

令和元年6月14日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05820

研究課題名(和文) タンパク質・細胞インタラクション電子伝達性アミノ酸配列組込みプローブの構築

研究課題名(英文) Construction of electron-transfer amino acid sequence probe with an interaction for protein and cell

研究代表者

菅原 一晴 (Sugawara, Kazuharu)

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：30271753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質や細胞を測定のためにターゲット認識ペプチドと電子伝達性ペプチドとを組み合わせた測定システムを開発した。糖質認識タンパク質と糖タンパク質との複合体形成と電子伝達性擬似糖質ペプチドを用いることでタンパク質の検出も実現した。このコンセプトに基づき細胞表面の糖鎖または糖鎖レセプタとタンパク質、ペプチドプローブを利用してヒト骨髄性白血病細胞とヒト肝臓ガン細胞の定量を可能とした。His-tag/電子伝達性ペプチド導入糖タンパク質も合成し、糖質認識タンパク質をセンシングした。ペプチド修飾タンパク質はターゲットタンパク質の検出プローブとして構造が単純でありタンパク質間結合の評価に応用できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質や細胞を電気化学的センシングのために考案されたペプチドプローブはのすべてがアミノ酸残基から構成されている。そのため、生体試料の測定に有利であり環境負荷が小さいという特性を有する。また、特定のアミノ酸配列を組み込んだタンパク質を発現させることで電子伝達性タンパク質をデザインすることができる。従って、電子伝達性タンパク質はライフサイエンス、エンジニアリングにおいて高い波及効果をもち、蛍光タンパク質に匹敵する優れたタンパク質プローブとなる。

研究成果の概要(英文)：Electrochemical measurement systems were developed for detection of protein and cell using the target-recognition/electron-transfer peptides. The sensing of carbohydrate-recognition protein or glycoprotein was achieved due to the interaction between protein and an electron-transfer carbohydrate-mimetic peptides. Based on this concept, the measurements of human liver cancer and human myeloid leukemia cells were performed using the carbohydrate chain or carbohydrate chain-receptor on cell surface, peptide and protein. His-tag/electron-transfer peptides-modified glycoprotein was also synthesized to measure carbohydrate-recognition protein. The protein as a sensing probe of the target protein consisted of simple structure and could be applied to the evaluation of the interaction between proteins.

研究分野：分析化学

キーワード：電子伝達性ペプチド Asialofetuin His-tag 擬似糖質ペプチド ガラクトース認識タンパク質 Cyto seinsing Apoptosis

## 1. 研究開始当初の背景

現在、多様なペプチドプローブがデザインされつつあり生命科学、医療、食品分野に大きく貢献している。例えば、タンパク質をモニタリングするために、蛍光物質修飾ペプチドが考案され、バイオイメージングをも可能とするプローブとなっている。また、表面プラズモン共鳴法、LC-MS/MS や NMR 測定を用いたタンパク質-ペプチド間相互作用の解析も多面的に展開されている。電気分析化学的分野におけるペプチドプローブが用いられた研究としては、電極応答を示す化合物で標識したプローブが報告されている。ペプチドプローブの redox 応答の変化に基づいてタンパク質を検出する研究は、簡便で低コストであることからさらなる発展が望まれている。このような背景から、申請者の独自のアイデアとして“電子伝達性チロシンリッチペプチドにオボアルブミン(OVA)認識ペプチドを結合させた一体型ペプチドを構築することとした。その結果、OVA とプローブの均一反応において結合定数を算出するとともに、 $10^{-12}$  M レベルの OVA のセンシングに成功している。一方、“擬似細胞とみなした糖鎖修飾磁性ビーズ”や“ヒト組織球性リンパ腫・マクロファージ由来細胞”を対象に、それらの表面で起こるタンパク質-糖鎖間結合を利用して擬似細胞および細胞のセンシングを可能としてきた。測定原理は、redox 応答を示す化合物を糖鎖に修飾したセンシングプローブを作製し、“ビーズあるいは細胞表面の糖鎖”と“センシングプローブの糖鎖”とを特定のタンパク質に競争させるといった概念の上に成り立っている。以上、申請者は蓄積した成果および技術をベースに電子伝達性アミノ酸配列を組み入れたプローブとツールを巧みにいかし、タンパク質の検出、細胞のセンシングあるいは細胞表面に発現するレセプタのモニタリングを実施するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質や細胞の検出を可能とする“電子伝達性アミノ酸配列”を組み込んだプローブを構築することである。そのプローブは“分子認識/電子伝達性”、“細胞膜透過性/アポトーシス誘起/電子伝達性”から成るペプチドである。測定原理は、ターゲットとの相互作用から引き起こされる電子伝達部の応答変化に基づく。また、“磁性ビーズ”にペプチドやタンパク質を固定したツールを使って、ターゲットタンパク質を測定する。さらに、“分子認識/電子伝達性ペプチド修飾タンパク質”、“電子伝達性タンパク質”をプローブとしパイオマーカーとなるタンパク質のセンシングを実現する。“電子伝達性タンパク質発現”の試みは、革新的な取り組みであり蛍光タンパク質に匹敵する優れたプローブとなる。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞透過性/アポトーシス誘起/電子伝達性ペプチドプローブによるヒトリンパ腫由来細胞(U937 細胞)のセンシングシステムをデザインする。オリゴアルギニンは細胞膜透過性ペプチドであり、オリゴチロシンにシステイン残基を結合させた  $Y_4C$  は“フェノール性水酸基に基づいた酸化応答”を示す電子伝達性ペプチドである。最初に、細胞膜透過性ペプチドを  $Y_4C$  に結合させ、U937 細胞に対する膜透過性を電気化学的に評価する。その際には、N 末端側に連続したアルギニン残基(R)を2残基ずつ増加させ  $Y_4C$  の電極応答に対する効果を明らかにする。ペプチドプローブの U937 細胞に対する膜透過性は R 残基数の増加にともない向上するため、電極応答の変化を考慮して膜透過性部位である R の個数を決定する。次に、細胞透過性/アポトーシス誘起ペプチドとして知られるプロテグリン 1(RGGRLCYCRRRFCVGVGR-NH<sub>2</sub>)の N-末端側の“GG”を“RR”に置き換える。このペプチドは単独の分子認識ペプチドに比較して高い透過性をもっていることが予想されており、“より低濃度、短時間での U937 細胞のアポトーシスを誘起する。従って、この概念は“がん細胞に関するドラッグデリバリーの新しい電気化学的評価法”となる。

(2) アミノ基修飾磁性ビーズの架橋剤を介してタンパク質と相互作用をもつ分子認識/電子伝達性ペプチド-磁性ビーズを設計する。ターゲットタンパク質のセンシングは分子認識ペプチドとの相互作用が引き起こす電子伝達性ペプチドの酸化応答の変化により達成される。“分子認識/電子伝達性ペプチド-磁性ビーズは、ビーズ表面へのタンパク質-ペプチド間結合によりタンパク質を濃縮する可能性をもつ。従って、タンパク質センシングの感度の向上が予期される。さらに、ビーズの再生を行うために尿素をなど用いてタンパク質を除去し、繰り返しのタンパク質の濃縮機能を評価する。ターゲットとしては、OVA を選択し、分子認識ペプチド(RNRCKGTDVQAW)に電子伝達性ペプチド( $Y_4C$ )を結合させペプチドプローブとする。ビーズにペプチドを固定化する際には、架橋剤の種類やビーズの粒径についての効果を明らかにする。

(3) 電子伝達性擬似糖質ペプチドを構築しタンパク質のセンシングを実施する。このペプチドはターゲットタンパク質を分子認識するために機能と電極応答を示す機能をあわせもっており、ラベルフリーなペプチドプローブとなる。ペプチドの基本的な配列はチロシン残基から構成されておりオリゴチロシンの C-末端にシステイン残基を導入したペンタ、ヘキサペプチドである。そして、オリゴチロシンの構造の一部をチロシン残基からアラニンまたはセリンに置換したペプチドも合成し、ターゲットタンパク質に対する結合力および測定感度を

評価する。本システムで使用する電子伝達性擬似糖質ペプチドはガラクトース認識タンパク質と結合するため、大豆由来レクチン(Soybean agglutinin :SBA)をモデルとする。

(4) 細胞センシングのための電子伝達性擬似糖質ペプチドプローブを開発する。この測定システムでは糖質認識タンパク質として上記で用いた SBA、電子伝達性擬似糖質ペプチド( $Y_4C$ )そして糖鎖末端にガラクトース残基を有するアシアロフェツイン(ASF)に着目する。その測定原理はそして SBA と ASF の相互作用に基づく。糖鎖末端にガラクトース残基を有する細胞をセンシングする場合、SBA に対して細胞のガラクトース残基と  $Y_4C$  との競争反応を用いる。すなわち、 $Y_4C$  の電流値は細胞数に依存して増加することが予想されターゲット細胞が検出される。一方で、ASF レセプタを表面にもつ細胞では、ASF と  $Y_4C$ 、ターゲット細胞をインキュベーションする。その際には、細胞数の増加にともなって ASF と  $Y_4C$  のレセプタへの取り込みにより電流値が減少するためターゲット細胞が検出される。また、この測定システムは ASF レセプタの解析法としても期待できる。

(5) His タグ/電子伝達性ペプチドを修飾したプローブタンパク質を用いて、ターゲットタンパク質を測定する。プローブタンパク質を ASF、ターゲットタンパク質を SBA とする。加えて、ASF における導入ペプチド数やペプチドの結合部位に関しての解析を行う。タンパク質に対するペプチド結合数についてはマトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量分析により測定を実施する。タンパク質への結合部位に関してはリシン-N プロテアーゼやなどを用いたペプチドフラグメントに切断した後、質量分析によりその同定を行うものである。さらには、ASF と SBA との相互作用を電気化学的に評価することも視野に入れる。

#### 4. 研究成果

(1) 一連の細胞膜透過性/アポトーシス誘起/電子伝達性ペプチドを合成し、電子伝達性ペプチドの電流値の変化からヒトリンパ腫由来細胞(U937 細胞)のセンシングを行うための新たな測定システムを考案した。ペプチドの細胞膜透過性に関与する R 残基数を変化させたところ、残基数が増加すると電流値は減少し電位が正側にシフトした。その理由は、アルギニン残基によりペプチドの親水性が増加し、電極への吸着が抑制されチロシン残基の酸化応答が低下したと考えられる。 $R_2$  では細胞透過性は見られず、 $R_6$  と  $R_8$  では細胞膜を透過するものであり細胞のあるなしの電流値の比が 50%程度になった。また、細胞膜透過性/アポトーシス誘起ペプチドであるプロテグリン-1 に電子伝達ペプチドを C-末端に修飾したペプチドでは、細胞とインキュベーションすることで電流値の低下が観察された。それゆえ、作製した多機能性ペプチドは U937 細胞表面を選択的に透過しることがわかる。さらに、プロテグリン-1 の配列の一部をグリシンからアルギニン残基に置換したペプチドプローブでは細胞膜透過性が向上しており、U937 細胞をより高感度に検出することができた。蛍光試薬を用い細胞数をカウントしたところ、プロテグリン-1 に比較してプロテグリン-1 の配列を変更したプローブでは生細胞はさらに減少しておりアポトーシスを促進することが明確となった。このように本ペプチド配列は抗がん剤としての働きを有しており、ドラッグデリバリーとしての応用が期待されペプチドの細胞膜透過性の評価法としても有用である。

(2) 電気化学的手法を用いて OVA を検出するために OVA-分子認識/電子伝達性ペプチドを合成しマイクロ磁性ビーズに固定化したツールを設計した。そのねらいとしては、OVA を固定化したペプチドとの相互作用に基づき OVA を濃縮し高感度化をはかり、ペプチド修飾ビーズの再生利用を行うことであった。その結果、ビーズ表面上では電子伝達性ペプチドが修飾されているため電極表面と接触することで酸化応答が得られることを明確となった。OVA を共存させると、OVA がペプチド修飾ビーズに濃縮されることで、ペプチドの酸化応答が変化し  $10^{-13}$  M レベルの OVA の検出が達成された。一方、濃縮された OVA をタンパク質変性剤で処理することで除去されたためビーズの再利用が可能となった。また、OVA を添加した血清において添加回収実験を行ったところマトリックスからの影響を受けにくく簡便で優れた OVA 検出ツールを構築することができた。

(3) ガラクトース認識タンパク質の電気化学的センシングを実現するために、電子伝達性擬似糖質ペプチドを考案した。磁性ビーズに架橋剤を用いてチロシン残基を 4 残基とシステイン残基から成るペプチドを固定化したツールで SBA のセンシングに対して高機能性を示すことを明らかにした。この磁性ビーズは SBA を効果的に濃縮することができ、再生可能なツールとして実用的であった。それゆえ、考案した電気化学的測定システムはガラクトース認識タンパク質のシンプルで簡便な測定手法となるものである。アラニン、セリン残基を含むペプチドの性質としては、チロシン残基から成るペプチドに比較して親水性を向上させビーズへのペプチドの固定化量を増加させる結果となった。しかしながら、その導入位置によってシステイン残基とチロシン残基を分断することで測定感度を低下させた。そのため、システイン残基とチロシン残基との相互作用が電子伝達性擬似糖質ペプチドの機能に大きく影響することが明らかとなった。

(4) 細胞を簡便かつ低コストにセンシングするために、電子伝達性擬似糖質ペプチドと糖質認識タンパク質または糖タンパク質を利用した電気化学的測定システムを提案した。先に述べた測定原理にしたがって、ガラクトースを糖鎖の末端にもつヒト骨髄性白血病細胞(K562細胞)の検出を試みた。SBAのガラクトース結合サイトにK562細胞表面のガラクトース残基とY<sub>4</sub>Cとの競争反応によりペプチドに起因する電流値が変化するため、100個/mlオーダーでのセンシングが可能となった。次に、ASFレセプタが細胞表面に存在するヒト肝臓ガン細胞(HepG2細胞)のセンシングを実施した。ASF、Y<sub>4</sub>CとHepG2細胞とをインキュベーションした後、Y<sub>4</sub>Cの電極応答を計測することで50個/ml HepG2細胞の定量が可能となった。加えて、ASFレセプタの存在数も見積もることができた。本電気化学的システムによって得られた値はELISA法による測定値と一致しており上記目的を達成されている。それゆえ、本システムは、汎用性の高いコストエフェクティブな細胞センシング法である。

(5) ASFにH<sub>6</sub>Y<sub>4</sub>C/電子伝達性ペプチドを導入したプローブタンパク質を考案して、ターゲットタンパク質であるSBAとの相互作用の電気化学的モニタリングしSBAのセンシングを実現した。プローブタンパク質としては、ASFのN-末端あるいはリジン残基にHisタグ電子伝達性ペプチドを修飾した。His-タグ/電子伝達性ペプチドのN-末端はアセチル化されており縮合によりペプチドはASFに修飾されている。先のASFとSBAとの複合体形成により、H<sub>6</sub>Y<sub>4</sub>C部位がSBAによって被覆されるため電極応答が抑制される。それゆえ、電流値の減少を記録することによってSBAを測定できることを見出した。

次に、H<sub>6</sub>Y<sub>4</sub>C/電子伝達性ペプチドを導入したプローブタンパク質におけるASFへのペプチドの修飾数とタンパク質における修飾位置に関する研究を行った。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量分析の結果、ペプチド1分子程度の質量数のシフトが観察されており、複数のペプチドはタンパク質に修飾されていないことを明らかとした。さらに、ASFへのペプチドの導入位置を解析するためプロテアーゼでペプチドフラグメントに切断した。LC-MS/MSでの測定によって、タンパク質のN-末端に結合している可能性が示唆されている。本研究で提案するペプチド修飾タンパク質はターゲットタンパク質のセンシングプローブとして簡単な構造をとっておりタンパク質間結合の評価プローブを作製するためにコンセプトとなる。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計10件)

Kazuharu Sugawara, Kazuharu Sugawara, Hideki Kuramitz, Hiroki Shinohara, Fabrication of micromagnetic beads with molecular recognition/electron-transfer peptides for the sensing of ovalbumin, *Analytica Chimica Acta*, 査読有, 958, 2017, pp.30-37

DOI:10.1016/j.aca.2016.12.028

Sugawara, K.; Kadoya, T.; Kuramitz, H.; Mihara, Y.

Design of carbohydrate/electron-transfer peptides for human histocytic lymphoma cell sensing, *Analytica Chimica Acta*, 査読有, 983, 2017, pp.198-205

DOI: 10.1016/j.aca.2017.06.028

Islam M. S. Sazawa, K. Hata, N. Sugawara, K.; Kuramitz, H., Determination of heavy metal toxicity by using a micro-droplet hydrodynamic voltammetry for microalgal bioassay based on alkaline phosphatase, *Chemosphere*, 査読有, 188, 2017, pp.337-344

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.008

Orii, T.; Okazaki, T.; Hata, N.; Sugawara, K.; Rahman, F.A.; Kuramitz, H., Development of an Attenuated Total Reflection Based Fiber-Optic Sensor for Real-time Sensing of Biofilm Formation, *Analytical Sciences*, 査読有, 33, 2017, pp.883-887

DOI:10.2116/analsci.33.883

Sugawara, K.; Kadoya T.; Kuramitz, H., Magnetic beads modified with an electron-transfer carbohydrate-mimetic peptide for sensing of a galactose-dependent protein, *Analytica Chimica Acta*, 査読有, 1001, 2017, pp.158-167

DOI:10.1016/j.aca.2017.11.047

菅原一晴. 生体分子センシングのための生体高分子膜電極の構築, *分析化学*, 査読有, 37, 2018, pp.1-7

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.67.73

田中 俊逸, 菅原 一晴, 倉光 英樹, 照井 教文, Development of Accumulation Voltammetry and Electrochemical Binding Assay using Labelled Ligands, *Review of Polarography*, 査読なし, 64, 2018, pp.71-78

DOI:10.5189/revpolarography.64.71

Ayesha Sultana, Kazuto Sazawa, Takuya Okazaki, Md. Saiful Islam, Noriko Hata, Kazuharu Sugawara, Hideki Kuramitz, Adsorptive Voltammetry for the Determination of Ochratoxin A Using Enrichment Effect by Cationic Surfactants, *Electroanalysis*, 30, 2018, pp.

2265-2272

DOI:10.1002/elan.201800226

Takuya Okazaki, Eri Shiokawa, Tatsuya Orii, Takamichi Yamamoto, Noriko Hata, Akira Taguchi, Kazuharu Sugawara, Hideki Kuramitz, Simultaneous Multiselective Spectroelectrochemical Fiber-Optic Sensor: Sensing with an Optically Transparent Electrode, *Analytical Chemistry*, 査読有, 90, 2018, pp.2440-2445

DOI:10.1021/acs.analchem.7b03957

Kazuharu Sugawara, Hideki Kuramitz, Toshihiko Kadoya, Label-free cytosensing of cancer cells based on the interaction between protein and an electron-transfer carbohydrate-mimetic peptide, *Analytica Chimica Acta*, 査読有, 1040, 2018, pp.166-176

DOI:10.1016/j.aca.2018.08.025

〔学会発表〕(計 10 件)

菅原 一晴、倉光 英樹、門屋 利彦, タンパク質センシングのための擬似糖鎖電子伝達性ペプチド修飾マイクロビーズの作製, 日本分析化学会 第 77 回分析化学討論会, 2017

山本 高一路、岡崎 琢也、織井 達也、波多 宣子、田口 茂、菅原 一晴、倉光 英樹, [学会発表] 電気化学 - 光ファイバーセンサーから得られる酸化還元活性染料の応答特性と界面活性剤添加による効果, 日本分析化学会 第 77 回分析化学討論会, 2017

菅原 一晴、倉光 英樹、門屋 利彦, 糖タンパク質 - ガラクトース認識タンパク質 - 電子伝達性ペプチド間相互作用のモニタリング, 日本分析化学会第 66 年会, 2017

Kazuharu Sugawara, Toshihiko Kadoya, Hideki Kuramitz, Yoshihiro Mihara, Fabrication of carbohydrate/electron-transfer peptides for human histocytic lymphoma cell sensing, RSC Tokyo International Conference 2017

Hideki Kuramitz, Tatsuya Orii, Takuya Okazaki, Noriko Hata, Akira Taguchi, Kazuharu Sugawara, Fiber Optic Sensor Based on Electrochemical-Localized Surface Plasmon Resonance, RSC Tokyo International Conference, 2017

Kazuharu Sugawara, Hideki Kuramitz, Toshihiko Kadoya, Electrochemical cytosensing of cancer cells using the interaction between protein and an electron-transfer carbohydrate-mimetic peptide, RSC Tokyo International Conference 2018 International Conference, 2018

菅原 一晴、菊池 壮也、倉光 英樹、門屋 利彦, タンパク質センシングのためのチロシンリッチペプチド導入タンパク質の構築, 日本分析化学会第67年会, 2018

霍 冉冉、佐澤 和人、波多 宣子、菅原 一晴、倉光 英樹, Hydrodynamic voltammetry combined with pre-concentration technique for determination of Cd and Pb, 2018年電気化学会秋季大会, 2018

桑名 李沙、岡崎 琢也、佐澤 和人、波多 宣子、田口 明、菅原 一晴、倉光 英樹, 有機染料の分光電気化学的応答評価と光ファイバーセンシングへの応用, 2018年電気化学会秋季大会, 2018

菅原 一晴、倉光 英樹、門屋 利彦, 電気化学的ペプチド間結合モニタリングのためのチロシンリッチペプチドとオリゴトレオニンによるラベル化, 日本分析化学会 第78回分析化学討論会, 2018年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。