

## タンパク質センシングのための電気化学インピーダンス分光法†

菅原一晴\*, 門屋利彦\*\*

## 1 はじめに

電気化学インピーダンス分光法 (Electrochemical impedance spectroscopy: EIS) は、電極表面で起こる界面の状態変化を感度よく測定できる方法である。そのため、有機配位子を修飾した電極での金属イオンの定量<sup>1)</sup>、金属酸化物を固定化した電極での食品中のスーダン色素の検出などが行われてきた<sup>2)</sup>。また、ターゲットタンパク質を認識する分子を固定化した電極がデザインされるならば、電極/溶液界面の性質を大きく変化させることが予想される<sup>3)</sup>。このような相互作用が起こる場合、その相互作用を EIS によってモニタリングすることができる。さらに、タンパク質の濃度に依存して交流抵抗が変化する場合、タンパク質のセンシングが可能となる。ここでは、ターゲットタンパク質を EIS でセンシングするためのプローブタンパク質あるいはアプタマー修飾電極によるターゲットタンパク質の測定例を紹介する。

## 2 タンパク質-タンパク質間相互作用を利用したターゲットタンパク質の検出

## 2・1 コラーゲンコーティンググラッシーカーボン電極によるグリアジンの測定

グリアジンは、小麦アレルギーの抗原であり食物依存性運動誘発アナフィラキシーを引き起こす可能性が高い。そのため、食品中のグリアジンの含有量をモニタリングする迅速で簡便な方法が必要とされている。Fernandes の研究グループはグリアジンの電気化学的センサを考案した<sup>4)</sup>。センサの測定原理を以下に述べる。最初に電極表面にコラーゲンをコーティングし膜化させた。次に、トランスグルタミナーゼ (transglutaminase: TG) は、タンパク質のグルタミン側鎖とタンパク質のリジン側鎖を架橋する機能を有しているため、TG によってグリアジンとコラーゲンとが結合する際の電荷移動抵抗の変化を測定することでグリアジンをキャプチャーした。また、グリアジンを抗-グリアジンポリクローナル抗体で認識することで、先の結合の特異性を確認している。さらに、グリアジンの選択性に関して評価したところ、大豆タンパク質やカゼインのようなタンパク質が引き起こすグリアジンへの干渉をこの手法を用いることで抑制できることが分かった。ナイキストプロットから測定された電荷移動抵抗の変化は、5 から 20 mg L<sup>-1</sup> グリアジンの濃度で比例した。それゆえ、本手法はグルテンを含まない食品中のグリアジンをセンシングするための有用な手法である。

## 2・2 EIS によるタウタンパク質に対するフェリチンとトランスフェリンの結合の評価

タウタンパク質はアルツハイマー型認知症に関係する神経変性バイオマーカーであり、その疾病の症状として脳内の鉄イオンの濃度が上昇する。鉄イオンの高濃度化の原因としては、タウタンパク質のメタレーションと活性酸素の生成におけるそれらの触媒的な作用が神経変性に関与していると考えられている。鉄イオンの生物学的供給源の 1 つは鉄結合性タンパク質であり、フェリチンまたはトランスフェリンがあげられる。Jahshan らは、タウタンパク質と鉄結合性タンパク質との相互作用を評価する試みの一つとして、鉄結合性タンパク質-タウタンパク質間相互作用を EIS によって測定した<sup>5)</sup>。具体的にはフルサイズのタウ 441 タンパク質を、その N 末端あるいはシステイン残基を介して金電極表面に修飾した。そして、修飾電極を使って鉄リッチタンパク質であるトランスフェリンとフェリチン、それらのアポ体のタンパク質との相互作用を電荷移動抵抗の変化を使って評価した。測定結果から、タウタンパク質はフェリチンに対する結合力は弱く、トランスフェリンと強く相互作用し、トランスフェリンとの結合は濃度に依存することが見出された。電荷移動抵抗の増加はトランスフェリンの濃度が 50 mg mL<sup>-1</sup> 以上で観察された。この理由は、フェリチン-タウタンパク質間の結合形態がトランスフェリン-タウタンパク質間の結合形態とは異なることに起因する。アポ体フェリチンやアポ体トランスフェリンとタウタンパク質膜との相互作用と各ホロ体のタンパク質と比較すると、それらの結合は金属イオンの有無にも関与して変化することが明らかとなった。それゆえ、タンパク質-タンパク質間相互作用には金属イオン効果が重要であった。従って、上述のタンパク質修飾電極を使用することで金属イオンやタンパク質の形態がもたらすタンパク質間結合への影響をモニタリングできる。

## 2・3 ヒト前立腺酸性ホスファターゼセンシングのための光学的電気化学的センサの開発

ヒト前立腺酸性ホスファターゼ (h PAP) を検出するためのラベルフリーの電気化学的バイオセンサが開発された<sup>6)</sup>。一般に、EIS 測定のための電気化学的マーカーイオンとしては [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup>/[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> が用いられる。一方で、幾つかの研究では電極表面にフェロセンを修飾して、その電荷移動抵抗を測定する手法が提案されている。

抗-前立腺酸性ホスファターゼ抗体修飾電極の作製は次の通りである。金ディスク電極をアルミナで研磨し水

† 原稿受理 平成 31 年 2 月 28 日 Received February 28, 2019

\* 教職センター (Teaching Profession Center)

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

酸化カリウムで処理した。エタノールで洗浄後、硫酸中でサイクリックボルタンメトリーにより電位が掃引された。その電極表面にペグ化されたチオール(HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(EG)<sub>3</sub>-OCH<sub>2</sub>-COOH)と11-フェロセニルウンデカンチオール(HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Ferrocene)を修飾し自己組織化単分子層を作製した。続いて、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと*N*-ヒドロキシスクシンイミドでカルボキシル基を活性化した。そして、抗-前立腺酸性ホスファターゼ抗体を固定化している。

*h*PAPの測定には、抗-前立腺酸性ホスファターゼ抗体との結合によって生じる界面変化を反映するところのインピーダンス測定から派生したイミタンス機能を使用した。*h*PAPに基づく応答は、様々なターゲットの濃度でPBS中において周波数を広範囲で変化させて行われた。その際の*h*PASの検出範囲は20から5000 pMであり検出限界は10 pMであり、ヒト血清中のバイオマーカーとして前立腺ガンを診断する感度としては十分であった。加えて、測定時間と解析時間は数分であり*h*PAPの測定をラベルフリーで迅速に高感度な測定を可能とした。

### 3 ターゲットタンパク質の検出のための アプタマー固定化電極の考案

#### 3・1 トロンピン-アプタマー間相互作用を利用した ターゲットタンパク質の検出

Ocañaらのグループはアプタマーサンドウィッチプロトコルを使ってトロンピンの高感度検出に関するための3つの特異的な方法を提案した<sup>7)</sup>。その手法は、最初に電極表面にアビジンを修飾してビオチン化したトロンピンアプタマー1をアビジン-ビオチン間結合を介して固定化した。次に、トロンピンをアプタマー1と反応させた後にビオチン化したトロンピンアプタマー2を結合させた。そして、1) その複合体にストレプトアビジンを固定化したナノ粒子に銀を作用させトロンピンを測定した。2) 銀と同様に金による増幅法も行った。3) 西洋ワサビペルオキシダーゼと3-アミノ-9-エチレンカルバゾールとを組合せた手法により検出した。これらの特性は、[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup>/[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>をマーカーとしてEISによって解析された。結果として、金を用いたアプローチでの再現性が最も高く、pMのトロンピンを相対標準偏差8.8%(n=5)で測定でき、銀で処理した場合の検出限界は0.3 pMであった。また、銀や金で処置をした際には走査電子顕微鏡での電極表面観察を可能とした。銀に関しては電極表面で単結晶が析出し、金では球体のナノ粒子を形成していた。それゆえ、その形状に依存した特性が現れているものと考えられた。

#### 3・2 シトクロムc-アプタマーバイオコンジュゲート 銀クラスターを使ったシトクロムcの検出

シトクロムcをEISセンシングするためのアプタセンサが考案された<sup>8)</sup>。この手法の特長は、金電極に修飾された銀ナノクラスターの伝導性、生体適合性、大きな表面積、アプタマーとの高い親和性にある。測定のために

アプタマーコンジュゲート銀ナノクラスターが合成され、金電極表面に固定化された。EISでのシトクロムcの検出範囲は、0.15から375 nMで直線となり、検出限界は72 pMであった。調製されたナノクラスターの表面での銀イオンの存在は、金電極表面上に結合するシステインのドナーグループに対しての親和性を増加させた。ナノクラスターは、伝導性ホルダーの役割を果たし、低コストのDNAシーケンスを固定化するための支持体として優れていた。

## 4 まとめ

EISはタンパク質センシングに関して非常に有用なアプローチとなっている。ターゲットタンパク質の分子認識は、ターゲットタンパク質-プローブタンパク質相互作用やタンパク質-アプタマー間相互作用などに基づいている。EISはラベルフリーでターゲットタンパク質を検出できるという利点があり、医療や食品分析などの分野でも応用されている。今後の課題は、高感度で可逆性の高い電気化学的マーカーを合成することである。上記性質をもつマーカーを開発することができれば、よりいっそうの展開が期待できる。

## 参考文献

- 1) J. Gayathri et al., A novel sensor for the determination of Hg<sup>2+</sup> in waters based on octadentate ligand immobilized multi-walled carbon nanotube attached to paraffin wax impregnated graphite electrodes (PIGE), *J. Solid State Electrochem.*, **22**, 2879-2888 (2018).
- 2) M. Heydari, Chemometrics-assisted determination of Sudan dyes using zinc oxide nanoparticle-based electrochemical sensor, *Food Chem.*, **283**, (2019) 68-72.
- 3) J.S. Daniels et al., Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges, *Electroanalysis*, **19**, 1239-1257 (2007).
- 4) F. Bottari et al., Impedimetric sensing of the immunoenzymatic reaction of gliadin with a collagen-modified electrode, *Electrochem. Commun.*, **97**, 51-55 (2018).
- 5) A. Jahshan et al., Evaluation of ferritin and transferrin binding to tau protein, *J. Inorg. Biochem.*, **162**, 127-134 (2016).
- 6) F.C.B. Fernandes, et al., Optimized electrochemical biosensor for human prostatic acid phosphatase, *Sens. Actuat. B*, **253**, 1106-1112 (2017).
- 7) C. Ocaña et al., Three different signal amplification strategies for the impedimetric sandwich detection of thrombin, *Anal. Chim. Acta*, **912**, 117-124 (2016).
- 8) M. Shamsipura et al., Impedimetric monitoring of apoptosis using cytochrome-c aptamer bioconjugated silver nanocluster, *Biosens. Bioelectron.*, **90**, 195-202 (2017)