

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03113

研究課題名（和文）細胞検査バイオチップ開発のための機能性ペプチドリガンド群の創製

研究課題名（英文）Development of various functional peptides for biochips analyzing cancer cells

研究代表者

三原 久和（Mihara, Hisakazu）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：30183966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ガン細胞や幹細胞等の分化や状態の迅速解析を行う、細胞検査バイオチップの開発のために、細胞と種々の異なる相互作用をする機能性ペプチドリガンド群の創製研究を行った。細胞診断・検査を可能とするバイオチップシステム創製への科学技術基盤へとつながる基盤研究となる。本研究では、化学的に安定で安価に製造できるペプチドを利用し、多種類の機能性ペプチド群の細胞との相互作用の違いをセル・フィンガープリントとして表現し解析する、新規の細胞検査用ペプチドバイオチップシステムを創製するための機能性ペプチド群を創製した。

研究成果の概要（英文）：In order to approach the development of peptide biochips analyzing properties of various cancer cells and stem cells, the construction of a variety of functional peptides interacting with cells has been performed. The peptide biochip system utilizes the cell fingerprint analyses for characterization of cell properties.

研究分野：生体分子科学

キーワード：生体分子科学 ペプチド 細胞相互作用 バイオチップ

### 1. 研究開始当初の背景

DNA チップから始まりタンパク質チップや細胞チップなど種々のタイプのバイオチップ（マイクロアレイ）の開発研究が競争的に行われている。網羅的解析の研究用 DNA チップは種々開発され、実用化されているが、タンパク質チップや細胞チップにおいては未だ基盤レベルの研究のみであり、臨床現場や食品検査など現場で実際に利用できるバイオチップには至っていない。化学的に安定で、利用価値の高いバイオチップの開発研究が重要視されている。

申請者は、約 10 年間ペプチドを捕捉分子リガンド群に用いたチップ（ペプチドチップ）の開発基礎研究に勢力を注入してきた。ペプチドチップは、抗体などのタンパク質チップや種々の細胞を配置させた細胞チップと大きく異なり、化学的に安定でより安価に作成できる利点を有している。一方、ガン細胞や ES 細胞、iPS 細胞の分化や状態を迅速・正確に検査する高効率な細胞検査・診断技術が望まれている。

### 2. 研究の目的

ガン細胞や ES 細胞等各種幹細胞の分化や状態の迅速解析を行う、細胞検査バイオチップの開発のために、細胞と種々の異なる相互作用をする機能性ペプチドリガンド群の創製研究を行う。臨床医の経験的判断で行っているガンの悪性度や種類などを医療現場で迅速・精度よく解析する手法や再生医療のための ES 細胞、iPS 細胞の分化や状態を正確に把握する、細胞診断・検査を可能とするバイオチップシステム創製への科学技術基盤の確立が期待されている。

本研究の細胞検査用バイオチップ創製研究の特色・独創点は、化学的に安定で安価に製造できるペプチドチップを利用し、ガン細胞等の分化や状態を迅速に検査する技術になる分子配置型の細胞解析チップを作成する点である。多種類の機能性ペプチド群の細胞との相互作用の違いをセル・フィンガープリントとして表現し解析する、新規の細胞検査用ペプチドバイオチップシステム（図 1）を創製するために重要である種々の細胞機能性ペプチドリガンド群の創製基盤研究を実施する。

### 3. 研究の方法

ガン細胞や幹細胞等の分化や状態の迅速・精密解析を行う細胞検査バイオチップ開発を目標として、細胞と種々の異なる相互作用

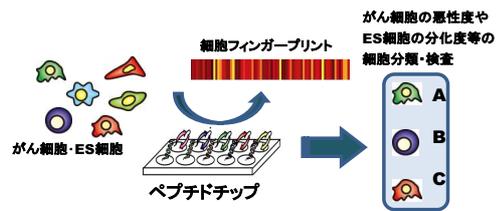


図 1 細胞検査用バイオチップの概念

用をする機能性ペプチドリガンド群を創製する基盤研究を以下の項目 1) ~ 4) により行う。

- 1) 細胞挿入活性を有するペプチド群の創製
- 2) 細胞表層タンパク質と相互作用する糖ペプチド群を含むペプチド群のファージ提示法による創製
- 3) ナノ粒子複合化による高機能ペプチド性ナノリガンド群の創製
- 4) 細胞相互作用ペプチド群を利用する細胞検査バイオチップへの展開

### 4. 研究成果

細胞と種々の異なる相互作用をする機能性ペプチド群を創製する基盤研究成果について、以下の項目 1) ~ 4) により記述する。

- 1) 細胞挿入活性を有するペプチド群の創製：ガン細胞の識別やタイピング解析を行えるシステムを構築するために、種々の細胞挿入活性を有する Cell Penetration Peptide (CPP) リガンド群を合成し、ガン細胞等との相互作用を詳細に解析した（図 2）。ガン細胞に対してペプチドリガンド群のアミノ酸配列のわずかな違いによる細胞選択性、細胞導入能の大きな差異についても細胞相互作用解析を行った。

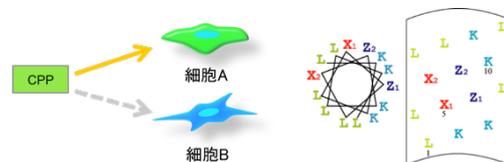


図 2 ガン細胞選択性を有する CPP 群

- 2) 細胞表層タンパク質と相互作用する糖ペプチド群を含むペプチド群のファージ提示法による創製：化学修飾を施すことができる新規のペプチド提示ファージ法を利用して、細胞表層タンパク質等をターゲットとし、これらと特異的に結合する  $\alpha$ ヘリックスや  $\beta$ ループ構造を有する糖ペプチド群を含むデザインペプチド群の

合成を実施した(図3)。獲得したペプチド群と細胞表層タンパク質との相互作用を解析した。

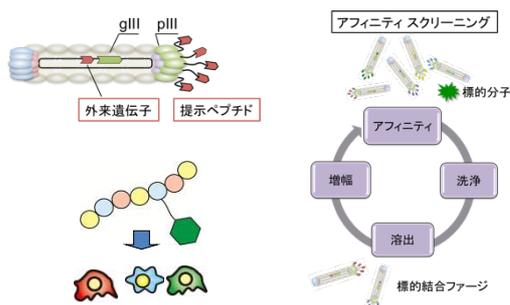


図3 ファージ提示法による機能性ペプチドのスクリーニングと合成したペプチドと細胞との相互作用

- 3) ナノ粒子複合化による高機能ペプチド性ナノリガンド群の創製と細胞分析：上記で創製した細胞挿入活性ペプチド群や細胞表層結合性の糖ペプチド群を、金ナノ粒子等のナノ粒子と複合化させ、種々の細胞相互作用・識別能力を有するペプチドナノリガンド群を合成した。獲得したペプチド・ナノ粒子複合体と細胞との相互作用の違いを利用して細胞識別することに成功した(図4)。



図4 細胞挿入ペプチドと金ナノ粒子との複合体の合成と細胞との相互作用

- 4) 細胞相互作用ペプチド群を利用する細胞検査バイオチップへの展開：種々の細胞相互作用・細胞識別性能を有する機能性ペプチド群を用いて、細胞フィンガープリント法により細胞検査するためのバイオチップ開発への基盤的成果を得た。
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3件)

1. H. Tsutsumi, K. Nakano, H. Mihara  
Dihydrofolate Reductase Inhibitory

Peptides Screened from a Structured Designed  $\beta$ -Loop Peptide Library Displayed on Phage

*Mol. BioSyst.*, **11**, 2713-2716 (2015)  
DOI: 10.1039/c5mb00316d

2. I. V. Chang, H. Tsutsumi, H. Mihara  
Screening for Concanavalin A Binders from a Mannose-modified  $\alpha$ -Helix Peptide Phage Library  
*Mol. BioSyst.*, **13**, 2222-2225 (2017)  
DOI: 10.1039/c7mb00495h

3. H. Tsutsumi, T. Shirai, H. Ohkusa, H. Mihara

Gold Nanoparticles Conjugated with Glycopeptides for Lectin Detection and Imaging on Cell Surface  
*Protein Peptide Lett.*, **25**, 84-89 (2018)

DOI: 10.2174/0929866525666171218124434

[学会発表] (計10件)

1. 廣原庸平, 新井佳菜子, 堤浩, 三原久和  
単糖修飾 $\beta$ ループペプチドファージライブラリの構築と糖結合タンパク質結合性ペプチドの探索  
第25回バイオ・高分子シンポジウム  
2015年
2. 堤浩, 陶欣然, 三原久和  
細胞選択的な膜透過性を有する設計 $\alpha$ ヘリックスペプチドの機能解析  
第9回バイオ関連化学シンポジウム  
2015年
3. I. V. Chang, Y. Hirohara, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara  
A mannose-conjugated  $\alpha$ -helix designed peptide phage-library as a tool for the screening of Concanavalin A binding ligands  
The 7th International Peptide Symposium, 2015年
4. 白井智子, 堤浩, 湯浅英哉, 三原久和  
単糖導入ペプチド修飾金ナノ粒子の合成とレクチンタンパク質との相互作用  
日本化学会第96春季年会, 2016年
5. 堤浩, 陶欣然, 三原久和  
細胞識別に向けた種々の両親媒性 $\alpha$ ヘリックスペプチドの細胞膜透過活性解析  
第10回バイオ関連化学シンポジウム,  
2016年
6. I. V. Chang, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara  
Screening for concanavalin A binders

- from a mannose-conjugated  $\alpha$ -helix peptide phage library  
第53回ペプチド討論会, 2016年
7. 堤浩, Chang IouVen, 廣原庸平, 三原久和  
二次構造設計糖ペプチドファージライブラリの構築とレクチン結合性糖ペプチドリガンド探索への応用  
日本化学会第97春季年会, 2017年
  8. 澁谷圭祐, 陶欣然, 堤浩, 三原久和  
両親媒性  $\alpha$  ヘリックスペプチドの細胞導入特性の解析  
日本化学会第97春季年会, 2017年
  9. Hiroshi Tsutsumi, IV. Chang, T. Anananuchatkul, Hisakazu Mihara  
Semisynthetic approach for ligand screening using chemically modified peptide phage libraries  
第54回ペプチド討論会, 2017年
  10. IV. Chang, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara  
Monosaccharide-modified  $\alpha$ -helix peptide phage libraries for carbohydrate-binding proteins  
日本化学会第98春季年会, 2018年

〔図書〕(計4件)

1. 臼井健二, 堤浩, 三原久和  
シーエムシー出版, 生体分子解析・細胞解析に向けた設計ペプチドチップ, バイオチップの基礎と応用-原理から最新の研究・開発動向まで, 2015, 143-152
2. K. Usui, K. Tomizaki, H. Mihara  
Springer, A Cell Microarray Format: A Peptide Release System Using a Photo-Cleavable Linker for Cell Toxicity and Cell Uptake Analysis  
*Peptide Microarrays-Method and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2016, 199-210
3. 堤浩, 三原久和  
技術情報協会, 化学修飾ペプチドファージライブラリの構築と標的タンパク質に対するリガンドスクリーニング, ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術, 2017, 67-73
4. 堤浩, 三原久和  
シーエムシー出版, ペプチド立体構造の設計と機能, 医療・診断をささえるペプチド科学-再生医療・DDS・診断への応用-, 2017, 73-81

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原 久和 (Hisakazu Mihara)  
東京工業大学・生命理工学院・教授  
研究者番号: 30183966

(2) 研究分担者

堤 浩 (Hiroshi Tsutsumi)  
東京工業大学・生命理工学院・准教授  
研究者番号: 70398105