

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05530

研究課題名(和文) バイオトランジスタによるタンパク質翻訳後修飾の電気的検出

研究課題名(英文) Electrical detection of protein post-translational modification using biotransistors

研究代表者

合田 達郎 (GODA, Tatsuro)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：20588347

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)：分子認識による電荷密度変化を直接検出する「バイオトランジスタ」を用いて、タンパク質の翻訳後修飾を電気的に検出する手法を開発した。本手法は標識を用いないラベルフリー検出であり、分析時間の短縮・低コスト化・装置の小型化・高スループット化を実現し、翻訳後修飾のポイント・オブ・ケア診断を志向する。本成果は、ゲノム解析からエピゲノム調節・タンパク質翻訳・翻訳後修飾の解析に至るまで網羅的な生命情報をすべてトランジスタで評価するという統一されたプラットフォームの提供に繋がる。網羅的解析により偽陽性・偽陰性の問題を克服しつつ、医療インフラを必要としない分散化・ユビキタス化を標榜した次世代型医療に直結する。

研究成果の概要(英文)：We developed a method to electrically detect the post-translational modification of proteins, a key biological phenomena, using "bio-transistor" which directly detects the charge density change of biomolecules at the electrode/solution interface. This method is label free, without using fluorescent dyes, thereby realizing reduction of analysis time and cost, miniaturization of the apparatus, high throughput, and point-of-care diagnosis of the post-translational modification. Our achievements lead to the provision of bio-transistor as a unified platform that evaluates multi-modal biological information ranged from genome to epigenome, transcriptome, and post-translational modification. It is a challenging research subject directly linked to the next-generation medical treatment advocating decentralized ubiquitous medical infrastructures using portable devices while providing high-quality diagnosis by overcoming false positive/false negative problems through comprehensive analysis.

研究分野：バイオセンシング

キーワード：バイオトランジスタ 翻訳後修飾 ヒストン アセチル化 水晶発振振動子 表面プラズモン共鳴 DNA  
アプタマー タンパク質吸着

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がんや疾病の早期発見・早期治療を目的として、バイオマーカーと呼ばれる疾病関連生体分子の量的変化を高感度に検出する手法の開発が求められている。一方で、アルツハイマー病の原因物質であるリン酸化タウタンパク質に代表されるように、翻訳後修飾といった生体分子の質的变化も疾病と密接に関係することが明らかとなっている。或いは、ヒストンのアセチル化やメチル化のようにタンパク質の修飾が遺伝子の転写調節を担っている例もあり、遺伝子転写調節異常によるがん化機構など、翻訳後修飾の解析はエピゲノミクスの観点からも重要である。今後、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームの包括的なバイオ分析ががんや病気の診断に重要になってくる。

しかし、昨今のバイオセンシング研究は、検出の高感度化などに重点を置いたものが趨勢であり、翻訳後修飾などの形質変化に着目して検出・診断する例はほとんどない。翻訳後修飾の検出は依然として基礎研究の範疇にとどまり、大型の質量分析機あるいは煩雑なイムノアッセイ (ELISA 等) による評価が主流であり、長時間・高コスト・低スループット等の欠点は病気の診断を目的としたバイオマーカーのセンシング法としては相容れない。

電荷やイオンを直接検出する電界効果トランジスタ (FET) を用いた電氣的バイオセンシングは、核酸検出・シーケンシングで成功を収めたが (Miyahara *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2225; Rothberg *et al.*, *Nature* **2011**, *475*, 348)、タンパク質応用には消極的であった。これは、タンパク質の電荷密度が低く高感度検出には不向きであることと、タンパク質の大きさが溶液のデバイ長を凌駕し、表面電荷が遮蔽されることが問題であったためである。しかし、我々はこれまでに、タンパク質分子表面に化学的に標識した電荷を検出できること (Goda *et al.*, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8946)、生理学的高イオン強度下でも電極上のタンパク質の局所電荷を検出できること (Goda *et al.*, *Langmuir* **2012**, *28*, 14730)、アプタマー固定化 FET により特異的検出をおこなえること (Goda *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *45*, 89) を見出した。さらに、半導体型バイオセンサーと水晶発振振動子 (QCM) センサーの統合に成功し (Goda *et al.*, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7308.)、同一電極で電荷と重量を同時に検出する技法を開発したことにより、標的分子の電荷/重量比をラベルフリーかつ水和環境で求めることが可能となった。ヒストンのアセチル化はリジン残基の正電荷を奪い、DNA の転写を促す役割を担っており、転写異常は細胞のがん化と密接に関連している。したがって、電荷/重量比を同時に測定することにより、翻訳後修飾によって変化するタンパク質表面電荷を特異的かつ直接

検出するという可能性を見出した (図 1)。

## 2. 研究の目的

本研究では、分子の電荷密度変化を直接測定することができる電位計測型バイオセンサーを用いて、翻訳後修飾によるタンパク質分子の電荷密度変化をラベルフリーで検出する新たな手法を開発する。トランジスタのいわゆる電界効果による信号変換機構を利用した半導体素子を内蔵したバイオトランジスタは、核酸のシーケンシング (Miyahara *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2225) や、細胞糖鎖シアル酸の検出 (Matsumoto *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12022) 等に応用されてきた。近年では、電子デバイスの特長である小型化・高集積化を駆使して、次世代型超高速 DNA シーケンサーが製品化されている (Rothberg *et al.*, *Nature* **2011**, *475*, 348)。我々は、電荷検出法を進展させ、バイオトランジスタと QCM センサーを統合し、「電荷」と「重量」という異なる物理パラメータを同時に検出することによって、タンパク質の高感度検出のみならず、生体分子の複雑な吸着現象や、高次構造変化 (変性) の解析に成功してきた (Goda *et al.*, *Langmuir* **2012**, *28*, 14730)。本研究では、この電荷・重量検出を応用し、遺伝子の転写調節を司るヒストンのアセチル化・メチル化をモデル系として、タンパク質翻訳後修飾の検出をおこなう。さらに、細胞から抽出したヒストンのアセチル化・メチル化度と転写異常との相関関係を明らかにするモデル実験をおこない、翻訳後修飾の高速・簡便なポイント・オブ・ケア診断の可能性を追求する。

## 3. 研究の方法

エピゲノムに密接に関連するヒストンのアセチル化とメチル化の検出をおこなう。ヒストンのアセチル化は、ヒストンテイルと呼ばれる部位のリジン残基 ( $-NH_3^+$ ) がヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) によってアセチル化 ( $-NH-CO-CH_3$ ) され、正電荷を失うことで DNA との静電相互作用が弱まる現象である (図 2)。まずは、精製ヒストンとアセチル化試薬 (Sulfo-NHS acetate) を用い

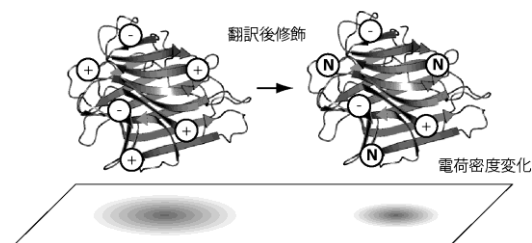


図 1. 翻訳後修飾に伴うタンパク質の電荷密度変化の電氣的検出. N: neutral

アセチル化度の異なるヒストンを作製する。次に、半導体バイオセンサーによる電位測定により、界面電位変化 ( $\Delta V = \Delta Q/C$ ,  $C$  は電気二重層キャパシター) から吸着したヒストンにともなう界面電荷密度変化  $\Delta Q$  が求まる。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法や QCM 法により得られるヒストン吸着量を用いてヒストンの電荷/重量比を求める。そして、質量分析あるいは蛍光ラベル測定から得られたヒストンのアセチル化度との比較をおこなう。一方、ヒストンのメチル化は電荷の変化をとまなわれない ( $-\text{NH}_3^+-\text{Me}_n$ ,  $n=1-3$ )。そこで、メチル化のおこなわれていないリジン残基については化学的に電荷をラベルする手法を採用する。これは、以前、タンパク質の高感度電荷検出法として開発された手法であり (Goda *et al.*, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8946)、未修飾のリジン残基について選択的に負電荷へと電荷を変換する電荷ラベリング法である。アセチル化の実験と同様に、既存の方法との比較をおこない、メチル化度の定量的な検出をおこなう。

リガンドとなるアプタマーを選定することにより、電極に捕捉したタンパク質の配向を制御する。吸着タンパク質の局所電荷と吸着重量という異なる物理パラメータを同時に検出することにより、翻訳後修飾部位の決定をおこなう。金電極上に様々な DNA 塩基配列を有する核酸アプタマーを固定化する。核酸アプタマーは、標的分子と高い親和性 ( $K_d$  = 数 nM) を有するオリゴ DNA からなる人工リガンドであり、高い生化学的安定性や容易に官能基を導入することができるなどの利点を有する。また FET に応用する場合、抗体に比べてアプタマーは分子サイズが小さい (<10 nm) ため、溶液のデバイ長内で標的となるタンパク質を捕捉することが可能となり、測定緩衝溶液中の電解質による遮蔽効果を回避することが可能となる (Goda *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *45*, 89)。さらに、オリゴペプチドなど核酸以外のアプタマーも同様に用いることができる。また、我々が近年開発した電極表面に対するタンパク質の非特異的吸着を抑制する効果を有する自己組織化単分子膜 (SAM) を作製し、信号のシ

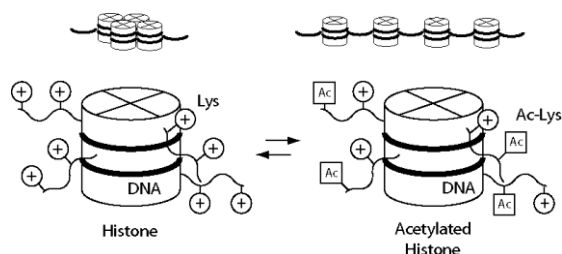


図 2. ヒストンに存在するリジン残基のアセチル化に由来するエピゲノムの電氣的検出

グナル・ノイズ比を高くする (Goda *et al.*, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8683)。

#### 4. 研究成果

ヒストンと Sulfo-NHS acetate の混合モル比を変えることにより、異なるアセチル化度のヒストンが得られることを確認した (図 3)。次に、ヒストン結合性チオール化 DNA アプタマーと Sulfobetaine undecanethiol (SB-SH) により、金電極表面に自己組織化単分子膜 (SAM) を形成した。DNA アプタマーを用いることにより、ヒストンに対して選択性吸着を可能にした。また、アプタマーを用いることで分子認識反応を電極/溶液界面の電気二重層の中でおこなうことが可能となり、FET を用いた電位計測でヒストンの表面電荷を検出できることが判明した。さらに、SB-SH を用いることにより、電極基板上でのヒストン分子や他の生体分子の非特異的吸着を抑制することが可能であった。

SAM 修飾金電極に対して、アセチル化度の異なるヒストンごとに FET を用いた電位計測と QCM を用いた重量計測をおこなったところ、ヒストン Lys 残基のアセチル化度が高くなるにつれて、電位/重量比が小さくなることが明らかとなった (図 4)。これは、Lys 残基のアセチル化によりタンパク質表面の正電荷が喪失するという現象に合致しており、世界

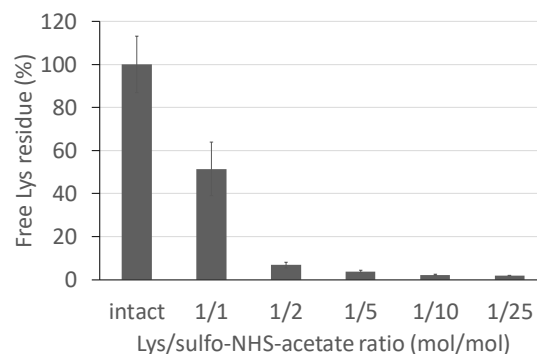


図 3. Sulfo-NHS acetate を用いたヒストン H4 のリジン残基の化学的アセチル化修飾

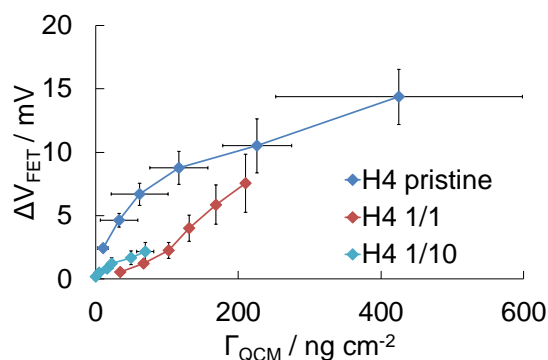


図 4. アセチル化度の異なるヒストン H4 の濃度を変えたときの FET 電位変化 ( $\Delta V$ ) と QCM 吸着量変化 ( $\Gamma$ ) の関係

初となる FET センサーを用いたタンパク質翻訳後修飾の電気的検出である。

翻訳後修飾に伴うタンパク質の電荷・重量変化という質的な変化を直接に計測するという取り組みは、翻訳後修飾にまつわる生命現象を解析するための新しいツールを提供することにつながる。従来のタンパク質翻訳後修飾の検出は、抗体を用いた「ELISA アッセイ」と、「質量分析」に分類される。前者は、ブロッキング・認識反応・一次/二次抗体ラベル化・分光学的検出と煩雑な手順を要し、持ち運びが不可能な光学検出装置が必要である。後者は、長時間の分析時間を要し、かつ装置が大型で分析センターなどのインフラ整備が必要である。一方、本手法では、手順を前処理・検出の二つに簡素化でき、バイオトランジスタの特長を生かした装置の小型化・高集積化・一般化・可搬化という、従来の手法では実現できない特長を有する。これらの特長はタンパク質翻訳後修飾のポイント・オブ・ケアを初めて可能にし、病気の診断を目的としたバイオマーカーのセンシングを行ううえで実用的である。従来のバイオセンシングは、遺伝子発現や遊離タンパク質などを定量的に計測するものが大部分であり、個体の生命現象を一つの切り口から眺めた限定的な情報にすぎず、絶えず偽陽性・偽陰性のリスクを内包している。したがって、ゲノム解析から遺伝子発現・転写調節・タンパク質翻訳、翻訳後修飾の解析に至るまでの生命情報を網羅的に解析・評価することにより、正確な病気の診断や病態の理解をおこなうことが重要である。分子の電荷密度変化からタンパク質翻訳後修飾を検出するという試みは、従来のバイオトランジスタの適用範囲を拡張させ、ゲノム・エピゲノム・プロテオームをバイオトランジスタという単一のプラットフォーム上で高速・安価に・その場で統合的に計測して、がんの早期診断など先進医療を提供する「医療革新」に繋がる重要な課題である。質量分析機などの大型装置を用いて翻訳後修飾を検出する既存の分析化学とは一線を画する。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tatsuro Goda, Daiki Higashi, Akira Matsumoto, Toru Hoshi, Takashi Sawaguchi, Yuji Miyahara, Dual Aptamer-Immobilized Surfaces for Improved Affinity through Multiple Target Binding in Potentiometric Thrombin Biosensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 査読有, 73, 2015, 174-180. DOI: 10.1016/j.bios.2015.05.067

[学会発表] (計 10 件)

- ① Tatsuro Goda, Biomimetic engineering for biosensing and bioscience, The 9th

International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE9) (招待講演) (国際学会), 2017 年

- ② Yuji Miyahara, Akira Matsumoto, Tatsuro Goda, Miyuki Tabata, Functional gate-field effect transistors for electrically neutral molecules, *Matrafured 2017* (招待講演) (国際学会), 2017 年
- ③ Tatsuro Goda, Yuji Miyahara, Chemical induction of cell membrane leakage measured under ammonia superfusion conditions using whole cell-based pH sensing transistors, 5th International Conference on Bio-Sensing Technology (国際学会), 2017 年
- ④ 合田達郎, 電界効果トランジスタを用いたバイオセンシング, 豊橋技術科学大学主催第 1 回 EIIRIS インテリジェントセンサ・MEMS 研究会 (招待講演), 2017 年
- ⑤ 合田達郎, 電位計測型 DNA バイオセンサー, 第 77 回日本分析化学討論会 (招待講演), 2017 年
- ⑥ Tatsuro Goda, Application of zwitterionic materials: From infection biomarker sensing to cell therapy, The 18th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium, (招待講演) (国際学会), 2016 年
- ⑦ 合田達郎, バイオミメティックスによるバイオセンシング, 第 218 回有機エレクトロニクス材料研究会, (招待講演), 2016 年
- ⑧ Tatsuro Goda, Yuji Miyahara, Cells-attached pH-sensing transistor system detects proton-permeable nanopores on plasma membranes by exogenous chemical compounds, *Biosensors 2016*, (国際学会), 2016 年
- ⑨ Tatsuro Goda, Yuji Miyahara, Organic bioelectronics create ionic microenvironments of inflammation and infection on phospholipid polymer to elucidate molecular dynamics of C-reactive protein, 10th World Biomaterials Congress (WBC 2016), (国際学会), 2016 年
- ⑩ 宮原裕二, 松元亮, 合田達郎, 田畑美幸, 機能性固/液界面の創製とバイオセンシングへの応用, 日本学術振興会 半導体界面制御技術第 154 委員会 第 99 回研究会, 2016 年

[図書] (計 2 件)

- ① 合田達郎, 膜 (日本膜学会編), 生体膜を真似る・生体膜を越える, 2017 年, 90-96
- ② Miyuki Tabata, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Field-Effect Transistors for Detection of Biomolecular Recognition, 2016 年, 13-25

〔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

<http://www.tmd.ac.jp/bsr/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

合田 達郎 (GODA, Tatsuro)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・

助教

研究者番号：20588347