

## 生物活性物質を認識し情報変換する膜界面の創製と化学センシング法への応用

Novel sensing membranes that recognize bioactive substances and transduce their signals

代表研究者	東京大学大学院理学系研究科化学専攻 Prof., School of Science, University of Tokyo	梅澤 喜夫 (Yoshio Umezawa)
共同研究者	東京大学大学院理学系研究科化学専攻 Associate Prof., School of Science, University of Tokyo	菅原 正雄 (Masao Sugawara)
	東京大学大学院理学系研究科化学専攻 Instructor, School of Science, University of Tokyo	遠田 浩司 (Koji Tohda)
	東京大学大学院理学系研究科化学専攻 Instructor, School of Science, University of Tokyo	ビュールマン フィリップ° (Philippe Buhlmann)

We describe our recent approaches toward developing new molecular sensing membranes for bioactive ions and molecules. Among various mode of transmembrane signaling, main focus was placed on (i) membrane permeability change, (ii) active transport of target compounds and (iii) membrane potential change. Taking advantage of these three modes of transmembrane signaling, new biomembrane mimetic sensors, e.g., ion channel sensors, active transport sensors and biomimetic ion sensors, have been developed based on both synthetic and biological receptors. The principle and unique features of these molecular sensors are described.

### 研究目的

生体膜でのレセプター蛋白質による分子認識とそれに引き続く情報変換及び膜を横切る情報伝達 (transmembrane signaling) は、基質の構造認識が多く共有結合によらない選択的かつ精密な多点認識によること、それに引き続く情報変換、伝達はしばしば増幅を伴うことなど、物質を高感度、高選択的に検出する化学センシング膜を開発するための新しい原理として興味深い。著者らは、(1) 膜を介してのイオン流速の急激な変化、(2) 能動輸送、(3) 膜界面での電荷分離を物質認識、情報変換の原理とする新しいタイプの化学センシング法の開発及び基礎研究を人工系及びバイオ系両面からのアプローチにより行っている<sup>1)</sup>。

### 研究経過及び成果

#### 1 膜透過性変化に基づく化学センシング

生体膜においてリガンド作動性イオンチャンネル蛋白質は、目的化学物質の受容に伴って起こるチャンネルの開閉に基づいて、膜透過性を急激に変化させる。筆者らは、このような膜透過性制御モードをシグナル増幅の原理として取り入れた新しいタイプの化学センサーとして、“イオンチャンネル

センサー”へのアプローチを試みている。

人工系を用いたアプローチとして、これまでに目的物質(ゲスト)に対するレセプター(ホスト)を埋め込んだ Langmuir-Blodgett (LB)型センシング膜を作製した。種々のゲスト1~7(図1)との錯形成により誘起されるホスト分子間隙の透過性の変化を、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 等の酸化還元活性種を膜透過性マーカーとして用いることによって、サイクリックボルタメトリー(CV)により調べた<sup>1)</sup>。これらのセンサーにおいてはそれぞれのホストの錯形成特性を反映した選択的CV応答が観測された。このアプローチに基づいて、最近、筆者らは、ホストとしてカリックス[n]アレン6, 7を用い、その圧縮単分子膜がアルカリ金属イオンとのホスト-ゲスト錯形成によって膜透過性の変化を引き起こすことを見出した<sup>2)</sup>。また、トブチルカリックス[6]アレンを長鎖フルオロアルキルシラン誘導体の自己集合膜上に安定に固定化する方法を開発し、このホストの分子分解能のAFM像を得ることに成功した<sup>3)</sup>。更に分子間隙の透過性に基づくセンサーの感度に影響を与えるバックグラウンド透過性を検討し、膜電荷密度、マーカーのサイズ、疎水性等がその大きさを決定する重要な因子であることを示した<sup>4)</sup>。

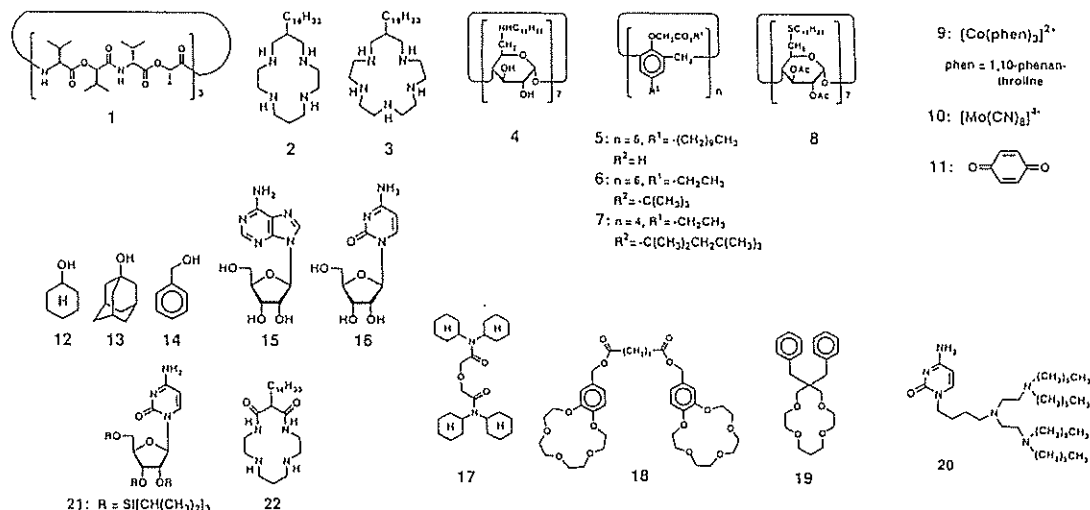


図 1 本研究に用いたホストの構造

更に、静電的相互作用によるマーカー透過性の制御を原理として、短い炭素鎖をもつリン酸チオール化合物を金電極に self-assembly 法による修飾したチャンネルセンサーを試みている。上述のようにできる限り密なホスト膜を用いるのではなく、このアプローチでは、より遠距離で働く静電的相互作用を用いるために、膜表面でホスト分子が密に配向している必要はない。

一方、生体のイオンチャンネルにおけるような極めて効率的なイオン透過を可能とする人工的な“イオンチャンネルセンサー”の開発のためには、分子間隙における膜透過性制御から発展して、分子内チャンネルにおける透過性制御の実現が肝要となる。筆者らは長鎖アルキル型シクロデキストリン誘導体の分子内チャンネル機能を実験的に確認するために、ラングミュア水槽中の水溶液上にホスト 8 の圧縮単分子膜を形成し、内孔（チャンネル入口）を通過できない大きさのマーカー（9, 10）と通過できる大きさのマーカー（11）について、ゲスト 12 の添加による透過性の変化を水付着 CV 法により直接測定した<sup>5, 6)</sup>。その結果、両マーカーの透過性に及ぼすゲストの効果に顕著な差を見出し、長鎖アルキル型シクロデキストリンが分子内チャンネル機能を持つことを実証した。

現在、上述の二つの膜透過性制御モードに加えて、シクロデキストリン誘導体のチオール化合物を電極表面に自己集合させたチャンネルセンサーを検討している。このセンサーは、マーカーイオンが直接電極表面に到達する必要がなく、ホスト分子の疎水性内孔を用いるホスト-ゲスト錯形成によりマーカーの電子トンネリングの変調を引き起こす第 3 のモードを用いている。

バイオ系のアプローチとして、ラット小脳シナプスより単離精製したグルタミン酸レセプター (GluR) イオンチャンネル蛋白質を感応素子として平面脂質二分子膜に埋め込んだ新しいタイプのセンシング膜を開発した<sup>7, 8)</sup>。L-グルタミン酸 (L-Glu) の添加により誘起されるイオンチャンネル電流を測定したところ、シングルチャンネル膜においてはチャンネルの開閉を反映した矩形波が観測され、L-Glu 濃度の増加に従ってチャンネル開口確率が増大した。それに対してマルチチャンネル膜においては、チャンネル電流は個々のチャンネルの応答に由来する矩形波の重なりとして観測された。これらのセンシング膜の L-Glu に対する応答を、チャンネル電流の積分値（イオンチャンネル蛋白質によるシグナル増幅の直接的指標）として求め、L-Glu 濃度に対する検量線を作成したところ、マルチおよびシングルチャンネル膜について、検出下限がそれぞれ  $< 10^{-8}$  M および  $< 10^{-7}$  M というかなり高い感度が得られた<sup>7)</sup>。このような高感度は、明らかに GluR イオンチャンネル蛋白質の持つ顕著なシグナル増幅能に基づくものである。この系はほ乳動物の脳化学の最も重要な薬過程の一つと考えられ、このチャンネル蛋白質が種々のアゴニスト及びアンタゴニストに対して示す化学選択性を評価することは重要と考えられる。現在、著者らは、従来の binding assay ではなくチャンネル電流の大きさを指標とする新しい選択性の評価法を検討している。

## 2 能動輸送に基づく化学センシング

生体膜における特異的な物質移動の形態の一つは能動輸送である。例えば、グルコースの細胞外から内への取込みは膜蛋白質



る電位応答は小さい。<sup>1</sup>H NMRの結果から、 $\beta$ -フェネチルアミンのフェニル部位が、カリックスアレン骨格の中に取り込まれていることが見出された。また、 $\beta$ -シクロデキストリンを含む液膜の電位応答の選択性は、液膜界面近傍で、ゲストがホストの疎水性内孔に取り込まれるホスト-ゲスト包接反応に基づくことが明らかになった<sup>20)</sup>。この他、金属シアノ錯体アニオンを、その分子形状に基づいて電位応答識別する新しいタイプのセンサーを非化学量論的及びアミン部位を合わせ持つ脂溶性大環状ジオキソポリアミン22を感応素子として開発した<sup>21)</sup>。また、リン酸二水素イオンを選択的に認識するビス(チオウレア)誘導体の開発に成功した<sup>22)</sup>。

無機固体膜センサーの基礎研究として、種々の電解質溶液における $\text{LaF}_3$ 固体膜の電荷分離過程を検討し、 $\text{LaF}_3$ の非化学量論的溶出( $\text{F}^-$ ) $3\text{La}^{3+}$ )に基づく電荷分離現象を見出した<sup>23)</sup>。生成した $\text{LaF}_3$ 表面の正の空孔が、 $\text{LaF}_3$ に基づくフッ化物イオン選択性電極の応答機構に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、 $\text{K}_2\text{Cu}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 膜を修飾した電位応答型センサーはアルカリ金属イオンに対して選択的に応答し、この膜は格子間空隙に適合するサイズのイオンに選択的に電荷分離を引き起こすことが見出されている。

これらの結果に関連してイオン選択性電極の選択係数の測定法を体系的に検討し新しいIUPAC推奨法を定めた<sup>24)</sup>。

#### 4. その他の認識・情報変換系

細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングに関するカルモジュリン( $\text{Ca}^{2+}$ レセプター)及びその標的蛋白質に基づく情報伝達系をモデルとする新規高感度 $\text{Ca}^{2+}$ センシング法を創製した<sup>9)</sup>。カルモジュリン(牛脳から抽出、精製)を一定量含む $\text{Ca}^{2+}$ 溶液を、標的ペプチドM13を固定化したデキストラン修飾金表面上を流すことにより、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存した表面プラズモン共鳴(SPR)の変化が得られる。SPR信号の変化に基づき $10^{-9}$  Mレベルの $\text{Ca}^{2+}$ を検知できる。また、固体膜センサーの開発研究として、 $\text{CrPO}_4$ や $\text{La}_2(\text{CO}_3)_2$ 等の難溶性固体膜で修飾した水晶振動子型化学てんびん(QCM)は、それぞれ、リン酸イオン及び炭酸イオンに対して質量変化に基づく選択的な応答を示すことを最近見出している。この他、原子間力顕微鏡のセンサーチップを選択的物質認識能を有する物質で化学修飾することにより、新しいマイクロセンサーを構築することを始めている。

#### 発表論文

- 1) 遠田浩司他：膜，19，122 (1994)及びその引用文献。

- 2) K. Yagi他：J. Electroanal. Chem., in press.
- 3) M. Namba他：Langmuir, 11, 635 (1995).
- 4) M. Sugawara他：Anal. Sci., 10, 343 (1994).
- 5) K. Odashima他：“Chemically Sensitive Interfaces” (T. E. Mallouk, D. J. Harrison, ed.), American Chemical Society, Washington, D.C., 1994, p. 123.
- 6) K. Odashima他：Anal. Chem., 65, 927 (1993).
- 7) H. Minami他：Anal. Chem., 63, 2787 (1991).
- 8) M. Sugawara他：“Redox Mechanisms and Interfacial Properties of Molecules of Biological Importance, ed. by F.A. Schultz and I. Taniguchi, p. 268, The Electrochemical Society, Pennington (1993).
- 9) M. Sugawara他：Anal. Sci. Tech., in press.
- 10) N. Sugao他：Anal. Chem., 65, 363 (1993).
- 11) Y. Adachi他：Anal. Chim. Acta, 281, 577 (1993).
- 12) K. Umezawa他：Anal. Chim. Acta, 282, 247 (1993).
- 13) K. Tohda他：Anal. Chem., 34, 570 (1995).
- 14) S. Yoshiyagawa他：Anal. Sci., 9, 715 (1993).
- 15) P. Buhlmann他：Electrochim. Acta, in press.
- 16) P. Buhlmann他：Electroanalysis, in press.
- 17) K. Odashima他：Supramolecular Chem., 4, 101 (1994).
- 18) K. Tohda他：Sensors and Actuators B, 13-14, 669 (1993).
- 19) K. Odashima他：Anal. Chem., 65, 1074 (1993).
- 20) K. Odashima他：Mikrochim. Acta, 113, 223 (1994).
- 21) R. Naganawa他：Electroanalysis, 5, 731 (1993).
- 22) S. Nishizawa他，Tetrahedron Lett. in press.
- 23) Y. Tani他：J. Electroanal. Chem., 378, 205 (1994).
- 24) Y. Umezawa他：Pure & Appl. Chem., 67, 507 (1995).