-3 の蛍光センシング

Gal-3 を可視化センシングするためにフォトプローブが合成され, ゲル上で蛍光分光法により検出する手法が提案された<sup>12)</sup>. そのフォトプローブは Gal-3 と選択的に結合するアミノ酸 15 残基から成るペプチドの N-末端にベンゾフェノンを導入したものである. 測定の最初のステップは, プローブと Gal-3 とを混合し 366 nm の光を照射した後, フルオレセイン-N<sub>3</sub> を加えた. 次に, その試料を SDS-PAGE で分離して蛍光スキャンニングを実施した. 本手法の実用性を明らかにするために, 大腸菌タンパク質抽出物(4 μg)に 50, 100, 150 ng の Gal-3 を添加したところ, それぞれ明瞭なバンドが観察された.

#### 6 まとめ

Gal-3 の生体内でのモニタリングは細胞間相互作用を明らかにするうえで重要である. さらに, 血清中の Gal-3 のセンシングはガンや心臓病の診断に寄与するため簡便・迅速で低コストで臨床的現場でも使用できる機器の

開発が求められている. 今回, Gal-3 に対する電気化学的センサ, SPR センサ, 蛍光ナノ粒子, 蛍光ペプチドプローブに基づいた測定法を紹介した. しかしながら, 上記条件を満たした Gal-3 をターゲットとしたセンシング法の報告例は少ない. 今後, 生体分子との相互作用した新規の Gal-3 センシング法の開発が期待される.

#### 参考文献

- 1) S. Kuklinski et al., Homophilic binding properties of galectin-3: Involvement of the carbohydrate recognition domain, *J. Neurochem.*, **70**, 814-823 (1998).
- 2) C. Greco et al., Cell surface overexpression of galectin-3 and the presence of its ligand 90k in the blood plasma as determinants in colon neoplastic lesions, *Glycobiology*, **14**, 783-792 (2004).
- 3) I. Kuwabara et al., Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin, *J. Immunology*, **156**, 3939-3944 (1996).
- 4) H.Y. Chen et al., Role of galectin-3 in mast cell functions: Galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression, *J. Immunology*, **177**, 4991-4997 (2006).
- 5) S. Dong et al., Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen), *Glycoconjugate J.*, **14**, 267-274 (1997).
- 6) M. Le Mercier et al., Galectins and Gliomas, *Brain, Pathol.*, **20**, 17-27 (2010).
- 7) M. Xin et al., Role of the interaction between galectin-3 and cell adhesion molecules in cancer metastasis, *Biomed. Pharmacother*, **69**, 179-185 (2015).
- 8) B. Indumathi et al., A review on application of biomarkers in heart failure, *Indian J. Biochem. Bio.*, **55**, 303-313 (2018).
- 9) Z. Tang et al., A sensitive sandwich-type immunosensor for the detection of galectin-3 based on N-GNRs-Fe-MOFs@AuNPs nanocomposites and a novel AuPt-methylene blue nanorod, *Biosens. Bioelectron.* **101**, 253-259 (2018).
- 10) E.N. Primo et al., Label-free graphene oxide-based surface plasmon resonance immunosensor for the quantification of galectin-3, a novel cardiac biomarker, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **10**, 23501-23508 (2018).
- 11) Z. Zhang et al., A fluorescent nanoparticle probe based on sugar-substituted tetraphenylethene for label-free detection of galectin-3, *J. Mater. Chem. B*, **7**, 6737-6741 (2019).
- 12) M. van Scherpenzeel et al., Detection of galectin-3 by novel peptidic photoprobes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 376-378 (2007).