

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15318

研究課題名（和文）オンサイトプロテオミクスを実現する集積分子アレイの開発

研究課題名（英文）Development of Organized Molecular Assembly-Based Array Systems Toward On-site Proteomics

研究代表者

南木 創（Minamiki, Tsukuru）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：40793980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の後天的な化学修飾（＝翻訳後修飾）は、疾病の発症や進行と関連・影響することから、医療や創薬の精度を高めるうえで重要な測定対象といえる。しかしながら、翻訳後修飾を網羅し、かつ定量するオンサイト分析技術は確立されていなかった。そこで本研究では、オンデマンドに選択性を調節可能な分子集積体（＝分子認識膜）とトランジスタアレイを組み合わせることで、翻訳後修飾の迅速・簡易な検出技術の開発に取り組んだ。その結果、翻訳後修飾のモデル骨格であるリン酸化合物類の同時識別に成功し、翻訳後修飾情報の利活用を促進する分析基盤の構築に向けた指針を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多岐に渡るタンパク質の化学修飾の全てに対応する分析試薬を揃えることは非現実的であり、従来技術では極微量のタンパク質の多彩な修飾状態を定量的かつ網羅的に同定することは困難であった。本研究で得られた知見は、翻訳後修飾解析におけるスループットの向上に大きく貢献するものであり、医療・創薬の現場にて高次元でのタンパク質情報の利活用が期待できる。また、従来技術を凌駕する時間分解能によって、疾病の発症・進行過程と翻訳後修飾の連続的変化とを関連付けることが可能となり、発症メカニズムの解明や新たな治療方針の策定などへの発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Post-translational modification (PTM) for proteins is one of the beneficial sensing targets in medical treatments and drug discovery because the expression pattern of PTM highly corresponds to the appearance and advance of various diseases. However, on-site sensing systems for achieving comprehensive and quantitative analyses of PTM is not established yet. To achieve the on-site analysis of PTM information, this research developed a rapid and straightforward discrimination system for chemical compounds with mutual molecular structures by combing a transistor array device and molecular assembly with easy-tunable analyte selectivity. As a result, the simultaneous discrimination of model units of PTM (=phosphorous compounds) was successfully demonstrated. We believe that our strategy can pave the way for the construction of innovative analytical platforms to accelerate the utilization and application of PTM information in diagnostics and related fields.

研究分野：分析化学

キーワード：分子集積体 分子認識 トランジスタアレイ 自己組織化単分子膜 オンサイト分析 金属錯体型レセプター プロテオミクス

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) プロテオーム解析技術の現状

タンパク質をはじめとする生体分子の検知は、疾病の早期発見や治療方針の決定において重要である。特に近年、タンパク質への後天的な化学修飾 (= 翻訳後修飾) は疾病の発症や進行と密接に関連・影響することが明らかにされつつあり、タンパク質の修飾状態は医療や創薬の精度を高めるうえで重要なターゲットといえる。しかしながら、タンパク質修飾の網羅的かつ定量的なオンサイト分析技術は確立されておらず、医療や創薬の現場における修飾情報の“網羅的・定量的な取得”と“疾病予防・診断への利活用”が進んでいない。これは、修飾検知に向けた分析技術の簡略化・高速化や低コスト化が困難であることに由来する。例えば、多岐に渡るタンパク質の化学修飾 (例: リン酸化、メチル化、ホルミル化など) の全てに対応する分析試薬を揃えることは非現実的であり、オンサイトでタンパク質の修飾状態を網羅的に把握することは難しい。また、タンパク質の化学修飾量や修飾残基の同定には高精度な分析装置 (例: 質量分析計など) を要する。このため、簡易な計測技術 (例: アフィニティクロマトグラフィなど) では定量的なプロテオーム解析は困難であった (引用文献)。

### (2) 分子センサアレイ

オンサイトで多成分を同時に定性・定量するアプローチとして、分子センサアレイが注目されている (引用文献)。これは、交差応答性を示すセンサ群から取得されたパターンを機械学習によって解析 (= パターン認識) することで、多数の標的分子を網羅的に識別可能な手法である。分子センサアレイは多成分が混在した標的系の分析に適しており、翻訳後修飾の識別にも応用されている (引用文献)。しかしながら、多岐に渡る翻訳後修飾情報を網羅的に計測するには、多彩な種類のセンサ分子群の調製を要することから、アレイ開発において材料合成の過程が律速となる。また、従来のセンサアレイでは、比色・蛍光プローブから生じた光強度・波長変化をセンサ信号として利用するため、定量的な計測には分光器を要する。可搬性に優れたシステムによってプロテオーム解析を完結するには、交差応答性センサ群を容易に調製する材料科学的手法と、大型の外部機器を介さずに定量的にシグナル取得が可能な検出機構を組み合わせた、新たな分子センサアレイの構築法を確立する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質の翻訳後修飾情報を定量的かつ高スループットに取得・解析するオンサイト分析技術の創出を目的とし、分子集積体の並列化によるセンサアレイ・デバイスの開発に取り組んだ。デバイス上に導入する分子集積体については、集積体形成を阻害する低分子添加剤を任意の割合で混ぜることで、分子認識性の官能基密度をデバイス上にて調節する手法を用いた (引用文献)。また、センサ信号を電氣的・走査的に取得し、かつ可搬性に優れたトランジスタアレイをデバイス基盤とすることで、多数のセンシング情報を迅速かつ定量的に計測可能なオンサイト分析システムを構築した (引用文献)。これらの材料科学・デバイス工学的手法を組み合わせ、上述の分子センサアレイにおける課題の解決を図ることで、オンサイトにおけるプロテオーム解析の実現に資するセンサアレイ・デバイスの原理実証を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 1分子から多彩な分子認識場を創出する分子集積体の設計・調製

固液界面に構築される分子認識場では、レセプタの集積状態が多点相互作用の発現や水素結合・静電相互作用の発現に大きく影響する。そこで、分子集積体の形成を変調する水素結合アクセプタ骨格を組み込んだチオール化合物を設計・合成した。チオール基と対になる部位には、代表的な翻訳後修飾であるリン酸に対して配位結合性を示す亜鉛錯体化合物を導入した。合成分子を溶解した非プロトン性溶媒に対し、水素結合ドナー性を持つ各種低級アルコールを添加することで、液相中における集合状態の調節を図った。その後、当該液相からトランジスタのフローティングゲート電極 (金薄膜) 上に分子集積体を転写・固定化することで、各々異なる選択性を持つ分子認識場を構築した。液相中及び金薄膜上における分子集積体の集合状態については、各種分光測定や表面分析法によって同定した。

### (2) 多成分識別能の検証

分子集積体から形成された各種分子認識場をトランジスタアレイ上に並列化することで、多様な標的分子に対して交差応答性を持つ分子センサアレイを作製した。当該アレイに対し、翻訳後修飾モデルとしてリン酸化合物類の電氣的検出と識別を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 分子認識場のライブラリ化

合成チオール化合物の液相中の挙動を UV-vis 吸光分光測定に調査したところ、添加剤（各種低級アルコール）の濃度・立体構造と関連した集合状態を取り得ることが確認された。また、液相にて調製された分子集積体を金薄膜上に導入したところ、液相中の集合状態と関連した結晶性・非晶性の分子膜が形成されたことが、表面分析（X線光電子分光法、表面エネルギー測定、水晶振動子マイクロバランス法、原子間力顕微鏡）の結果から示唆された。このことから、溶媒条件を調節することで単一の材料から多彩な分子認識場をプログラムし得る材料の基本設計を見出した。

##### (2) 分子センサアレイ・デバイスを用いた多成分同時分析

単一の材料から構築された5種類の分子認識場をトランジスタアレイ上に集積し、当該デバイス上にリン酸化合物類を導入したところ、同一の標的分子に対して、分子認識場毎に異なる電気信号応答が得られた。そこで、標的分子・分子認識場の組み合わせから得られた多変量性の応答信号をデータセットとし、各種パターン解析（線形判別分析・主成分分析・階層クラスター分析）を行ったところ、11種類のリン酸化合物類の構造の差異を識別することに成功した。本識別結果は、分子認識場の性状（分子集積体の集合状態・高次構造や、固液界面における疎水性の違い等）と関連していることが、階層クラスター分析の結果によって支持された。また同一のアレイを用い、混成した複数成分の相対的な濃度変化を半定量的に識別できることを確認した。このことから、当該アレイ・デバイスはタンパク質中の翻訳後修飾の有無・種別のみならず、修飾量を定量し得ることが示唆された。

以上のように、1種類の材料から成るアレイ・デバイス上にて、多成分の同時定性・定量が可能であることを実証した。本研究でモデルとしたリン酸化合物はタンパク質をはじめとした生体高分子の主要な修飾単位であり、作製したデバイスが示したその精緻な識別能から、本研究を通じてオンサイトプロテオミクスの実現に向けた重要な指針を得ることができた。また、当該知見は分子センサアレイの高機能化（分子選択性の多様化や作製プロセスの簡素化）において有効であり、翻訳後修飾に限らず様々な分子種の解析への適用が考えられる。例えば、汎用的な分子計測技術である質量分析法では、構造異性体の識別には高価な分離カラムや前処理を必要とする。一方で、本研究で作製した分子センサアレイ・デバイスは微小な分子構造の変化を識別できることから、ワンチップ上にて構造異性体の同定・解析が達成し得る。本研究で実証した分子センサアレイ・デバイス構築法は、今後様々な分野におけるオンサイト分析のニーズに応える戦略として期待できる。

#### <引用文献>

- M. May, Technology Feature | Translating big data: The proteomics challenge, *Science*, 360, 2018, 1255.
- Z. Li, J. R. Askim, K. S. Suslick, The Optoelectronic Nose: Colorimetric and Fluorometric Sensor Arrays, *Chem. Rev.*, 119, 2019, 231-292.
- Y. Liu, J. Lee, L. Perez, A. D. Gill, R. J. Hooley, W. Zhong, *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 2018, 13869-13877.
- T. Minamiki, Y. Ichikawa, R. Kurita, Systematic investigation of molecular recognition ability in FET-based chemical sensors functionalized with a mixed self-assembled monolayer system, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 12, 2020, 15903-15910.
- K. Nakazato, *Sensors*, 9, 2009, 8831-8851.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukuru Minamiki, Yuki Ichikawa, Ryoji Kurita	4. 巻 20
2. 論文標題 The Power of Assemblies at Interfaces: Nanosensor Platforms Based on Synthetic Receptor Membranes Sensitivity using an Organic Field-Effect Transistor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 2228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s20082228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 富田 峻介, 菅井 祥加, 南木 創, 栗田 僚二	4. 巻 88
2. 論文標題 分子アレイデバイスと多変量解析による生体試料評価法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 電気化学	6. 最初と最後の頁 262-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5796/denkikagaku.20-TE0006	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南木 創
2. 発表標題 機能性界面・空間のマルチスケール制御に立脚したバイオ分析基盤の開発
3. 学会等名 第4回TIA-EXA広域エレクトロニクス融合セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南木 創
2. 発表標題 選択的相互作用により駆動する固体発光ポリマーシステム
3. 学会等名 新技術説明会（JST）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川 佑貴, 南木 創, 栗田 僚二
2. 発表標題 分子認識能の自在変調を指向した混成単分子膜修飾トランジスタの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第42回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 裕真, 南木 創, 小笠原 渉, 栗田 僚二
2. 発表標題 高スループットかつ定量的な微生物解析に向けたデジタルマイクロアレイの開発
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南木 創, 市川 佑貴, 栗田 僚二
2. 発表標題 多彩な分子応答性を示す混成単分子膜に基づいたFET化学センサの開発
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南木 創, 江坂 亮祐, 栗田 僚二
2. 発表標題 Preparation of a Polythiophene Luminescent Film Based on the Polymer Composite System
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 富永 昌人 編（分筆：南木 創、栗田 僚二）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 410
3. 書名 近未来のデジタルヘルスを支える酵素バイオ技術（第iv編 第9章）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者個人HP <a href="https://www.tsukuru-m.com/">https://www.tsukuru-m.com/</a> 産業技術総合研究所 ナノバイオデバイス研究グループ <a href="https://unit.aist.go.jp/hmri/nb5/">https://unit.aist.go.jp/hmri/nb5/</a>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------