

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6630972号
(P6630972)

(45) 発行日 令和2年1月15日(2020.1.15)

(24) 登録日 令和1年12月20日(2019.12.20)

| | |
|-------------------------|-----------------------|
| (51) Int. Cl. | F I |
| GO 1 N 27/327 (2006.01) | GO 1 N 27/327 |
| GO 1 N 33/68 (2006.01) | GO 1 N 33/68 |
| GO 1 N 33/483 (2006.01) | GO 1 N 33/483 F |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 8 1 A |
| GO 1 N 27/416 (2006.01) | GO 1 N 27/416 3 3 6 B |
| 請求項の数 5 (全 14 頁) 最終頁に続く | |

| | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|--------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2015-60724 (P2015-60724) | (73) 特許権者 | 397022911 |
| (22) 出願日 | 平成27年3月24日(2015.3.24) | | 学校法人甲南学園 |
| (65) 公開番号 | 特開2016-180662 (P2016-180662A) | | 兵庫県神戸市東灘区岡本8丁目9番1号 |
| (43) 公開日 | 平成28年10月13日(2016.10.13) | (74) 代理人 | 100124431 |
| 審査請求日 | 平成30年3月19日(2018.3.19) | | 弁理士 田中 順也 |
| | | (74) 代理人 | 100156845 |
| | | | 弁理士 山田 威一郎 |
| | | (74) 代理人 | 100174160 |
| | | | 弁理士 水谷 馨也 |
| | | (74) 代理人 | 100124039 |
| | | | 弁理士 立花 顕治 |
| | | (74) 代理人 | 100112896 |
| | | | 弁理士 松井 宏記 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 アミロイドβペプチドを電気化学的に測定するためのバイオセンサ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(1)又は(2)に示すペプチドが固定化されてなる電極を含む、アミロイド ペプチドを測定用のバイオセンサ：

(1) 配列番号1に示すアミノ酸配列を含むペプチド。

(2) 配列番号1に示すアミノ酸配列における第3～7位以外のアミノ酸残基内、1～4個のアミノ酸残基が、置換、欠失、又は挿入されてなるアミノ酸配列を含み、A を凝集させる作用を有するペプチド。

【請求項2】

前記ペプチドが、下記(3)又は(4)に示すペプチドである、請求項1に記載のバイオセンサ：

(3) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるペプチド。

(4) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、第8～12位以外のアミノ酸残基内、1～4個のアミノ酸残基が、置換、欠失、付加、又は挿入されてなるアミノ酸配列からなり、A と凝集させる作用を有するペプチド。

【請求項3】

アルツハイマー型認知症の診断に使用される、請求項1又は2に記載のバイオセンサ。

【請求項4】

下記(1)又は(2)に示すペプチドが固定化されてなる電極を含むバイオセンサを用いて、アミロイド ペプチドを測定する方法であって：

(1)配列番号1に示すアミノ酸配列を含むペプチド。

(2)配列番号1に示すアミノ酸配列における第3～7位以外のアミノ酸残基内、1又は数個が置換、欠失、又は挿入されてなるアミノ酸配列を含み、A を凝集させる作用を有するペプチド。

前記バイオセンサにおけるペプチドが固定化された電極に対して試料溶液を接触させる第1工程、

前記第1工程で試料溶液に接触させた電極に対して、銅2価イオンを接触させ、電流値を測定する第2工程、及び

前記第2工程で測定した電流値に基づいて、試料溶液中のアミロイド ペプチド量を求める第3工程。

10

【請求項5】

前記試料溶液が、血漿又はその希釈液である、請求項4に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、電気化学的手法により、簡便、短時間、且つ高精度でアミロイド ペプチドを測定するためのバイオセンサ及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病の原因物質と考えられているアミロイド ペプチド(以下、「A」と表記することもある)の検出法については、測定対象の重要性からこれまで様々な技術が開発されている。最も一般的なものは、蛍光測定法やELISA法等の手法によるものである。蛍光測定は、A 線維に特異的に結合する蛍光色素チオフラビンT(ThT)を用い、線維量に比例する蛍光強度により定量する手法であり、A に関する学術論文の多くでこの手法が用いられている。しかしながら、蛍光測定法で測定できるのは、線維状のA のみであり、また検出感度も低く、mMレベルに止まっている。一方、ELISA法は、A 抗体を利用した方法で感度も高いが、抗体との反応時間・信号増幅時間が1～2日必要であり、かつ抗体を必要とするため比較的費用がかさむという欠点がある。

20

【0003】

そこで、異なった原理に基づいたA の測定法として表面プラズモン共鳴(SPR)法等の分子間相互作用解析装置を用いた方法が報告されている。例えば、非特許文献1には、SPRを抗体と共に用いることにより0.02～5nMのA を測定することが可能になることが開示されている。また、非特許文献2には、抗体を用いず3～30mMのA を検出したことが報告されている。しかしながら、前者の方法では抗体を用いるため費用が嵩み、後者の方法は感度がそれほど高くないという欠点がある。

30

【0004】

更に、電気化学的手法によるA の測定の試みも報告されている。例えば、非特許文献3では、A に含まれるチロシン残基の酸化還元を測定することによって、A の検出が試みられている。しかしながら、非特許文献3では、0.7g/mLのA まで検出できると見積もられているが、定量性は得られていない。また、非特許文献4では、抗体で修飾した金電極上でのp-アミノフェノールの酸化還元を用いて、pMレベルのA₄₂及び全A 量を検出した報告もあるが、この方法では、特殊な抗体を用いる必要があるため、1測定当たりの費用が高額になるという欠点がある。

40

【0005】

更に、従来、A の測定法として、A を安定同位体により標識、分離し、質量分析により定量する方法(特許文献1)、アミロイドモノマーを認識する抗体を担持した金属コロイドを使用する方法(特許文献2)、シート状A オリゴマーが固定化されているバイオチップを用いる方法(特許文献3)等も提案されている。

【0006】

このように、A の測定法はこれまでも数多く報告されているが、高感度測定の多くは

50

特別な抗体を必要としていた。また、測定するための装置については、SPRや質量分析計等の高価なものが必要である方法も多い。一方、比較的安価な装置で測定できる電気化学的手法では、長時間の測定時間が必要であったり、感度や定量性が不十分であったりするため、迅速・簡便・高精度の3つの条件を満たす方法は開発されていないのが現状である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Ning Xia et al., Anal. Chem., 82, 10151 (2010)

【非特許文献2】Jungki Ryu et al., Anal. Chem., 80, 2400 (2008)

10

【非特許文献3】M. Vestergaard et al., J. Am. Chem. Soc., 127, 11892 (2005)

【非特許文献4】Lin Liu et al., Biosens. Bioelectron., 51, 208 (2014)

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2004-157124号公報

【特許文献2】特開2011-122928号公報

【特許文献3】特開2014-13190号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

20

本発明の目的は、電気化学的手法により、簡便、短時間、且つ高精度でAを測定するためのバイオセンサを提供することである。また、本発明の他の目的は、当該バイオセンサを利用したAの測定方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、前記課題を解決すべく鋭意検討を行ったところ、HDKLVFFYEVHH(配列番号1)又はその改変配列を含むペプチドを固定化した電極を使用することにより、簡便、短時間、且つ高精度でAを電気化学的手法により測定することが可能になることを見出した。より具体的には、前記電極にAを接触させると、Aが前記ペプチド上に凝集し、更に銅2価イオンを添加すると、A量に応じた電気化学的信号が発せられ、当該電気化学的信号を検出することにより、簡便、短時間、且つ高精度でのAの定量が可能になることを見出した。本発明は、かかる知見に基づいて更に検討を重ねることにより完成したものである。

30

【0011】

即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. 下記(1)又は(2)に示すペプチドが固定化されてなる電極を含む、アミロイドペプチドを測定用のバイオセンサ:

(1)配列番号1に示すアミノ酸配列を含むペプチド。

(2)配列番号1に示すアミノ酸配列における第3~7位以外のアミノ酸残基内、1又は数個が置換、欠失、又は挿入されてなるアミノ酸配列を含み、Aを凝集させる作用を有するペプチド。

40

項2. 前記ペプチドが、下記(3)又は(4)に示すペプチドである、項1に記載のバイオセンサ:

(3)配列番号2に示すアミノ酸配列からなるペプチド。

(4)配列番号2に示すアミノ酸配列において、第8~12位以外のアミノ酸残基内、1又は数個が置換、欠失、付加、又は挿入されてなるアミノ酸配列からなり、Aと凝集させる作用を有するペプチド。

項3. アルツハイマー型認知症の診断に使用される、項1又は2に記載のバイオセンサ。

項4. 項1~3のいずれかに記載のバイオセンサを用いて、アミロイドペプチドを測

50

定する方法であって、

前記バイオセンサにおけるペプチドが固定化された電極に対して試料溶液を接触させる第1工程、

前記第1工程で試料溶液に接触させた電極に対して、銅2価イオンを接触させ、電流値を測定する第2工程、及び

前記第2工程で測定した電流値に基づいて、試料溶液中のアミロイドペプチド量を求める第3工程。

項5. 前記試料溶液が、血漿又はその希釈液である、項4に記載の測定方法。

【発明の効果】

【0012】

10

本発明のバイオセンサによれば、抗体を使用することなく、比較的安価な装置で測定できる電気化学的手法によって、簡便且つ短時間でAを定量することができる。しかも、本発明のバイオセンサによれば、0.5 μM程度という極めて低濃度のAであっても定量することができるので、Aの検出感度が極めて高く、その測定精度も卓越している。

【0013】

また、血漿中のAは、アルツハイマー型認知症のバイオマーカーであることが知られているので、本発明のバイオセンサは、アルツハイマー型認知症の診断用途にしようすることにより、その診断精度の向上や早期発見に寄与することができる。

【0014】

本発明のバイオセンサは、電気化学的手法を利用しているため、現在実用化されているような家庭用血糖値センサと同様、小型化することにより、家庭用のAセンサとして普及させることもできる。

20

【0015】

更に、本発明のバイオセンサは、使用後に洗浄することにより初期化でき、しかも測定と洗浄を繰り返し行っても、Aの測定精度を維持できるので、従来のAの測定法に比べて、Aの測定に要するトータルコストを大幅に低減することも可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】参考例1において、AFPP及びAFPP_{cys}のAに対する凝集促進効果を評価した結果を示す図である。

30

【図2】実施例1において、AFPP_{cys}固定化電極を用いてAの測定を行った結果を示す図である。

【図3】実施例3において、AFPP_{cys}固定化電極を用いて、0.1 ~ 5 μMのAの測定を行った結果を示す図である。

【図4】実施例4において、AFPP_{cys}固定化電極を用いたAの測定及び洗浄を繰り返し行い、洗浄後の再利用がA測定精度に及ぼす影響を評価した結果を示す図である。

【図5】実施例5において、AFPP_{cys}固定化電極を用いてアミリンの測定を行った結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

40

本明細書において、配列表以外では、アミノ酸配列における20種類のアミノ酸残基は、一文字略記で表現している。即ち、グリシン(Gly)はG、アラニン(Ala)はA、バリン(Val)はV、ロイシン(Leu)はL、イソロイシン(Ile)はI、フェニルアラニン(Phe)はF、チロシン(Tyr)はY、トリプトファン(Trp)はW、セリン(Ser)はS、スレオニン(Thr)はT、システイン(Cys)はC、メチオニン(Met)はM、アスパラギン酸(Asp)はD、グルタミン酸(Glu)はE、アスパラギン(Asn)はN、グルタミン(Gln)はQ、リジン(Lys)はK、アルギニン(Arg)はR、ヒスチジン(His)はH、プロリン(Pro)はPである。

【0018】

また、本明細書において、アミノ酸配列は、左側がN末端、右側がC末端となるように

50

配列を表示している。

【 0 0 1 9 】

1 . A 測定用バイオセンサ

本発明は、バイオセンサは、A を電気化学的手法によって測定するために使用されるバイオセンサであって、配列番号 1 に示すアミノ酸配列又はその改変配列を含むペプチドが固定されている電極を含むことを特徴とする。以下、本発明のバイオセンサについて詳述する。

【 0 0 2 0 】

(ペプチド)

本発明のバイオセンサにおいて電極に固定化されるペプチドは、下記(1)又は(2)に示すペプチドである。下記(1)又は(2)に示すペプチドは、A を効率的に捕捉して凝集させる作用を有しており、当該ペプチドをA 測定用バイオセンサに使用することにより、簡便、短時間、且つ高精度でのA の定量が可能になる

(1)配列番号 1 に示すアミノ酸配列 (HDKLVFFYEVHH) を含むペプチド。

(2)配列番号 1 に示すアミノ酸配列 (HDKLVFFYEVHH) における第 3 ~ 7 位以外のアミノ酸残基内、1 又は数個が置換、欠失、又は挿入されてなるアミノ酸配列を含み、A を凝集させる作用を有するペプチド。

【 0 0 2 1 】

前記(1)のペプチドは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるものであってもよいが、N末端及び/又はC末端に1 又は数個のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

【 0 0 2 2 】

前記(1)のペプチドにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端にアミノ酸残基を付加する場合、付加されるアミノ酸残基の数については、特に制限されないが、例えば、N末端側の場合であれば1 ~ 10 個、好ましくは1 ~ 6 個、更に好ましくは4 ~ 6 個が挙げられ；C末端側の場合であれば1 ~ 10 個、好ましくは1 ~ 5、更に好ましくは1 ~ 3 個が挙げられる。

【 0 0 2 3 】

前記(2)のペプチドにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の3 ~ 7 位のアミノ酸残基 (KLVFF) はA の凝集促進作用に大きく寄与しているため、これらのアミノ酸残基は保存される。

【 0 0 2 4 】

前記(2)のペプチドにおいて、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸残基は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における第 1、2、及び 8 ~ 12 のアミノ酸残基であればよいが、第 1、11、及び 12 位のヒスチジン残基は当該ペプチドの構造変化を誘起させる役割に寄与し得るので、A の高い測定精度を維持させる上で、第 1、11、及び 12 位のヒスチジン残基は、置換、欠失、又は挿入されていないことが望ましい。

【 0 0 2 5 】

また、前記(2)のペプチドにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に改変 (置換、欠失、付加、又は挿入) が導入されるアミノ酸残基の数については、1 又は数個の範囲内であり、且つA と凝集させる作用を有することを限度として特に制限されないが、具体的には1 ~ 4 個、好ましくは1 ~ 3 個、更に好ましくは1 又は 2 個、特に好ましくは1 個が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

前記(2)のペプチドにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対してアミノ酸置換がなされている場合、当該アミノ酸置換は、保存的置換であることが好ましい。アミノ酸置換としては、具体的には、置換前のアミノ酸が非極性アミノ酸であれば他の非極性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が非荷電性アミノ酸であれば他の非荷電性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が酸性アミノ酸であれば他の酸性アミノ酸への置換、及び置換前のアミノ酸が塩基性アミノ酸であれば他の塩基性アミノ酸への置換が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

10

20

30

40

50

前記(2)のペプチドにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して置換、欠失、又は挿入されてなるアミノ酸配列からなるものであってもよいが、当該アミノ酸配列のN末端及び/又はC末端に更に1又は数個のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

【0028】

前記(2)ペプチドにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して置換、欠失、又は挿入されてなるアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端にアミノ酸残基を付加する場合、付加されるアミノ酸残基の数については、特に制限されないが、例えば、N末端側の場合であれば1~10個、好ましくは1~6個、更に好ましくは4~6個が挙げられ；C末端側の場合であれば1~10個、好ましくは1~5、更に好ましくは1~3個が挙げられる。

10

【0029】

本発明で使用されるペプチドは、前述するアミノ酸配列を有し、Aを凝集させる作用を有するものであることを限度として、構成するアミノ酸残基数については特に制限されないが、構成するアミノ酸残基数として、例えば14~30、好ましくは17~25、更に好ましくは18~20が挙げられる。

【0030】

また、本発明で使用されるペプチド(前記(1)又は(2)のペプチド)の好適な一例として、下記(3)又は(4)に示すペプチドが挙げられる。

(3)配列番号2に示すアミノ酸配列からなるペプチド。

(4)配列番号2に示すアミノ酸配列において、第8~12位以外のアミノ酸残基内、1又は数個が置換、欠失、付加、又は挿入されてなるアミノ酸配列からなり、Aと凝集させる作用を有するペプチド。

20

【0031】

前記(3)のペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のN末端側にDAEFRが付加され、且つC末端側にQKが付加されているアミノ酸配列からなるペプチドである。

【0032】

前記(4)のペプチドにおいて、置換、欠失、付加又は挿入されているアミノ酸残基は、配列番号2に示すアミノ酸配列における第8~12(即ち、配列番号1に示すアミノ酸配列の3~7位のアミノ酸残基に相当)以外のアミノ酸残基であればよいが、第6、16、及び17位のヒスチジン残基は、当該ペプチドの構造変化を誘起させる役割に寄与し得るので、Aの高い測定精度を維持させる上で、第6、16、及び17位のヒスチジン残基は、置換、欠失、付加又は挿入されていないことが望ましい。また、前記(4)のペプチドにおいて、配列番号2に示すアミノ酸配列の第6~17位のアミノ酸残基(配列番号1に示すアミノ酸配列の1~12位のアミノ酸残基に相当)についても、Aの高い測定精度を維持させる上で、置換、欠失、付加又は挿入されていないことが望ましい。

30

【0033】

前記(4)のペプチドにおいて、配列番号2に示すアミノ酸配列に改変(置換、欠失、付加、又は挿入)が導入されるアミノ酸残基の数については、1又は数個の範囲内であり、且つAと凝集させる作用を有することを限度として特に制限されないが、具体的には1~10個、1~9個、1~8個、又は1~7個、好ましくは1~6個、更に好ましくは1~5個、より好ましくは1~4個、特に好ましくは1~3個、最も好ましくは1又は2個が挙げられる。

40

【0034】

前記(4)のペプチドにおいて、配列番号2に示すアミノ酸配列に対してアミノ酸置換がなされている場合、当該アミノ酸置換は、保存的置換であることが好ましい。保存的置換の具体的態様については、前記の通りである。

【0035】

本発明で使用されるペプチドは、そのアミノ酸配列に基づいて、公知のペプチド合成法によって製造することができる。

【0036】

50

(電極)

本発明のバイオセンサに使用される電極の構成素材については、導電性を示し、且つ前記ペプチドを固定化できることを限度として特に制限されないが、例えば、金、白金、パラジウム、ニッケル、ルテニウム、イリジウム等の金属電極；ITO (Tin-doped indium oxide)等の金属酸化物電極；グラッシーカーボン等の炭素電極等が挙げられる。これらの中でも好ましくは金属電極、更に好ましくは金電極が挙げられる。

【0037】

(電極へのペプチドの固定化)

本発明のバイオセンサにおいて、前記ペプチドの電極への固定化は、電極の素材に応じて公知のペプチド固定化方法によって行うことができる。

10

【0038】

例えば、金や白金等の金属電極に前記ペプチドを固定化する場合であれば、前記ペプチドの末端にシステイン等のチオール基を有する化合物を結合させ、当該チオール基と電極を構成する金属原子とを結合させて、金属-S結合(例えば、金電極の場合には、Au-S結合)を形成させることにより、自己集積化(SAM)膜を形成させる方法が挙げられる。また、チオール基を有する化合物に代えて、ジスルフィド基を有する化合物を使用することによっても、金属電極に前記ペプチドを固定化することができる。

【0039】

また、例えば、グラッシーカーボン電極に前記ペプチドを固定化する場合であれば、グラッシーカーボン電極の表面を高温下での空気酸化又はクロム酸溶液処理により、カルボキシル基を形成させた後に、カルボキシル基を塩化チオニルにより酸塩化物に変換し、前記ペプチドのアミノ基とアミド結合を形成させる方法が挙げられる。

20

【0040】

本発明のバイオセンサにおいて、電極に固定化する前記ペプチドの量については、特に制限されないが、例えば電極 1 cm^2 当たり、前記ペプチドが $0.5\sim 40\text{ }\mu\text{g}$ 程度、好ましくは $1\sim 20\text{ }\mu\text{g}$ 程度、更に好ましくは $1\sim 10\text{ }\mu\text{g}$ 程度となる量が挙げられる。

【0041】

本発明のバイオセンサでは、前記ペプチドのN末端側が電極と結合する態様で固定化されていてもよく、また前記ペプチドのC末端側が電極と結合する態様で固定化されていてもよい。より一層高精度にAを測定するという観点から、前記ペプチドのN末端側が電極と結合する態様で固定化されていることが好ましい。即ち、本発明の好適な一態様としては、前記ペプチドのN末端にシステインが結合され、当該システインのチオール基が電極上で金属-S結合を形成することにより、前記ペプチドが電極上に固定化されている態様が挙げられる。

30

【0042】

(他の構成部材)

本発明のバイオセンサは、前記ペプチドが固定化された電極を作用極として使用して電気化学的分析器を構成すればよい。即ち、本発明のバイオセンサでは、前記ペプチドが固定化された電極(作用極)と共に、更に、対極と、発生した電流値を測定する電流測定装置とを備えていけばよい。

40

【0043】

また、本発明のバイオセンサは、作用極と対極を備えて二電極法による測定を行えるように構成されていてもよいが、更に参照電極を備えて三電極法による測定を行えるように構成されていてもよい。

【0044】

また、本発明のバイオセンサにおいて、前記ペプチドが固定化された電極には、電極と試料溶液が接触し易くなるように、前記ペプチドが固定化された電極上で試料溶液を保持させるセルが設けられていてもよい。

【0045】

2. A の測定方法

50

本発明の A の測定方法は、前記バイオセンサを用いて A を測定する方法であり、以下の第 1 工程～第 3 工程を含むことを特徴とする。

第 1 工程：前記バイオセンサの前記ペプチドが固定化された電極に対して試料溶液を接触させる。

第 2 工程：前記第 1 工程で試料溶液に接触させた電極に対して、銅 2 価イオンを接触させ、電流値を測定する。

第 3 工程：前記第 2 工程で測定した電流値に基づいて、試料溶液中の A 量を求める。

【 0 0 4 6 】

以下、本発明の A の測定方法について説明する。

【 0 0 4 7 】

(試料溶液)

本発明の A の測定方法において、測定対象となる試料溶液については、A の測定、特に定量が求められるものである限り、特に制限されず、例えば、組織抽出液、培養上清、脳脊髄液、血漿等の生体由来試料； A を含む試薬；これらの希釈液等が挙げられる。前述するように、血漿中の A はアルツハイマー型認知症のバイオマーカーであるため、測定対象となる試料溶液として、好ましくは血漿又はその希釈液が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

(第 1 工程)

本発明の A の測定方法では、先ず、前記センサの前記ペプチドが固定された電極に対して試料溶液を接触させる (第 1 工程) 。本第 1 工程によって、試料溶液に含まれる A が、電極に固定された前記ペプチド上に凝集する。

【 0 0 4 9 】

本第 1 工程において電極に試料溶液を接触させるには、例えば、前記ペプチドが固定化された電極に試料サンプルを添加して、当該電極を試料サンプルで覆えばよい。

【 0 0 5 0 】

本第 1 工程では、電極に対して試料溶液を接触させた状態で、37 程度で 30 ~ 60 分間程度静置又は振盪すればよい。

【 0 0 5 1 】

(第 2 工程)

前記第 1 工程後に、試料溶液に接触させた電極に、銅 2 価イオンを接触させ、電流値を測定する (第 2 工程) 。前記第 1 工程後に A が凝集している電極に対して銅 2 価イオンを接触させると、当該 A が銅 2 価イオンと結合し、銅 2 価イオンと電極間で電流が発生する。

【 0 0 5 2 】

第 2 工程によって銅 2 価イオンを接触させる前に、前記第 1 工程後の電極を洗浄することにより、電極上で凝集しなかった A を除去しておくことが望ましい。

【 0 0 5 3 】

第 2 工程において銅 2 価イオンを接触させるには、具体的には、水溶性の 2 価銅化合物を溶解させた銅 2 価イオン水溶液を電極上に添加すればよい。

【 0 0 5 4 】

銅 2 価イオン水溶液の調製に使用される水溶性の 2 価銅化合物としては、例えば、硫酸銅、塩化銅、酢酸銅等が挙げられる。これらの水溶性の 2 価銅化合物は、1 種単独で使用してもよく、また 2 種以上を組み合わせ使用してもよい。また、銅 2 価イオン水溶液における銅 2 価イオン濃度については、後述する銅 2 価イオンの接触量を充足できる範囲で適宜設定すればよいが、例えば 0.1 ~ 1 mM、好ましくは 0.1 ~ 0.2 mM となるように調整されていればよい。

【 0 0 5 5 】

前記銅 2 価イオン水溶液に使用される溶媒については、水酸化銅の形成による沈殿が生じないように pH を 7 程度に調整されていればよく、例えば Tris/HCl 緩衝溶液が好適に使用される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

また、第 2 工程において、接触させる銅 2 価イオンの量については、特に制限されないが、例えば、電極 1 cm^2 当たり、銅 2 価イオンが $0.1 \sim 1$ マイクロモル、好ましくは $0.1 \sim 0.3$ マイクロモルとなる量が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

このように銅 2 価イオンを接触させることにより、銅 2 価イオンが前記ペプチド上で凝集した A に結合し、銅 2 価イオンと電極間で電流が流れる。第 2 工程では、このようにして発生した電流値を測定する。

【 0 0 5 8 】

(第 3 工程)

前記第 2 工程で測定した電流値に基づいて、試料溶液中の A 量を求める (第 3 工程)。試料溶液中の A 量と前記第 2 工程で測定した電流値は比例関係にあるので、前記第 2 工程で測定した電流値から、試料溶液中の A 量が定量される。

【 0 0 5 9 】

第 3 工程では、具体的には、予め濃度既知の標準試料溶液を用いて、A 濃度と電流値の相関を示す標準曲線を作成しておき、当該標準曲線を用いて、前記第 2 工程で測定した電流値から試料溶液中の A 量を定量すればよい。

【 0 0 6 0 】

また、電極上に固定している前記ペプチド自体にも銅 2 価イオンが結合して微弱な電流を発生させ得るので、前記第 2 工程では、別途、試料溶液を添加せずに前記と同操作を行い、銅 2 価イオンを接触させた際のバックグラウンド電流値を測定しておくことが望ましい。この場合、試料溶液を接触させた場合に測定された電流値から、当該バックグラウンド電流値を差し引いた値を用いて、試料溶液中の A 量が求めることにより、A 量の定量精度を高めることができる。

【 0 0 6 1 】

(初期化)

また、前記バイオセンサは、一旦 A の測定を行った後に、前記ペプチドが固定化された電極を洗浄することによって、凝集している A と当該 A に結合している銅 2 価イオンを除去できるので、繰り返し使用することができる。

【 0 0 6 2 】

前記ペプチドが固定化された電極を一旦使用した後に洗浄する方法としては、キレート剤を含むキレート剤水溶液で洗浄した後に、アルカリ水溶液で洗浄する方法が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

前記キレート剤水溶液に含まれるキレート剤の種類については、銅 2 価イオンを除去できるものであることを限度として特に制限されないが、例えば、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、ジエチレントリアミン五酢酸ナトリウム、ニトリロ三酢酸ナトリウム、クエン酸等が挙げられる。これらのキレート剤は、1 種単独で使用してもよく、また 2 種以上を組み合わせて使用してもよい。また、キレート剤水溶液中のキレート剤の濃度としては、例えば $0.1 \sim 1 \text{ mM}$ 、好ましくは $0.1 \sim 0.3 \text{ mM}$ が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

キレート剤水溶液による洗浄後、アルカリ水溶液による洗浄前に、必要に応じて電極を水洗することにより、電極に残存しているキレート剤水溶液を洗い流してもよい。

【 0 0 6 5 】

前記キレート剤水溶液による洗浄方法については、特に制限されないが、例えば、前記キレート剤溶液で電極を濯ぐ方法、前記キレート剤溶液中に電極を浸漬させる方法等が挙げられる。

【 0 0 6 6 】

また、前記アルカリ水溶液としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリが添加され、pH が $9 \sim 12$ 、好ましくは $10 \sim 11$ に調整されているものであればよい

10

20

30

40

50

。

【0067】

前記アルカリ水溶液による洗浄方法については、特に制限されないが、例えば、前記アルカリ溶液で電極を濯ぐ方法、前記アルカリ溶液中に電極を浸漬させる方法等が挙げられる。

【0068】

アルカリ水溶液で洗浄した電極は、水洗してアルカリ水溶液を十分に洗い流すことにより、再利用することができる。

【実施例】

【0069】

次に、実施例を挙げて、本発明を具体的に説明するが、本発明は以下に限定されるものではない。

【0070】

参考例1：A に対する凝集促進効果の確認

配列番号2に示すアミノ酸配列からなるペプチド（以下、「AFPP」と表記する）と、当該AFPPのN末端にシステインを結合させたペプチド（以下、「AFPP_{cys}」と表記する）を合成し、これらのペプチドを用いて、A の凝集促進効果を確認した。具体的には、pH 7.0に調整したN-エチルモルフォリン緩衝溶液に対して、A を10 μM、AFPPを10 μM、A を5 μM且つAFPPを10 μM、AFPP_{cys}を10 μM、又はA を5 μM且つAFPP_{cys}を5 μMとなるように添加し、同時にアミロイド線維検出に用いられる蛍光色素チオフラビンT (ThT)を50 μMとなるように添加した。これを室温で8時間静置し、経時的に蛍光強度(487 nm)の測定を行った。

【0071】

得られた結果を図1に示す。図1から明らかなように、A 単独では蛍光強度の増大は認められなかったが、A とAFPP又はAFPP_{cys}とを共存させた場合には、短時間で蛍光強度の増大が認められた。即ち、この結果から、AFPP及びAFPP_{cys}は、A の凝集を促進させる作用があり、短時間でA を凝集させ得ることが明らかとなった。

【0072】

実施例1：AFPPcys固定化電極によるA の測定

AFPPcysを固定化した金電極を用いて、A の測定を行った。具体的には、まず、電極を50 μMのAFPPcysを含むN-エチルモルフォリン緩衝溶液(pH 7.0)400 μl中に浸し、一晩静置することによってAFPPcysを金電極上に固定した。次いで、5 μMのA を含むN-エチルモルフォリン緩衝溶液(pH 7.0)400 μlを当該金属電極に固定させたAFPPcysの上に添加し、室温で60分間静置したその後、電極上に200 μMの塩化銅を含むTris/HCl緩衝溶液(pH 7.0)400 μlを添加した後に、サイクリックボルタンメトリーの測定を行い、電流値の測定を行った。また、A を含む液を添加しなかったこと以外は、前記と同条件で測定を行い、バックグラウンド電流値の測定も行った。

【0073】

得られた結果を図2に示す。図2に示されているように、AFPPcysにも銅2価イオンが結合するので、バックグラウンド電流値が観測されたものの、A が存在する場合は明らかに電流値の上昇が認められた。即ち、この結果から、AFPPcysを固定した電極と銅2価イオンを使用することにより、電気化学的なA 測定が可能になることが明らかとなった。

。

【0074】

実施例2：AFPPcys固定化電極によるA の定量

AFPPcysを固定化した金電極を用いて、A の定量を行った。具体的には、まず、前記実施例1と同様の方法で、AFPPcysを固定した金電極を作製した。次いで、0~5 μMのA を含むN-エチルモルフォリン緩衝溶液(pH 7.0)400 μlを当該金属電極に固定させたAFPPcysの上に添加し、室温で60分間静置した。次いで、電極をN-エチ

10

20

30

40

50

ルモルフォリン緩衝溶液 (pH 7.0) で洗浄した。洗浄した電極上に、200 μM の塩化銅を含む Tris / HCl 緩衝溶液 (pH 7.0) 400 μl を添加し、過剰の銅 2 価イオンを Tris / HCl 緩衝溶液 (pH 7.0) で洗浄した後に、サイクリックボルタンメトリーの測定を行い、電流値の測定を行った。

【0075】

得られた結果を図 3 に示す。図 3 に示すように、A が 0.1 ~ 5 μM の範囲で観察される電流値が A の濃度と比例していることから、AFPPcys を固定した金電極を使用することによって、0.1 ~ 5 μM という低濃度の A であっても、高精度な定量が可能になることが分かった。

【0076】

実施例 3 : 洗浄による電極初期化の評価

AFPPcys を固定した金電極の繰り返し使用が、測定精度に与える影響を評価するために、以下の試験を行った。まず、前記実施例 1 と同様の方法で、AFPPcys を固定した金電極を作製した。次いで、以下の操作 1、洗浄 1、操作 2、及び洗浄 2 を 1 サイクルとして、合計 6 サイクルを繰り返し行った。なお、最後の 1 サイクルは操作 1 のみを行った。

操作 1 : 200 μM の塩化銅を含む Tris / HCl 緩衝溶液 (pH 7.0) 400 μl を前記金属電極に固定させた AFPPcys の上にした後に、サイクリックボルタンメトリーの測定を行い、電流値の測定を行った。

洗浄 1 : 操作 1 で電流値の測定に使用した金電極を 20 μM のエチレンジアミン四酢酸ナトリウムを含む Tris 緩衝液に 10 分間浸漬した後に、超純水で洗浄した。更に、洗浄後の電極を 10 mM の水酸化ナトリウム水溶液に 10 分間浸漬した後に、超純水で洗浄した。

操作 2 : 洗浄 1 で洗浄した金属電極の AFPPcys の上に 5 μM の A を含む N - エチルモルフォリン緩衝溶液 (pH 7.0) 400 μl を添加し、室温で 60 分間静置した。その後、電極上に 200 μM の塩化銅を含む Tris / HCl 緩衝溶液 (pH 7.0) 400 μl を添加した後に、サイクリックボルタンメトリーの測定を行い、電流値の測定を行った。

洗浄 2 : 操作 2 で電流値の測定に使用した金電極に対して、前記洗浄 1 と同条件で、エチレンジアミン四酢酸ナトリウムを含む Tris 緩衝液による洗浄と、10 mM の水酸化ナトリウム水溶液による洗浄を行った。

【0077】

合計 6 サイクルを繰り返し行った際に、操作 1 及び 2 において、測定された電流値を図 4 に示す。この結果より、AFPPcys を固定した金電極は、洗浄後も再現性良く電流応答が得られており、洗浄して繰り返し使用しても、高い精度をもって A を定量できることが分かった。

【0078】

実施例 4 : 類似ペプチド (アミリン) の影響の評価

A と同様、アミロイド線維を形成することが知られているアミリンを試料として使用して、AFPPcys の凝集選択性を検討した。具体的には、A の代わりに、アミリンを使用したこと以外は、実施例 1 と同条件で電流値の測定を行った。

【0079】

得られた結果を図 5 に示す。アミリンは、A と同様、銅 2 価イオンが結合することが知られているが、AFPPcys を固定した金電極に接触させても、観測される電流値には影響を与えなかった。このことは、金電極上に固定された AFPPcys は、アミリンを凝集させていない、又は凝集させたが凝集体には銅 2 価イオンが配位していないことを示している。

10

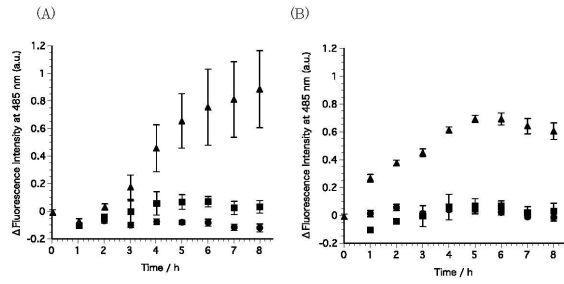
20

30

40

【 図 1 】

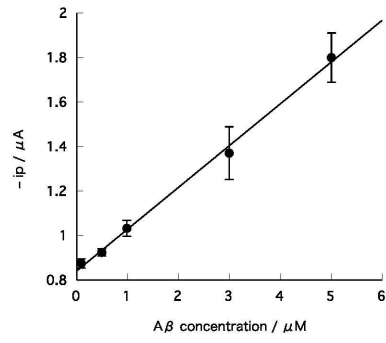
ThT 蛍光光度法による Aβ 凝集の時間変化



(A) 10 μM Aβ (■)、10 μM AβFP (●)、5 μM Aβ + 5 μM AβFP (▲)
 (B) 10 μM Aβ (■)、10 μM AβFPcys (●)、5 μM Aβ + 5 μM AβFPcys (▲)
 データは 平均値 ± 標準誤差 で示してある (3 回測定)。

【 図 3 】

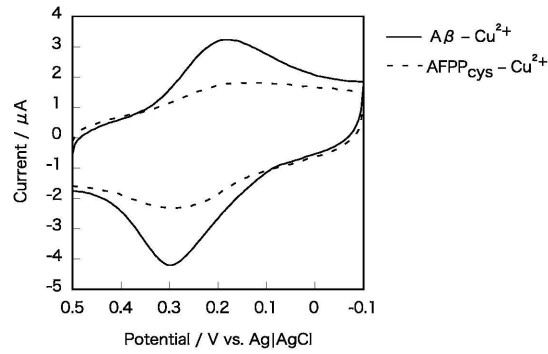
Aβ濃度と電流値との関係



各測定値は 平均値 ± 標準誤差 (3 回測定)

【 図 2 】

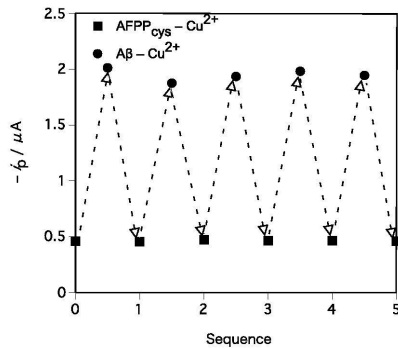
AFPPcys 固定化電極を用いたサイクリックボルタモグラム



破線 : Aβなしで銅 2 価イオンを添加した場合 (バックグラウンド電流値)
 実線 : 5 μM Aβ存在下で銅 2 価イオンを添加した場合

【 図 4 】

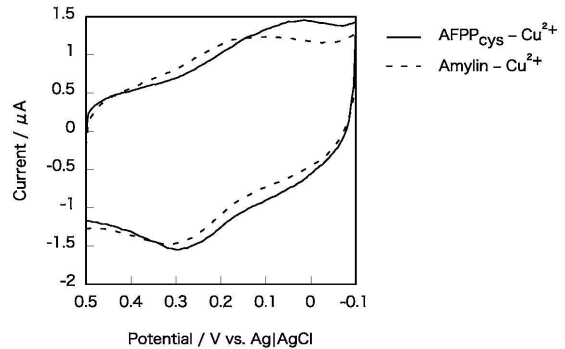
洗浄を繰り返した際の電流応答変化



■ : 操作 1 (AFPPcys に銅 2 価イオンを添加した場合)
 ● : 操作 2 (AFPPcys 上に Aβ凝集を行った後、銅 2 価イオンを添加した場合)

【 図 5 】

アミリンの電流値に与える影響



実線 : AFPPcys に銅 2 価イオンを添加した場合
 破線 : AFPPcys 電極に Amylin を添加した後、銅 2 価イオンを添加した場合

【配列表】

0006630972000001.app

フロントページの続き

| | | | | |
|-------------|-------|-----------|---------|----------------|
| (51)Int.Cl. | | F I | | |
| C 0 7 K | 17/14 | (2006.01) | G 0 1 N | 27/416 3 3 6 G |
| C 0 7 K | 7/08 | (2006.01) | C 0 7 K | 17/14 Z N A |
| | | | C 0 7 K | 7/08 |

(72)発明者 藤井 敏司
兵庫県神戸市中央区港島南町7丁目1番20号 甲南大学内

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特開2007-217330(JP,A)
特開2008-032554(JP,A)
特開2002-265382(JP,A)
特開2008-101949(JP,A)
特表2002-540383(JP,A)
BEHESHITI, Samaneh et al., Electrochemical "Signal-On" Reporter for Amyloid Aggregates, ChemPhysChem, 2012年, vol.13, no.2, pp.542-548
KURZATKOWSKA, Katarzyna et al., Electrochemical sensing of 2D condensation in amyloid peptides, Electrochimica Acta, 2013年, vol.106, pp.43-48

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 2 7 / 2 6 - 2 7 / 4 9

G 0 1 N 3 3 / 4 8 3

G 0 1 N 3 3 / 5 4 3

G 0 1 N 3 3 / 6 8

C 0 7 K 7 / 0 8

C 0 7 K 1 7 / 1 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)