

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18310087

研究課題名（和文） ペプチドアレイを利用したプロテイン検出チップの構築

研究課題名（英文） Construction of Protein-detection Chips Using Peptide Arrays

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

研究成果の概要：

立体構造をデザインした種々のペプチド配列を同時合成し、デバイス配置可能な最新技術であるペプチドライブラリ手法を駆使し、種々のタンパク質を機能的特徴により解析することが可能なプロテイン検出チップ（デザインペプチドチップ）の開発を行った。デザインペプチドライブラリ構築、ドライペプチドアレイ構築、デザインペプチドアレイのデータの処理、および金基板を利用する新規ラベルフリー解析において成果をあげた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：生体高分子化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ペプチド、タンパク質、マイクロアレイ、ペプチドアレイ、プロテインチップ

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトやポストゲノムプロジェクトをはじめ、ゲノムおよびプロテオーム関連研究が急速に進展している。ゲノム・プロテオームの解析が進むにつれ、ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクス等の新領域・新技術が急速に開拓されつつある。各領域において、ゲノムのライブラリを解析するためのDNAチップ等の開発が盛んであるが、生物細胞の機能を解明するために、ゲノムの産物であるタンパク質の解析（プロテオミクス研究）を急速に発展させなければならない。プロテオーム・プロテオミ

クス研究における、「ゲノム→タンパク質一次構造→タンパク質機能」解析研究において、細胞内外のタンパク質ライブラリを如何に迅速（ハイスループット）に同定し、機能解析していくかが、バイオインフォマティクスの最大の鍵となるであろう。当該領域のブレークスルーのためには、古典的二次元電気泳動に依存しているプロテオーム解析を、飛躍的に発展させる「プロテインチップ」の開発が不可欠である。

2. 研究の目的

「プロテインチップ」の開発によって、構

造ゲノム科学等によるタンパク質立体構造解析情報等とあわせた、「機能に基づいたタンパク質ライブラリの迅速解析」が達成可能である。また、生命システムを解明するためには、発現されているタンパク質の種類や量、糖などによる修飾の違い等といった、タンパク質群の動態をハイスループットに調べる必要がある。このための最新ナノバイオテクノロジーとして注目されているのが、プロテインチップである。しかし約10万種に及ぶタンパク質を一枚の「プロテインチップ」にて解析することは不可能である。抗体チップ、酵素チップ、リガンドチップなど個々のバイオチップが得意とする特長にあわせた様々な様式のプロテイン検出用チップの開発が必要であり、多様な構造と機能を有するタンパク質を検出するプロテインチップの実用化のためには、このような目的別の種々のチップ研究が不可欠である。

本研究では、申請者が長年研究し得意とする立体構造をデザインした種々のペプチド配列を同時合成し、デバイス配置可能な最新技術であるペプチドライブラリ手法を駆使し、細胞内外の種々のタンパク質を機能的特徴により解析することが可能なプロテイン検出チップ(設計ペプチドチップ)の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

プロテイン認識・検出システム＝プロテインチップを開発するために、立体構造制御したペプチドライブラリを構築し、タンパク質の違いにより、そのペプチドライブラリへの結合パターンを解析する原理のペプチドマイクロアレイ化システムを作成する。現在までにループやヘリックス構造を基盤にしたモデル基礎的成果を挙げてきている。本研究では、以下の方法・計画により本手法を種々の興味ある対象の酵素やタンパク質を検出できるように発展させる。

- ①「プロテイン検出チップ」適合型立体構造制御ペプチドのデザイン・高効率合成
- ②「プロテイン検出チップ」適合型デザインペプチドライブラリの構築
- ③ペプチドライブラリのマイクロ・ナノアレイ化による「プロテイン検出チップ：ドライペプチドアレイ」構築
- ④「プロテイン検出チップ」データの処理
- ⑤金基板を利用する新規ラベルフリー解析

4. 研究成果

- (1)「プロテイン検出チップ」適合型立体構造制御ペプチドのデザイン・高効率合成

目標とする設計ペプチドアレイ(図1)の捕捉剤となる α ヘリックスや β ループ構造を有する蛍光基導入ペプチドライブラリを高効率に合成するために、ペプチド固相合成法を駆使して、HPLCなどの精製過程が必要のないほどの高純度に合成できる方法論をペプチド立体構造ごとに達成した。ライブラリの合成は、セパレート合成法という個々のペプチドをそれぞれ異なるバッチ中で行い、精製も個別に行う方法を用いた(図2)。固相合成用の樹脂の選択、反応剤や試薬量の適切な選択や反応温度の検討などを注意深く行った。ペプチドの設計は両親媒性の二次構造の原理を用いて行った。

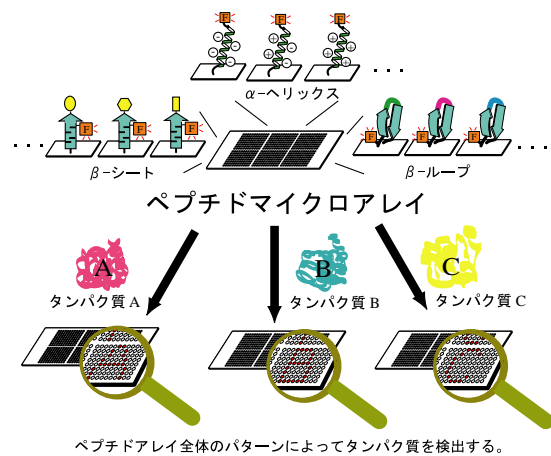


図1. ペプチドアレイを利用したプロテイン検出チップの構築



図2. セパレート固相合成法による高効率ペプチド合成の例

- (2)「プロテイン検出チップ」適合型デザインペプチドライブラリの構築と固定化ペプチドによるペプチドアレイの構築

約120種の α ヘリックス構造を有するペプチドを設計・合成した。ヘリックスペプチドの量末端には、タンパク質の結合の検出用に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法を適用するため

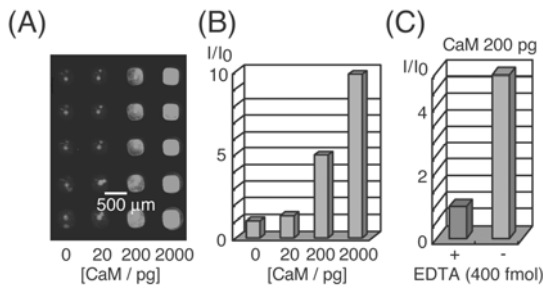


図5. ドライペプチドアレイによるCaM検出

(4) 「プロテイン検出チップ」データの処理
DNAチップを用いた取得データ解析ソフトは徐々に充実しつつあるが、プロテインチップにより得られたデータ解析に際しては非特異的相互作用などの複雑性が増すため細心の注意が必要である。フォールドアプローチは遺伝子発現解析によく用いられる方法で、刺激(処理)の有無による遺伝子発現量の変化を評価できる。主成分解析は統計学的手法で複数の変数間の相関を少数の合成変数で説明する方法であり、得られた共分散データは数学的な計算結果に過ぎず分析者による「意味合い」の解釈が必要である。クラスター解析は類似データ群のグループ分けを各グループ間の距離情報を基に行う方法である。また、自己組織化マップは階層的ニューラルネットワークの一種で、多次元データを2次元平面に射影し可視化することが可能であり、類似のデータを近傍にマッピングできるクラスタリング手法としても利用できる。以上の手法は、DNAチップやタンパク質量検出用チップのような発現量の変化を解析するためのツールとして主に用いられてきた。一方、タンパク質の機能・特性を解析するチップにおいては、チップから得られたデータからの統計処理結果を機能や特性とうまく結びつける必要があるため難しい。

α ヘリックスアレイによるタンパク質のプロテインフィンガープリント(PFP)検出において、パターンの違いを定性的に解析するのみならず、定量的な解析が必要とされる。そこで、各蛍光強度変化をユークリッド法という数学処理によりバーコードパターンの違いを数値化することに成功した。さらにこの数値化データをクラスター解析することにより、タンパク質の定量的クラスタリングに成功し、デンドログラム解析できるようにした。また、主成分分析を行うことで、タンパク質の結合特性がどのようなものであるかという指標を、電荷と疎水性度の二次元プロットを用いて表すことにも成功した。この

解析により、デザインペプチドがターゲットタンパク質を識別する際、タンパク質によっては電荷の違いにより、あるものは疎水性度の違いにより識別されていることが推定でき、ターゲットにより捕捉剤でペプチドライブラリの配列設計ができる可能性を示せた(図6)。以上より基本的な統計処理を行うことで、デザインペプチドアレイ PFP 法によるタンパク質のより定量的な特性解析が可能となった。

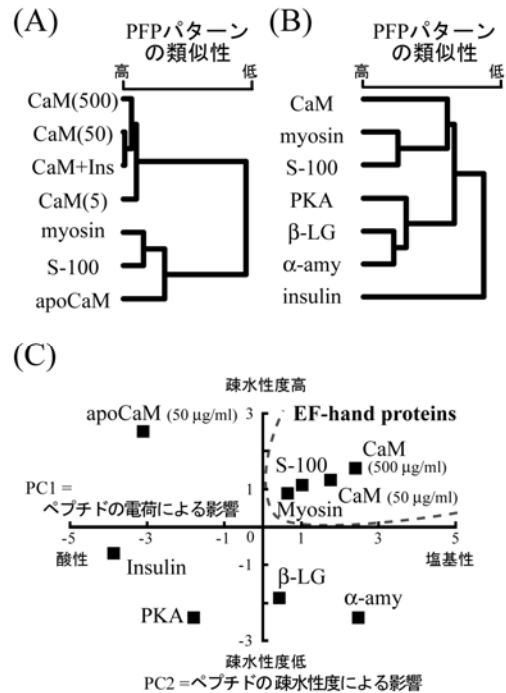


図6. ペプチドアレイのPFP結果の定量的データ処理

(5) 金基板を利用する新規ラベルフリー解析
金薄膜がもつ特異な性質(金の異常反射)を活かした新規分子間相互作用検出(Anomalous Reflection of Gold, AR)法の東工大梶川研究室との共同開発を行っており、検出装置の小型化・簡素化・迅速化へのアプローチにも取り組んでいる(図7)。AR法は標識化合物を必要としないラベルフリー測定であり、タンパク質との相互作用による金薄膜表面の膜厚の変化を青-紫色光の反射率変化として読みとる。従って、表面プラズモン共鳴(SPR)法と異なり複雑・大規模な全反射光学系を必要としない、単純かつ高感度なシグナル検出法である。すなわち、入射光強度に対する反射光強度を測定するのみで、金表面に吸着した分子膜厚を知ることができる。SPR法と比較して、AR法は装置が簡単で低コスト化、小型化、多チャンネル化が容

易である。

種々の α ヘリックスペプチドを固定化した金薄膜を作製し、AR法を用いたカルモジュリンタンパク質CaMの定量的解析に成功した。さらにループ構造ペプチドを固定化した金基板を作成し、T7ファージに提示した酵母のタンパク質ライブラリーから核酸関連のタンパク質を捕捉するシステムの構築に成功した。さらにARラベルフリー法の高感度化に関する研究においても成果を上げた。ポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマーを用いて金基板上に三次元タンパク質認識表面を構築した。この機能化表面の利用により、タンパク質のリガンドとの相互作用が容易になり、通常の自己組織化膜と比較してアビジンや抗アビジン抗体の検出において約2倍のARシグナルを得ることに成功した。

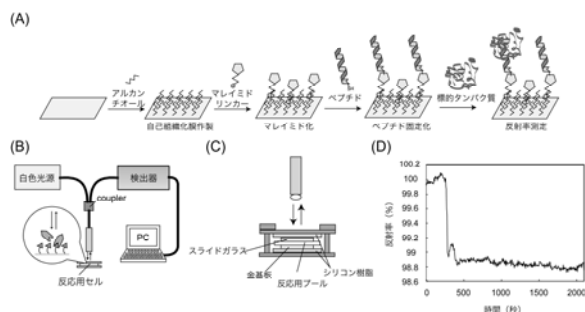


図7. 金基板AR法によるペプチド・タンパク質相互作用の新規ラベルフリー検出法

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10件)

①A. Syahir, K.-Y. Tomizaki, K. Kajikawa, H. Mihara

Poly(amidoamine)dendrimer-modified gold surfaces for anomalous reflection of gold (AR) method to detect biomolecular interactions

Langmuir, **25**, 3667-3674 (2009) 査読有

②K. Usui, K.-Y. Tomizaki, H. Mihara

Screening of α -Helical Peptide Ligands Controlling a Calcineurin-Phosphatase Activity

Bioorg. Med. Chem. Lett., **17**, 167-171 (2007)

査読有

③S. Watanabe, K.-Y. Tomizaki, T. Takahashi,

K. Usui, K. Kajikawa, H. Mihara

Interactions Between Peptides Containing

Nucleobase Amino Acids and T7 Phages

Displaying *S. cerevisiae* Proteins

Biopolymers (Peptide Science), **88**, 131-140

(2007) 査読有

④三原久和

タンパク質分析用バイオチップ

ケミカルエンジニアリング, **52**, 421-427

(2007) 査読無

⑤富崎欣也、三原久和

タンパク質検出チップ

未来材料, **7**, 28-38 (2007) 査読無

⑥富崎欣也、臼井健二、三原久和

ペプチドライブラリーを用いるタンパク質相互作用検出チップ

電気化学および工業物理化学, **75**, 981-986

(2007) 査読無

⑦K.-Y. Tomizaki, H. Mihara

Rational design of homogenous protein kinase assay platforms that allow both fluorometric and colorimetric signal readouts

Mol. BioSyst., **2**, 580-589 (2006) 査読有

⑧K. Usui, K.-Y. Tomizaki, H. Mihara

Protein-fingerprint data mining of a designed α -helical peptide array

Mol. BioSyst., **2**, 417-420 (2006) 査読有

⑨S. Sano, K.-Y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara

A PNA-DNA hybridization chip approach for the detection of β -secretase activity

Bioorg. Med. Chem. Lett., **16**, 503-506 (2006)

査読有

⑩K. Usui, K.-Y. Tomizaki, T. Ohshima, K. Nokihara, H. Mihara

A Novel Peptide Microarray for Protein Detection and Analysis Utilizing a Dry Peptide Array System

Mol. BioSyst., **2**, 113-121 (2006) 査読有

[学会発表] (計28件)

① H. Mihara, Designed peptide chips for protein analyses, Korean Biochip Conference, Daejeon, Korea, 2008/6/6

② 三原久和, 「設計ペプチドを利用したタンパク質分析チップ」, 第4回コンビナトリアル・バイオエンジニアリング会議, 2007/11/9, 大阪

③ H. Mihara, Designed Peptide Microarray for a Protein-Chip Technology, Systemic Innovation for Microbial Biotechnology, 2006/6/19, Busan, Korea

他25回

[図書] (計7件)

①K.-Y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara

Proteins: Array-Based Techniques

Wiley Encyclopedia of Chemical Biology, (Ed. Begley, T. P.), 144-158, John Wiley & Sons, Inc. (2009)

②K. Usui, K.-Y. Tomizaki, H. Mihara A

Designed Peptide Chip: Protein Fingerprinting

Technology with a Dry Peptide Array and Statistical Data Mining, Peptide Microarrays, Methods in Molecular Biology, Humana Press, in press (2009)

③ 岡畑恵雄、三原久和、バイオ研究のフロンティア 2、酵素・タンパク質をはかる・とらえる・利用する、188pages、工学図書 (2009)

④ 三原久和、高橋剛、富崎欣也
とことんやさしい タンパク質の本、
プロテインチップでタンパク質を検出、
122-123、日本工業新聞社、2007

⑤ 三原久和、小島英理、馬場嘉信
ナノバイオ計測の実際、224pages
講談社、2007

⑥ 富崎欣也、三原久和
プロテインチップの開発
新しい DNA チップの科学と応用、関根光雄編、
講談社サイエンティフィック、171-183
(2007)

⑦ 富崎欣也、三原久和
ペプチドチップ
マイクロアレイ・バイオチップの最新技術、
シーエムシー、240-252 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

① センサ基板及びバイオセンサ
発明者：梶川浩太郎、三原久和、アミルシャ
ヒルビンハムザー

権利者：東京工業大学

特願 2007-223950

出願日：2007 年 8 月 30 日

特開 2009-58263 公開日：2009 年 3 月 19 日
国内

② バイオセンシング用基板

発明者 梶川浩太郎、三原久和、アミルシャ
ヒルビンハムザー

権利者：東京工業大学

特願 2008-259655

出願日：2008 年 10 月 6 日

国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

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

富崎 欣也 (TOMIZAKI KINYA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
助手

研究者番号：90397026

(3) 連携研究者

なし