

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22360341

研究課題名(和文)ペプチドチップ高度化にむけた高機能ペプチド捕捉分子群の創製

研究課題名(英文)Construction of functional peptide ligands toward peptide biochips

研究代表者

三原 久和 (Mihara, Hisakazu)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：30183966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：低コスト・汎用性のあるペプチドチップの創製を目標にして、タンパク質の構造特性、機能特性や微生物・細胞特性をハイスループットに解析するペプチドチップ開発のために、ファージ提示法や糖結合型ペプチドなどを駆使して高機能化ペプチド捕捉剤分子群を創製する基盤研究を実施した。ファージ提示法による高機能ペプチド捕捉分子群の開発、ファージ提示ペプチドチップの開発、糖結合ペプチド捕捉剤の設計・合成、および細胞相互作用するペプチド捕捉剤分子群の開発において所定の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：To develop peptide biochips with high-throughput functions, a variety of peptide ligands were constructed by means of chemical and phage-display methods. It is successfully demonstrated that functional peptides were synthesized by a phage-display method using a beta-loop peptide library, peptide-displaying phage-chips were constructed, a variety of sugar-conjugated peptides (with gold-nanoparticles) were prepared, and peptides functioning to cells were also constructed.

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：バイオチップ ペプチド 捕捉剤

## 1. 研究開始当初の背景

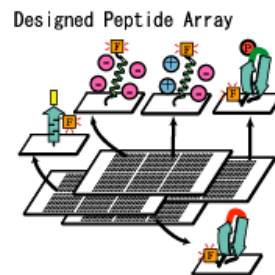
ヒトゲノムを初め様々な生物のゲノム配列の解読が完了し、我々は膨大な遺伝子情報を入手可能になり、それらを有効に活用するポストゲノム時代に突入した。そのような時代の先駆的技術として、外部刺激に対する生体応答を遺伝子発現量パターンとして解析する DNA チップが開発された。一方、生命維持活動を直接担っているのは遺伝子産物であるタンパク質であり、DNA チップ技術と合わせてタンパク質ネットワークを直接検出するプロテインチップや遺伝子と細胞あるいはリガンドと細胞などの相互作用を解析する細胞チップの技術開発が精力的に進行している。これらの次世代バイオチップの開発のためには、ターゲットを捕捉する高機能の生体分子群（捕捉剤）の開発が不可欠である。

抗体や発現タンパク質を捕捉剤として利用し、高度にタンパク質相互作用を網羅的に解析するためのプロテインチップが種々開発され、企業の実力を示すべく市場化されている。しかしながら、これらの捕捉分子群は、開発コストや巨大な生体高分子の製造コストが高く、チップ1枚が10~30万円もかかり、高度な研究以外での展開は不可能である。一方、医療や環境・食品など現場で簡便に利用できるバイオチップ創製に期待が集まっている。用途により要求性能は異なるが、実用的に求められる性能は高度な研究用の網羅的解析チップではなく、安定な検出用分子群（捕捉剤）の利用で簡便に初期診断または解析ができる低コストで化学的に安定なバイオチップである。ペプチドチップなどの小分子チップはこの要求に適合した有望なバイオチップである。

## 2. 研究の目的

プロテインチップ・細胞チップなどの次世代の医療や環境・食品のデジタル解析に有用なバイオチップ創製に期待が集まっている。このような目的のバイオチップ創製のために、ターゲットを捕捉する生体分子群の開発や高度ハイスループットな検出法の開発が不可欠である。この際重要なポイントが、コストである。モノクローナル抗体など捕捉分子群のコストが高いものでは、チップ1枚が10~30万円もかかり、高度な研究以外での展開は不可能である。そこで要求・注目されるのが、低コストで化学的に安定して製造できるペプチドチップなど小分子群チップである。このような実用に近づいてきたバイオチップ開発の鍵となるのがターゲットを高度に認識・識別する高性能の捕捉剤分子群の開発である。本研究では、申請者の蓄積してきた成果を土台にして、低コスト・汎用性のあるペプチドチップの創製を目標にして、タンパク質の構造特性、機能特性や微生物・細胞特性をハイスループットに解析するペプチドチップ開発のために、ファージ提示法や

糖結合型ペプチドなどを駆使して高機能化ペプチド捕捉剤分子群を創製する基盤研究を実施することを目的とする。



## 3. 研究の方法

今までの科研費を中心としたペプチドチップ基礎研究を土台にして研究を発展させるべく、以下の研究課題を設定し、研究を実施する。

(1) ファージ提示法による高機能ペプチド捕捉剤分子群の開発

今までに、ペプチドチップの有用性をデモンストレーションするために、300種程度の立体構造を $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シート構造に固定化したペプチド捕捉剤分子群を設計・化学合成してきた。これにより、「パターン認識チップ（プロテインフィンガープリント法）」を世界に先駆けて開発した。これまでの科研費研究で獲得した成果を発展させ、より高機能で安価に多数のペプチド捕捉剤分子群を生産するために、化学合成とともに、ファージ提示法を採用したデザインペプチドチップ作成法を開発することを目的とした研究を実施した。

(2) ファージ提示ペプチドチップの開発

ペプチドを提示したファージ群を直接基板上に固定化した斬新なペプチドチップの創製を試みた。ファージを直接捕捉剤として利用できればより簡便にペプチドアレイの創製ができる。ペプチドチップの実用的展開を念頭において、例えば、「糖尿病の安価診断を可能にするインシュリン検出ペプチド群」等の捕捉剤開発を行った。

(3) 糖結合ペプチド捕捉剤の設計・合成

糖結合型の機能化ペプチド捕捉剤分子群を設計・合成した。糖ペプチド群を用いることにより、レクチンや糖抗体など微生物や細胞認識に関連したタンパク質を検出するペプチド分子群を創製できる。糖ペプチド分子群を利用して細胞表面や微生物表面の糖結合タンパク質を識別させ、「ガン細胞の解析や食品や環境中の微生物や病原菌などを解析できるペプチドチップ」創製に展開できる。

(4) 細胞相互作用するペプチド捕捉剤分子群の開発

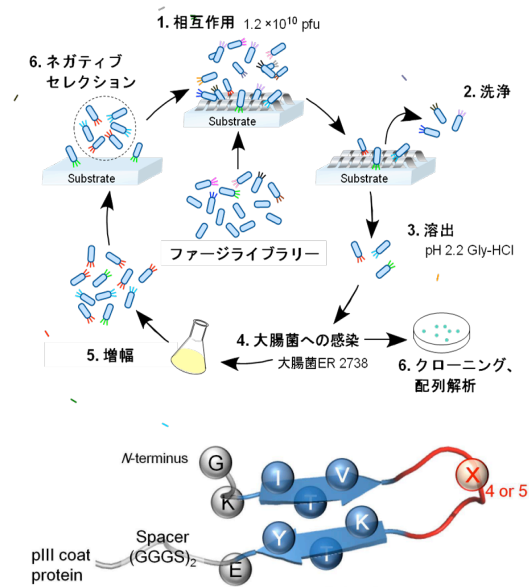
細胞解析チップが細胞の機能解析やガン細胞検査などにむけて注目されている。ペプチドチップの有用性を格段に向上させるために、細胞と相互作用し、細胞機能を解析できる機能化ペプチド捕捉剤分子群を設計合成した。細胞との相互作用を解析できるペ

チドチップとしての有用性を評価する。細胞との相互作用するペプチド捕捉分子群としては、上記 1~3 で合成するリガンドが使用可能である。

#### 4. 研究成果

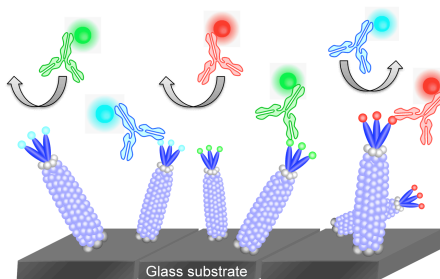
##### (1) 有用なペプチド性捕捉分子群の開発：ペプチド提示ファージ法による合成

より多様な種類のペプチド群を創製するために、遺伝子のライブラリから探索していく分子生物学的手法による方法を導入した。M13 ファージを用いたペプチド提示ファージ法により、 $\beta$  ループ構造を有するデザインペプチド群を合成する方法を確立した。これを用いて  $10^6 \sim 10^7$  個レベルのペプチドライブラリを構築し、抗がん剤の標的タンパク質であるジヒドロ葉酸還元酵素に対してスクリーニングを行い、酵素ポケットに特異的に結合する  $\beta$  ループペプチドリガンド群を獲得した。また、同じ  $\beta$  ループペプチドファージライブラリから、インシュリンに特異的に結合する有用リガンド群を獲得した。



##### (2) ファージ提示ペプチドチップの創製：

抗体結合ペプチド提示したファージをそのまま固定化する方法を種々検討し、抗体検出におけるファージペプチドチップ作製のための基盤構築を達成した。

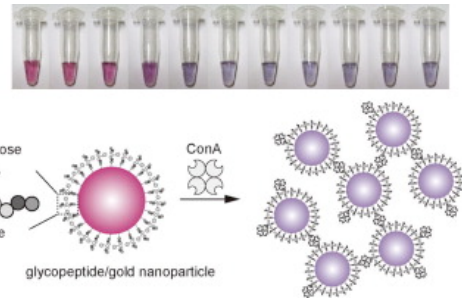


##### (3) 糖結合ペプチド捕捉剤の設計・合成：

糖結合タンパク質を標的とした、単糖ペプチド捕捉分子を化学合成法により、約 20 種類設計合成し、これをチップ化するために必要なデザイン糖ペプチドとタンパク質との相互作用を詳細に解析した結果、特異的に強く結合するペプチド群を獲得した。

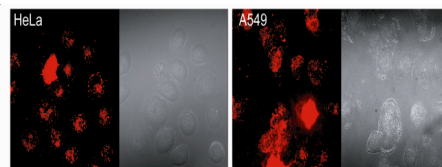
##### (4) 糖結合ペプチドナノ粒子捕捉剤の設計・合成：

上記 3 の研究と関連して、単糖ペプチドを金ナノ粒子に結合させた捕捉剤を多種設計合成する研究を新たに追加した。15 種類の単糖ペプチド群を設計・合成し、40nm の金ナノ粒子 (GNP) と複合化した、単糖ペプチド-GNP 捕捉剤を合成した。単糖ペプチド-GNP 群は、標的糖結合タンパク質を GNP の集合化を利用した目視検査を可能とし、また単糖ペプチド単体と比べて、1000 倍以上の強い結合性を示した。



##### (5) 細胞相互作用するペプチド捕捉剤分子群の開発：

細胞解析チップが細胞の機能解析やガン細胞検査などにむけて注目されている。ペプチドチップの有用性を格段に向上させるために、細胞と相互作用し、細胞機能を解析できる機能化ペプチド捕捉剤分子群 200 種を設計合成した。細胞との相互作用を解析できるペプチドチップとしての有用性を評価するために、細胞毒性活性や細胞挿入活性評価システムの構築に成功した。また、ペプチドの配列のわずかな違いにより細胞毒性活性や細胞挿入活性が大きく異なることを見出した。これら細胞相互作用ペプチド群の活性の違いを利用した細胞解析ペプチドチップ開発のための高機能ペプチド捕捉剤の開発に成果を得た。これらの種々の高機能ペプチド捕捉分子群の創製は、次世代型バイオチップであるペプチドチップ開発のための重要な基盤研究となった。



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)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. K. Arai, H. Tsutsumi, H. Mihara, A Monosaccharide-modified Peptide Phage Library for Screening of Ligands to Carbohydrate-binding Proteins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 4940-4943 (2013) 査読有
2. H. Tsutsumi, H. Ohkusa, H. Park, T. Takahashi, H. Yuasa, H. Mihara, Gold Nanoparticles Conjugated with Monosaccharide-modified Peptide for Lectin Detection, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 6825-6827 (2012) 査読有
3. T. Sawada, K. Ishiguro, T. Takahashi, H. Mihara, A Novel Peptide Array Using a Phage Display System for Protein Detection, *Chem. Lett.*, 40, 508-509 (2011) 査読有
4. T. Sawada, K. Ishiguro, T. Takahashi, H. Mihara, A Novel  $\beta$ -Loop Scaffold of Phage-Displayed Peptides for Highly Specific Affinities, *Mol. BioSyst.*, 7, 2558-2562 (2011) 査読有
5. K. Usui, T. Kakiyama, K.-Y. Tomizaki, M. Mie, E. Kobatake, H. Mihara, Cell Fingerprint Patterns Using Designed  $\alpha$ -Helical Peptides to Screen for Cell-specific Toxicity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 6281-6284 (2011) 査読有
6. K.-Y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, Protein-Protein Interaction and Screening: Array-based Techniques for Screening Disease-Associated Biomarkers in Predictive/Early Diagnostics, *FEBS Journal*, 277, 1996-2005 (2010) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 新井佳菜子・大倉裕通・堤 浩・三原 久和, マンノース修飾ペプチドを提示したファージライブラリの構築とコンカナバリン A 結合性ペプチドの探索, 第 49 回ペプチド討論会, 2012 年 11 月 7 日~9 日, 鹿児島
2. Hisakazu Mihara, Designed peptide libraries for cell analyses, 2012 International Symposium on Advanced Biological Engineering, 2012 年 10 月 25 日~29 日, 中国
3. Park Hyejin, 高橋 剛、堤 浩、三原 久和,  $\alpha$  ヘリックスペプチドを結合した金ナノ粒子の細胞導入活性とガン細胞応用, 第 48 回ペプチド討論会, 2011 年 09 月 27 日~29 日, 札幌
4. 大草 寛之、朴 恵珍、高橋 剛、堤 浩、湯浅 英哉、三原 久和, レクチンに対する結

合多様性を有する単糖導入ペプチド修飾金ナノ粒子の創製, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 09 月 12 日~14 日, つくば

5. Hisakazu Mihara, Designed peptide libraries for protein and cell analyses, 5th International Peptide Symposium, 2010 年 12 月 4 日~6 日, 京都

[図書] (計 1 件)

1. 白井健二, 富崎欣也, 三原久和, デザインペプチドを用いたプロテインアレイと細胞アレイ, 化学フロンティア 22, 生命現象を理解する分子ツール, 化学同人, 181 (79-87) (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原 久和 (MIHARA, Hisakazu)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号 : 30183966

(2) 研究分担者

堤 浩 (TSUTSUMI, Hiroshi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号 : 70398105

(3) 連携研究者

なし