

平成22年06月25日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20760543
研究課題名（和文）
昆虫由来生理活性ペプチドを改変した受容体バイオセンシング素子の開発
研究課題名（英文）
Development of bio-sensing element utilizing engineered biologically active peptides
研究代表者
宮地 寛登（MIYACHI HIROTAKA）
東京工科大学・応用生物学部・助教
研究者番号：50358131

研究成果の概要（和文）：

本研究は、標的となるタンパク質を認識するペプチド鎖の高密度固定化法を開発することを目的とした。このため、ロイシンジッパーの特性に着目し、ロイシンジッパーのN末端側に担体への固定化領域を配置した足場となるペプチド鎖を設計した。

本研究ではまた、標的タンパク質を検出するために分子認識ペプチドを設計・合成し、バイオセンサー素子として応用した。

本研究で設計・精製した足場ペプチドおよび分子認識ペプチドは、表面プラズモン共鳴（SPR）センサーを用いて固定化法を評価した。

研究成果の概要（英文）：

Despite a variety of alternative strategies for protein and peptide immobilization, it remains a central challenge to develop general techniques to immobilize functional peptides onto solid supports. In this study, the high density immobilization method of the peptide chain for the detection of a target molecule has been examined.

The molecular recognition peptide was designed and tested as a biosensor element. The peptides designed in this study were analyzed by surface plasmon resonance (SPR) sensor.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

ガンの発育・成長が血管新生に依存していることに着目し、ガン細胞が放出する様々な血管新生因子の中から VEGF (血管内皮細胞成長因子: Vascular endothelial growth factor) を選択し、VEGF を特異的に認識するペプチド鎖を設計・作製した。この結果、VEGF の異なる 2 カ所を特異的に認識・結合するペプチド鎖をリンカーで繋ぐことで、これまでに知られていたペプチド鎖と比較して約 1000 倍高い親和性を有する VEGF 認識ペプチドを開発することに成功した。これらの成果から結晶構造解析のデータを基にペプチド鎖を新たに設計することで、これまでに知られていない新たな機能を有するペプチド鎖の設計が可能であることを明らかにしている。これらの成果を踏まえ、申請者はガンマーカータンパク質などを標的として、これらを高感度に検出する技術を開発するに至った。

2. 研究の目的

バイオセンサー構築の際、標的タンパク質を高感度に検出する技術が求められる。標的タンパク質を高精度に検出するには、高密度かつ配向性を制御したバイオセンシング素子の固定化技術が必要となる。このため、ロイシンジッパーにみられる特異的な構造・特性に着目し、直列に配置したロイシンジッパーを設計して担体への固定化に応用できるか検討した。

また、目的の標的タンパク質と特異的に結合するペプチド鎖を設計し、バイオセンシング素子として利用できるか検討した。

設計したペプチド鎖は、表面プラズモン共鳴 (SPR: surface plasmon resonance) センサーを用いて標的タンパク質との特異性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 足場ペプチドの設計

本研究では、固定化および架橋の機構を同時にあわせ持つ足場ペプチドを作製した。足場ペプチドは、N 末端側に担体との固定化領域を配置してあり、金薄膜上で一定の配向性を保持したまま基板に導入することができると考えられた。また、C 末側に複数のロイシンジッパーを直列に配置することで、複数の分子認識ペプチドを結合できる構造をとした。具体的には、N 末側にシステイン残基を配置し、リンカー配列を介して LEIEAAAL EQNTEALETEVAEAEQEVQRLEN IVS QYRTRYGPL (アミノ酸 1 文字記号) を複数、直列に配置した

ペプチド鎖を設計した。

(2) 分子認識ペプチドの設計

バイオセンシング素子は N 末端側に足場ペプチドと特異的に結合する配列 (LEIRAAALRR RNTALRTRVAELRQRVQRLRNEVSQYETRYGPL) を有し、C 末端側に標的タンパク質と特異的に結合するペプチド鎖を配置したペプチド鎖を設計した。標的タンパク質と特異的に結合する配列は、GWVEICAADDYGRCL および GNECDIA RMWEWECFE をリンカー配列 (34 アミノ酸) で結合したものをを用いた。

(3) ペプチド鎖の大量発現

足場ペプチドおよびバイオセンシング素子は大量発現系を構築し、アフィニティーカラムにより精製した。

4. 研究成果

(1) 足場ペプチドの設計と発現

足場ペプチドの配列 (図 1) を導入したタンパク質大量発現用ベクターを構築し、大腸菌に導入した。目的の遺伝子断片が導入されたことを確認するために、アガロース電気泳動法により確認した結果を図 2 に示す。これらの結果から、設計した足場ペプチドのタンパク質大量発現ベクターを構築した。作製したベクターの配列は DNA シーケンサーを用いてさらに評価した (データは示していない)。

```

10      20      30      40      50      60
G S G G D E D Q Y C C Q Y C C D Y R R K R
ggatctggty gagatgaaga ccagtatgtg tgcacaatatt gctgtcaata cgcacaacgt
70      80      90      100     110     120
A G P G S G A G G S A G S A P G L E I E
gcccgtccag gatctggcgc ggttgatct gctggctcag cgcctgatt agaattgag
130     140     150     160     170     180
A A F L E Q E N T A L E T E V A E L E Q
gctgcattcc tcgaacaga gaatacagct cttgaaacgg aagttgccga gctagaacaa
190     200     210     220     230     240
E V Q R L E N I V S Q Y R T R Y G P L G
gaggtccagc ggctcgagaa tatagtgagt cagtacagaa ccaggtacgg gctcttggt
250     260     270     280     290     300
A G P G A G S G A A G P G S G G S A G S
gctggccctg gagccgggtc agggcagct ggcaccagtt ccgggggatt tctgagctca
310     320     330     340     350     360
A P G L E I E A A F L E Q E N T A L E T
gcccgtggat tagaaattga gctgcattc ctgcaacaag agaatacagc tcttgaacg
370     380     390     400     410     420
E V A E L E Q E V Q R L E N I V S Q Y R
qaadtqccr adctagaaca aqagttccag ccdctcgada atataatgaa tcaatcaada
430     440     450     460     470     480
T R Y G P L G A G P G A G S G A A G P G
accaggtacg ggcctctggg tgctggcctt gtagccgggt caggggcagc tggccaggt
490     500     510     520     530     540
S G G S A G S A P G L E I F A A F L E Q
tccgggggat ctgctggctc agcgcctgga ttagaattg aggtctgatt cctcgaacaa
550     560     570     580     590     600
E N T A L E T E V A E L E Q E V Q R L E
gagaatacag ctcttgaaac gaaagttgcc gagctagaac aagaggtcca gggctcgag
610     620     630     640     650     660
N I V S Q Y R T R Y G P L G A G P G A G
aatatagtag gtcagtagac aaccaggtac gggcctctgg gtgctggccc tggagccggg
670     680     690     700     710     720
S G A A G P G S G G S A E F
tcaggggacg ctggcccagc ttccggggga tccgcgggat tc

```

図 1 足場ペプチドの配列

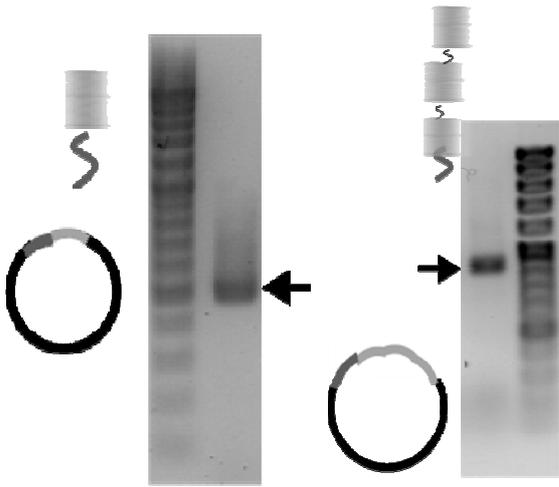


図2 ベクターの構築：ロイシンジッパーモチーフを1（左）または3（右）有するベクターの確認

大腸菌を用いて大量発現させた足場ペプチドはアフィニティークラムを用いて精製した。精製した足場ペプチドは SDS-PAGE により確認した（図3）。これらの結果から、目的のペプチド鎖の発現を確認した。

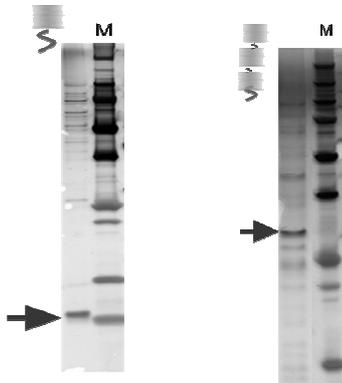


図3 足場ペプチドの精製：ロイシンジッパーモチーフを1（左）または3（右）有するペプチド鎖の発現を SDS-PAGE で確認した結果

(2) 分子認識ペプチドの設計と発現

標的タンパクと特異的に結合する分子認識ペプチドも足場ペプチドと同様にタンパク質大量発現用ベクターを構築した後、大腸菌に導入した。目的の遺伝子断片が導入されたことを確認した後（図4）、大腸菌を用いてタンパク質を発現させた。発現させたペプ

チド鎖は、アフィニティークラムを用いて精製した。精製したペプチド鎖を SDS-PAGE により確認した結果を図5に示す。これらの結果から、目的の分子認識ペプチドが発現されていることを確認した。

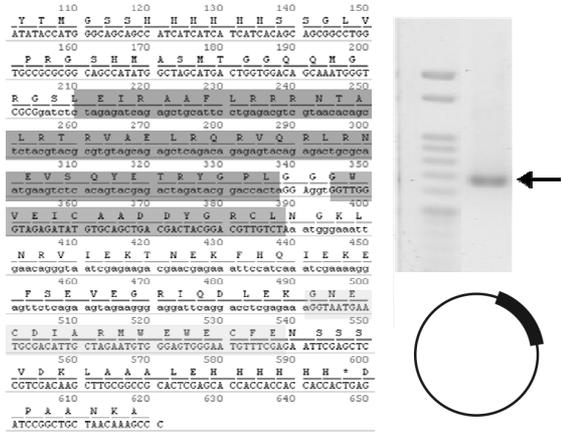


図4 標的タンパク質を検出するペプチド鎖（バイオセンシング素子）の核酸およびアミノ酸配列（左）。ベクターへの遺伝子導入の確認（右）

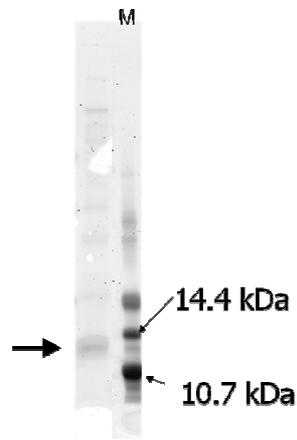


図5 標的タンパク質の検出に用いる分子認識ペプチドの確認：SDS-PAGEの結果

(3) バイオセンサー（SPR）を用いた固定化および標的タンパク質の検出

足場ペプチドを SPR 用金薄膜に固定化した結果を図6に示す。この結果、足場ペプチドはロイシンジッパーモチーフの繰り返し回数が多いほど固定化量が多くなることがわかった。

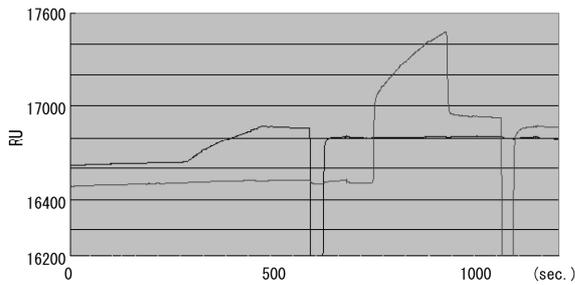


図6 足場タンパク質の固定化：ロイシンジッパーモチーフを1（左）または3（右）有するペプチド鎖の金薄膜への固定化

足場ペプチドを固定化した後、バイオセンシング素子を固定化した様子を図7に示す。この結果から、ロイシンジッパーモチーフを1および3有する足場ペプチドは分子認識ペプチドと結合することがわかった。

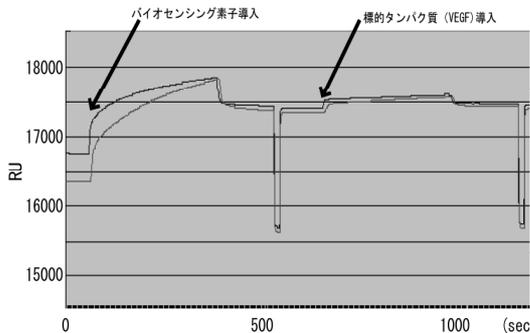


図7 足場ペプチドへのバイオセンシング素子の固定化および VEGF の検出

これらの結果から、設計・精製したロイシンジッパーモチーフを直列に配置した足場ペプチドは、金薄膜（SPR センサーチップ）に固定化されることがわかった。本研究で用いたロイシンジッパーにはシステイン残基（SH基）を含まないことから、足場ペプチドのN末端側に配置したシステイン残基が固定化に関与したことが考えられた。また、VEGFを標的とした分子認識ペプチドは、足場ペプチドを金薄膜（SPRチップ）に固定化した後、ロイシンジッパーの特異的結合により固定化されたと考えられた（図8）。さらに、SPRのセンサーグラムの結果より、直列にロイシンジッパーを連ねるほど、シグナルの増加が見られた。これらの結果から、ロイシンジッパーを直列に配置の繰り返し回数に応じてより高感度に標的タンパク質を検出できることが示唆された。

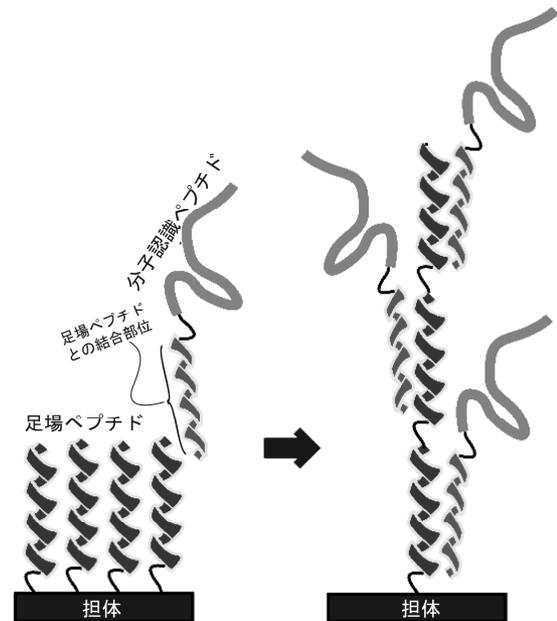


図8 固定化の様子（予想図）

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計4件）

- ① 佐々木達也、宮地寛登：「ロイシンジッパーモチーフの特性を利用したペプチドの高密度固定化法の開発」日本農芸化学会（東大・駒場）2010年3月29日
- ② 佐々木達也、宮地寛登：「分子認識ペプチドの設計および高密度化法の開発」日本分子生物学会（パシフィコ横浜），2009年12月9日
- ③ 原田将吾、宮地寛登：「ペプチドの分子認識能を用いた血管増殖因子（VEGF）検出法の開発」日本分子生物学会（パシフィコ横浜）2009年12月9日
- ④ 高木政人、宮地寛登：「蛍光標識分子認識ペプチドを用いた血管増殖因子（VEGF）検出法の開発」日本分子生物学会（パシフィコ横浜）2009年12月9日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮地 寛登 (MIYACHI HIROTAKA)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：50358131