

平成 30 年 6 月 25 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：15H04192

研究課題名(和文) ペプチドとナノ材料によるバイオアクティブ細胞界面の創製

研究課題名(英文) Development of bioactive cell interface using peptides and nano-materials

研究代表者

大河内 美奈 (Okochi, Mina)

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：70313301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：グラフェンなどの2次元ナノ材料は、高速かつ高感度にシグナルを取得できる次世代エレクトロニクス材料として注目されている。本研究では、2次元ナノ材料における界面形成分子としてペプチドに注目し、ナノ材料および細胞に親和性を示す二機能性ペプチドによる細胞界面の創製を目的とした。グラフェンと同様の表面構造をもつ薄層パイロリティックグラファイトを用いて解析した結果、ペプチドの自己組織化により細胞親和性の高いペプチド界面を構築できた。

研究成果の概要(英文)：Two-dimensional materials such as graphene, an individual layer of graphite with only an atom thickness, have attracted great attention due to its superior electrical properties. Along with these properties, increasing exploration on the potential applications of graphene and its derivatives are being utilized in many areas including electronic and energy storage devices, advanced materials, biomedicine, and biotechnology. In this study, self-assembling peptides have been focused as the non-covalent functionalization biointerface material, and peptides self-assembling to the surface of thin layer of pyrolytic graphite was designed and bi-functionalized by conjugating to the peptide sequences showing affinity to cell membrane.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：ペプチド 細胞界面 ナノ材料 バイオセンサ

### 1. 研究開始当初の背景

生体の有する高次機能を分子レベルで計測するため、生体を構成する基本単位である細胞に焦点をあて、単一細胞レベルでの機能解析法の開発が進められている。微細加工技術を利用した半導体デバイスや MEMS を利用したマイクロ・ナノデバイスが開発される一方、培養細胞のマイクロパターンニング技術が構築され、制御された細胞微小環境における細胞挙動や機能発現等に関する研究が進められている。しかし、デバイス材料は基本的に無機材料から構成されており、ナノ粒子、ナノワイヤ、ナノシートなど比表面積の大きいナノ構造体を活用したナノバイオデバイスの開発においては、材料の表面物性に合わせた界面形成が重要な検討項目として位置づけられている。

グラフェンなどの 2 次元ナノ材料は、高速かつ高感度にシグナルを取得できる次世代エレクトロニクス材料として注目されている。しかし、従来のマクロ電極における化学修飾法を 2 次元ナノ材料に適用すると電極特性を損なうことが多いため、高感度に細胞などからのシグナルを取得するには生体適合性の高い小分子を用いた新しい界面設計および空間配置の制御が必要であり、ナノ材料におけるバイオアクティブ界面の構築技術は開発途上の段階にある。

### 2. 研究の目的

本研究では、グラフェンなどの二次元ナノ材料における界面形成分子としてペプチドに着目し、これを利用した細胞界面の構築により、単一細胞レベルで細胞機能の計測及び制御を可能とするナノバイオデバイスの開発を目的とした。具体的には、ナノシート材料および細胞に対して親和性を発揮する複合ペプチドを設計し、ペプチド溶液を滴下するだけで、その自己集合による細胞認識界面を構築する。

### 3. 研究の方法

ペプチドは、Fmoc 固相合成法により作製し、HPLC 精製後、80% 以上の精製度で実験に用いた。グラフェンと同様の表面構造を有する薄層パイロリティックグラファイトを用い、テープによる表面剥離後すぐにペプチド溶液を滴下し、原子間力顕微鏡などを用いて自己組織化により形成されたペプチド界面を評価した。spot 合成法によりペプチドアレイを作製し、ペプチドアレイ上で直接、細胞と相互作用させることで細胞膜と親和性の高いペプチドを探索した。また、グラファイト結合配列との複合ペプチドを作製することで細胞親和性界面の構築について評価を行った。

### 4. 研究成果

グラファイト表面上に設計したグラファイト結合性ペプチドを滴下した後、原子間力

顕微鏡を用いて観察した結果、ペプチドが直径約 0.1  $\mu\text{m}$ 、高さ 1.6 nm のクラスターを形成し、グラファイト面上に自己組織化することが示された (図 1)。この画像を二次元高速フーリエ変換により解析したところ、グラファイト表面の炭素骨格に基づく 6 回回転対称の異方性を示した。これより、ペプチドがグラファイト構造を認識し、自己組織化していることが示唆された。グラファイト表面へのペプチドの被覆割合を測定した結果、結合定数は 20 nM であった。また、ペプチドを被覆した薄層グラファイト電極を用いてフェリシアン化カリウム溶液中でサイクリックボルタムメトリーを行ったところ、未修飾の時と比較して酸化還元ピークのシフトがわずかにみられたが、良好な電気化学応答がみられた (図 2)。これに対し、スキムミルクを電極に吸着後にスキャンした際にはピークが消失しており、ペプチド界面の有用性が示された。以上のことから、材料親和性ペプチドによる界面形成は、電気化学な活性を保持できることが明らかとなった。

次に、複合ペプチドによる細胞親和性について評価するため、乳酸菌を用いてペプチドアレイによる親和性ペプチド探索を行った。微生物受容体である Toll 様受容体 2 に着目し、その細胞外領域のアミノ酸配列をもとに 8 残基ペプチドライブラリーをアレイ状に合成した。このペプチドアレイを用いて、乳酸菌を直接播種することにより、乳酸菌に対して高親和性を示すペプチドを取得した (図 3)。

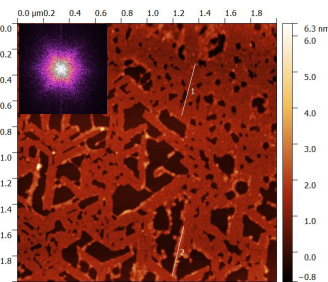


図 1 グラファイトに自己組織化したペプチド界面の原子間力顕微鏡画像 (枠内: フーリエ変換スペクトルによる異方性評価)

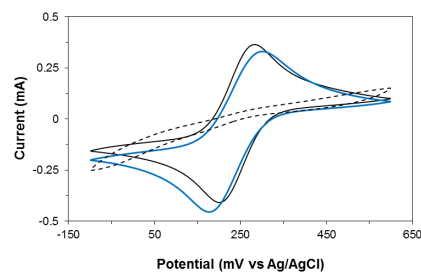


図 2 フェリシアン化カリウム溶液 (5 mM) 中のサイクリックボルタムグラム。パイロリティックグラファイト電極 (黒線) にペプチド界面形成した際 (青線) およびスキムミルクを吸着させた (黒破線) 際の応答。Scan rate 25 mV/s.

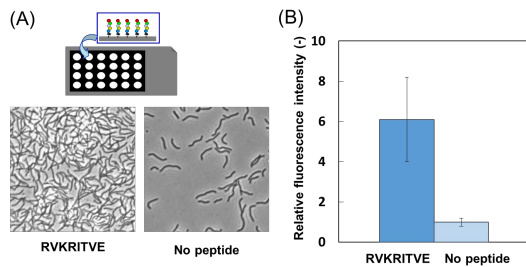


図3 ペプチド修飾ガラス面での乳酸菌の付着 . A:付着像、B:蛍光強度比

このペプチド配列とグラファイト結合性配列を連結させた二機能性ペプチドを合成し、グラファイト上での乳酸菌の固定化について検討した。グラファイトにペプチド溶液を滴下して1時間静置後、乳酸菌の懸濁液に浸漬して洗浄した結果、ペプチド界面において高密度に乳酸菌が付着している様子が観察された。これより、本ペプチドはペプチドの自己組織化により二次元ナノシート上に細胞親和性の高いペプチド界面を構築できることが示された。

次に、RGDS など細胞接着ペプチドをグラファイト結合性配列に連結したペプチドを用いて界面形成し、動物細胞 NIH-3T3 を用いた細胞付着について検討した。 $2.0 \times 10^3$  cells の細胞をペプチド界面形成後のグラファイト ( $0.16 \text{ cm}^2$ ) に播種し、4 時間インキュベート後に洗浄した。付着した細胞を蛍光色素で染色した結果、図4に示すように付着細胞数は、GRGDS 配列を連結させたペプチド界面において  $120 \text{ cells/mm}^2$  とコントロール (GGG を付加したペプチド) を用いた場合と比較して2倍以上の細胞数の付着が確認された。また、当研究グループで探索した他の細胞接着ペプチドにおいても GRGDS と同様に細胞付着数の上昇が確認された。以上のことから、細胞接着ペプチドをグラファイト結合性ペプチドに連結することで、細胞親和性界面を構築できることが示された。

電極上での細胞培養に向け、パイロリティックグラファイト面において、より安定性の高いペプチド界面の構築について検討した。

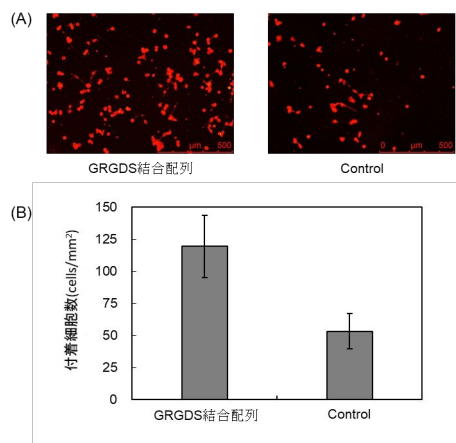


図4 ペプチド界面を形成させたグラファイトに付着した細胞画像(A)および付着細胞数(B)

シート構造形成能を有することで知られる FEFQFNFK ペプチドおよびこれに関連する置換配列を複数合成した。これらのペプチド溶液をグラファイト面剥離後すぐにスポットして1時間静置してペプチド界面を形成させた後、PBS 溶液中に浸漬した。その後、基板を引き上げて表面の液滴の有無によりペプチド界面の形成を確認した。その結果、多くの配列において液滴が消失し、ペプチド界面を保持できなかったが、一部の配列において浸漬48時間後でも液滴形成がみられた。そこで、これらの安定したペプチド界面の形成がみられた配列において、ペプチド結合面の観察を原子間力顕微鏡により行った。ペプチド濃度を変化させて形成させたペプチド界面を観察した結果、 $K_d$  は  $2.4 \mu\text{M}$  であり、高密度にパッキングされたペプチドがグラファイト面に結合することが示唆された。

次に、生体膜中のイオンチャネルなどの活性測定に向け、生体膜をグラファイト面に安定に固定化するためのペプチド界面について検討した。細胞膜を安定して基材表面に結合させるため、細胞膜と相互作用する Cell penetrating peptide および Virus fusion peptide を候補として多数のペプチド配列をセルロース膜上に spot 合成した。ペプチドアレイを用いて、NIH-3T3 細胞を直接、播種することで結合試験を行った。PBS 中で相互作用させたところ、播種した細胞数の 88% および 74% と高い結合率のみられた配列が得られた。これに対し、細胞接着ペプチドとして知られる RGDS では 7% と低い値を示し、PBS 中ではインテグリン発現が阻害されており、細胞膜との結合性が高い配列のみを選定できることが示唆された。これらのペプチドについて spot 合成したペプチドアレイ上での細胞培養について検討したところ、48 時間後の細胞数はポジティブコントロールとして用いた RGDS と同様に増殖しており、ペプチド固定化面における細胞毒性は見られないことが示唆された。そこで、これらの細胞膜結合ペプチドとグラファイト結合ペプチドを連結して合成し、細胞膜固定化能について検討した。そこで、グラファイト上にペプチドを滴下し、ペプチド界面を形成した後に細胞を播種した。培養後、浸透圧破碎を行ったところ、図5に示すようにグラファイト面に細胞膜が安定して結合し、細胞上部が破碎された細胞像が得られた。

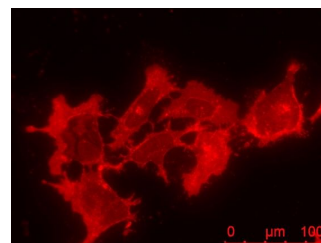


図5 ペプチド界面上で浸透圧破碎処理後の細胞画像 (細胞膜を CellMask により蛍光染色)

以上のことより、細胞膜結合性ペプチドおよび二次元材料に対し高い結合性を示すペプチドを探索し、これらを連結させた二機能性ペプチドを用いることで、ペプチド溶液を滴下するだけで自己組織的に細胞親和性界面を構築できることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Masayoshi Tanaka, Ilva Hanun Harlisa, Yuta Takahashi, Natasha Agustin Ikhsana, Mina Okochi. (2018) Screening of bacteria-binding peptides and one-pot ZnO surface modification for bacterial cell entrapment. *RSC Adv.* 8, 8795-8799. (査読有)  
DOI: 10.1039/C7RA12302G
2. Masayoshi Tanaka, Aw Wei Liang Alvin, Mina Okochi. (2018) Screening of peptide probe binding to particulate matter with a high metal content. *RSC Adv.* 8, 5953-5959. (査読有)  
DOI: 10.1039/c7ra13290e
3. Mina Okochi, Tomoya Sugita, Yuji Asai, Masayoshi Tanaka, Hiroyuki Honda. (2017) Screening of peptides associated with adhesion and aggregation of *Lactobacillus rhamnosus* GG *in vitro*. *Biochem. Eng. J.* 128, 178-185. (査読有)  
doi.org/10.1016/j.bej.2017.10.004
4. Aw Wei Liang Alvin, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi. (2017) Characterization of metal binding properties of PM2.5 binding peptides screened from phage display. *J. Biosci. Bioeng.* 123(5): 621-624. (査読有)  
http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.12.014
5. Mina Okochi, Shinji Koike, Masayoshi Tanaka, Hiroyuki Honda. (2017) Detection of *Her2*-overexpressing cancer cells using the on-chip RT-PCR employing a magnetic droplet-manipulation system. *Biosens. Bioelectron.* 93: 32-39. (査読有)  
http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.013
6. Masayoshi Tanaka, Shun Hikiba, Kiyoto Yamashita, Masaki Muto, Mina Okochi. (2017) Array-based functional peptide screening and characterization of gold nanoparticle synthesis. *Acta Biomater.* 49, 495-506. (査読有)  
http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.037
7. Mina Okochi, Tomohiro Kamiya, Takeshi Omasa, Masayoshi Tanaka, Hiroyuki Honda (2016) Rapid colorimetric antibody detection using a dual-function peptide probe for silver nanoparticle aggregation and antibody recognition. *Anal. Sci.* 32 (1): 93-97. (査読有)  
<https://doi.org/10.2116/analsci.32.93>
8. Mina Okochi, Tomoya Sugita, Masayoshi Tanaka, Hiroyuki Honda, (2015) A molecular peptide beacon for IgG detection. *RSC Adv.* 5: 91988 – 91992. (査読有)  
DOI: 10.1039/C5RA15174K

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 立松宗一郎、田中祐圭、大河内美奈 グラフェン上で $\beta$ -sheet構造を形成するペプチドを利用した電極上への細胞固定 化学工学会第 83 年会 2018 年 3 月 13-15 日 関西大学
2. 田中祐圭、大河内美奈 色調選択的に金ナノ粒子をワンポット合成できるバイオミネラリゼーションペプチドの探索 化学工学会第 83 年会 2018 年 3 月 13-15 日 関西大学
3. Masayoshi Tanaka, Mina Okochi, Peptide screening for one-pot gold nanoparticle syntheses, YABEC2017, 2017 年 10 月 18-20 日 西安市、中国
4. Mina Okochi, Kentaro Yanai, Masaki Muto, Masayoshi Tanaka, Peptide array-based rational design of TNT recognition peptide derived from anti-TNT monoclonal antibody, 10th World Congress of Chemical Engineering, 2017 年 10 月 1-5 日 Fira Barcelona (Granvia), Barcelona, Spain
5. Masayoshi Tanaka, Mina Okochi, Gold nanoparticle synthesis using multi-functional peptide screened by peptide array, 10th World Congress of Chemical Engineering, 2017 年 10 月 1-5 日 Fira Barcelona (Granvia), Barcelona, Spain
6. 田中祐圭、大河内美奈 金ナノ粒子合成制御に向けた金イオン還元性を示すペプチド触媒ライブラリーの作製 生物工学会第 69 回大会 2017 年 9 月 10-13 日 早稲田大学
7. 立松宗一郎、田中祐圭、大西 知子、早水裕平、大河内美奈 膜結合ペプチドを用いたグラファイト電極への生体膜の固定 生物工学会第 69 回大会 2017 年 9 月 10-13 日 早稲田大学
8. 大河内美奈 ペプチドマイクロアレイ解析技術によるアレルギー症状の経過予測 生物工学会第 69 回大会 2017 年 9 月 10-13 日 早稲田大学
9. 田中祐圭、大河内美奈 合成される金ナノ粒子物性を選択できるペプチド触媒のスクリーニング 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム 2017 年 9 月 7-9 日 東京大学
10. 立松宗一郎、田中祐圭、大西知子、早水裕平、大河内美奈 膜結合ペプチドを用いたグラフェン電極への生体膜の固定 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会 2017 年 5 月 22-23 日 東京工業大学



11. 立松宗一郎、田中祐圭、大西知子、早水裕平、大河内美奈 細胞の電気化学測定に向けたペプチド界面設計 化学工学会第82年会 2017年3月9-11日 芝浦工業大学
12. 田中祐圭、大河内美奈 金ナノ粒子合成に寄与する二機能性ペプチドのキャラクタリゼーション 第68回日本生物工学会 2016年9月28-30日 富山国際会議場
13. 田中祐圭、武藤正記、大河内美奈 複合機能性ペプチドを利用した金ナノ粒子合成法の開発 化学工学会第48回秋季大会 2016年9月8日 徳島大学
14. 大河内美奈 ペプチドプローブを用いたバイオセンシング 2016ペプチド夏の勉強会(招待講演) 2016年7月31-8月1日 八王子セミナーハウス
15. Mina Okochi, Shinji Koike, Masayoshi Tanaka, Hiroyuki Honda. Detection of cancer cells using on-chip gene expression analysis utilizing a magnetic beads-droplet-manipulation system. Biosensors 2016. 2016年5月25-27日、Gothenburg, Sweden
16. Ilva Hanun Harlisa, Masaki Muto, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi. Screening of bacterial lipopolysaccharide binding peptides from toll like receptor 4-derived peptide library. ImPACT International Symposium on InSECT 2016, 2016年4月26-27日、名古屋大学
17. Masayoshi Tanaka, Mina Okochi. Peptide array based screening of gold binding peptides that catalyze gold nanoparticle production. ImPACT International Symposium on InSECT 2016, 2016年4月26-27日、名古屋大学
18. 田中祐圭、山下健仁、大河内美奈 金ナノ粒子合成に寄与するペプチドのキャラクタリゼーション 化学とマイクロ・ナノシステム学会第33回研究会、2016年4月25日 東京大学生産技術研究所
19. 大河内美奈、大西知子、増島弘顕、田中祐圭、早水裕平 乳酸菌およびグラファイトに親和性を示すに機能性ペプチドの設計 電気化学会第83回大会、2016年3月29-31日、大阪大学
20. Mina Okochi, Shuhei Yamamoto, Hiroyuki Honda *In vitro* 3D co-culture patterning model for evaluation of tumor cell malignancy. PACIFICHEM2015, 2015年12月15-20日 Hawaii, USA
21. 大西知子、増島弘顕、田中祐圭、大河内美奈、早水裕平 乳酸菌と親和性を持つグラファイト結合ペプチドの評価 第67回日本生物工学会大会、2015年10月26-28日、城山観光ホテル
22. 高橋雄太、Ilva Hanun Harlisa、田中祐圭、大河内美奈 Toll-like receptor 4 (TLR4)ユ

ライペプチドライブラリーによる細菌結合ペプチドの探索 第67回日本生物工学会大会、2015年10月26-28日、城山観光ホテル

〔図書〕(計 0件)

〔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.chemeng.titech.ac.jp/~lab-okochi/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大河内 美奈 (OKOCHI, Mina)  
東京工業大学・物質理工学院・教授  
研究者番号：70313301

### (2)研究分担者

田中 祐圭 (TANAKA, Masayoshi)  
東京工業大学・物質理工学院・助教  
研究者番号：60533958

### 研究分担者

早水 裕平 (HAYAMIZU, Yuhei)  
東京工業大学・物質理工学院・准教授  
研究者番号：80443216