

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18350116

研究課題名 (和文) ペプチドライブラリーを用いたアレルゲン物質解明に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) A fundamental study for the allergen material elucidation by means of a peptide library

研究代表者

木下 隆利 (KINOSHITA TAKATOSHI)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60135407

研究成果の概要：

深刻な健康被害をもたらすアレルギー疾患を未然に予防する手段を提案するため、迅速簡便にアレルゲン物質をセンシングするシステムの開発研究を行った。本研究は光の干渉に基づく構造色を発現する薄膜を用い、アレルゲン物質が薄膜へ収着した際の膜厚変化を直接的に色変化として認識するものである。抗原-抗体の組み合わせを利用し、低分子の特異的な結合を視覚的に認識することに成功した。また、これらの収着挙動をより詳細に評価可能な装置の開発にも成功し、アレルゲンセンシングシステム開発の足がかりとなる多くの知見を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学、高分子・繊維材料

キーワード：アレルギー、アレルゲンセンサー、アビジン、ビオチン、薄膜干渉、可視化センシング、検出感度

1. 研究開始当初の背景

アレルゲンとはアレルギー疾患を持つ人間の抗体と特異的に反応する抗原のことである。近年、アレルギー疾患の患者数は年々増加しており、乳幼児から成人に至るまで、アレルギー物質を含む食品に起因する健康被害が多く見られるようになった。現在、日本の総人口の約30%は何らかのアレルギー疾患を持っているといわれている。そば粉や小麦など5品目の表示が義務づけられるなど、アレルギーに対する意識は高まっており、

「安心・安全で質の高い生活のできる国の実現」に向けて、食品中のアレルゲン物質の迅速簡便なセンシングシステムの研究開発は急務であり、わが国においても特に推進すべき課題である。アレルギー物質はゲル電気泳動や電気透析により単離されたアレルゲン物質を調べることにより、そのアミノ酸配列が明らかにされつつあるが、同一のアレルゲン物質と思われていたものでも、アミノ酸組成や配列が多少異なっていることが判明された。すなわち、単一物質ではなくアレルギー

一を誘導する物質群として捉える必要がある。このようなアレルギー物質の多様性に関する詳細は現在でも未解決なため、食品表示義務の世界的動向と相まって、アレルギー物質群に関する指標の制定が急務とされている。

2. 研究の目的

食の安全・安心を目的として、アレルギー原因物質探索に有効なペプチドライブラリーのデザイン・創製を基とする新しいバイオセンサー技術を開発する。本研究が提案する方法は、ペプチド構造色基板を軸として、アレルゲン物質の実態解明に新たな基礎を提供する。

(1) ペプチドライブラリーの構築

標的アレルゲンとペプチド間の親和性の差異に着目し、種々アレルゲン物質に対応するペプチドシーケンスを探索し、ライブラリーの構築を行うことで系統的なセンシングシステムの開発を目指す。

(2) センシングシステムの装置化

アレルゲン物質の吸着に由来する構造色変化を定量的に評価可能な装置開発を行い、アレルゲン物質の同定が可能なシステムの確立を目指す。

3. 研究の方法

<ペプチドライブラリーの構築>

ペプチドライブラリーは標的となるアレルゲン物質群に対し親和性の異なる基板環境を提供し、アレルゲンが差別化された形で抗体に結合する場を提供する。この機能発現のためには、極性アミノ酸と非極性アミノ酸の配列周期を系統的に変化させたペプチド群を調製する必要がある。本目的に合致するデザインは極性、非極性アミノ酸を交互に配置することが基となり、極性アミノ酸である正電荷、および負電荷を有するものの配置に変化を与えることで種々のアレルゲン物質に対して差別化されたペプチド群が調製される。

<構造色基板の調製とセンシング>

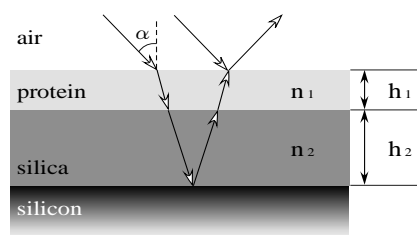
食物アレルゲンを抗原として捕捉する構造色基板の調製、得られた基板の色変化によるアレルゲンの同定、および定量を行う。

シリカ表面の化学修飾によりタンパク質層を積層し構造色基板を得る手法、およびスピコート法によって均一なペプチド薄膜を調製する手法を検討した。基板調製したペプチドの水溶液は pH を適切に調製することによって 3 次元的な秩序構造を形成し、得られた薄膜は数百 nm の厚みで調製可能であり、シリコンや金属基板上に作製すると可視光の干渉が生じ、構造色基板が調製される。

4. 研究成果

(1) 干渉性発色を利用した抗原-抗体反応のセンシング

本研究では、薄膜干渉の仕組みに着目し、同仕組みの免疫測定分野への応用の可能性を探った。薄膜干渉は、色素や蛍光に由来するものではなく、構造に由来した光の干渉効果によって発色を示す仕組みである。そのために酵素標識体や蛍光標識体との反応作業を必要とせず、標的分子検出に至るまでの反応段階の縮小化が可能である。タンパク質のほとんどは数十Åのサイズであり、本論で検討している薄膜干渉の膜厚と同様のスケールと判断される。したがって、光干渉性薄膜表面にタンパク質が吸着することで膜厚の増加がおり、これが光の干渉に反映され色変化を発現する。つまり、吸着したタンパク質サイズと量に依存した色変化が生じる。本研究ではまずアレルゲン検出系のモデルシステムとして、アビジン-ビオチン結合に着目し、薄膜干渉を応用したタンパク質検出法について検討した。アビジンは、卵白中に存在する分子量約 68kDa の塩基性糖タンパク質であり、サブユニット 4 個からなる。各サブユニットは 1 分子のビオチンとの非常に高い親和性（結合定数 = $1.0 \times 10^{15} \text{M}^{-1}$ ）によって結合することが知られている。そこでシリコンの熱酸化によって光干渉性のシリカ薄膜を調製し、その表面にビオチンを修飾した。ビオチン部位への選択的なアビジンの吸着を、薄膜の干渉色変化から評価・確認した。その結果、 $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ の感度で迅速かつ簡便にアビジンを検出可能であることを見出し、アレルゲン検出システムの基盤を築くことに大きな成果を得た。



$$\lambda = \frac{4h_1}{m} \sqrt{n_1^2 - \sin^2 \alpha} + \frac{4h_2}{m} \sqrt{n_2^2 - \sin^2 \alpha} \quad (1)$$

[maximum wavelength] $m=2k$

[minimum wavelength] $m=2k-1$ ($k=1, 2, 3, 4 \dots$)

図 1. 干渉性薄膜の模式図

次いで、アビジン-デチオビオチン結合によって組織化された高分子薄膜を調製し、ビオチンの進入による膜の分解と干渉色変化について検討した。デチオビオチンはビオチン誘導体であり、アビジンとの親和性はビオチンほど高いものではないため、ビオチンの

検出において仲介的な作用を示すことが期待される。シリカ薄膜表面に修飾されたデチオビオチンとの結合によって形成されたアビジン単分子膜が、ビオチンを認識して剥離することが酵素発色反応試験から確認された。これはビオチンの進入によってデチオビオチン-アビジン結合が解離し、ビオチン-アビジン結合に置き換わったためである。アビジン単分子膜表面にポリスチレン (PS) 粒子を固定化した試料においては、アビジン膜の分解とともに PS 粒子膜が剥離することが確認された。デチオビオチン-アビジン結合の解離が大幅な干渉色変化として出力された例となった。また、デチオビオチンが標識されたウシ血清アルブミン (BSA) とアビジンとの交互多層膜の調製にも成功した。デチオビオチン-アビジン結合のみで組織化された同膜は、ビオチンを認識するとともに分解し、大幅な干渉色変化を示した。デチオビオチン-アビジン結合とビオチン-アビジン結合との置換時間が膜の分解速度を律速しているために、膜厚に分解速度が依存しないことが明らかとなった。

以上の結果より、モデル系を用いて「アレルギー物質→薄膜構造の変化→色変化によるアレルギー物質の解明」の図式が成立することを確認し、ナノ薄膜の構造変化を色変化として可視的に変換する新規なセンサーと

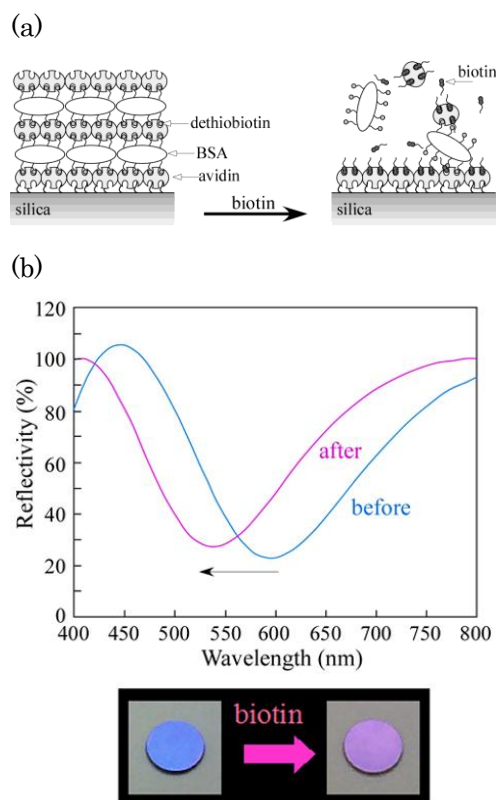


図 2. ビオチンセンシングの可視化、(a) 模式図、(b) 反射スペクトル変化と構造食器板の色変化の様子

しての有用性が示唆された。この図式を利用した多岐に亘る生体分子や微生物などのセンシングへの応用・展開が期待される。

(2) ペプチドライブラリーの構築と構造色変化によるアルブミンのセンシング

正負電荷を有する親水性アミノ酸、および疎水性アミノ酸を組み込んだペプチドを水に可溶化し適切な pH に調整すると β -シートによる繊維化を示し、静電的相互作用によって繊維間に架橋が生じるためヒドロゲルが調製できる。ゲル化に必要なペプチドシーケンスや溶液条件の探索を行い、ペプチドライブラリーを構築した。アミノ酸側鎖の電荷はタンパク質や抗原・抗体など表面に電荷を有する分子の固定化場を提供する。本研究では種々のシーケンスで調製したペプチドライブラリーを構築し、形成されるヒドロゲル中への BSA の固定化挙動を検討した。各ヒドロゲル中への BSA の固定化量は、親水性残基の電荷バランスにより増減し、ヒドロゲル中でアニオン性を示す BSA は正電荷が優位なペプチドに多く固定化されることがわかった。さらに、正電荷が同じ数であっても配列の様式によっても固定化量に差異が生じ、 β -シートの親水面の正電荷帯がどのように分布しているかによって固定化量が増減することが示された。つまり、BSA は電荷数と同時にペプチドの電荷パターンを認識する可能性を示しており、標的物質の固定化やセンシングのためのペプチド設計における知見が多く得られた。

Peptide sequence	peptide name	charge (pH=7)	texture of nanofiber	$\Delta \lambda \times 10^6$ (nm/g)
	9SA	+2		0.37
	6SA	-2		0.38
	5SA	-1		0.48
	11SA	+1		0.65
	2RA	+2		0.70
	3SA	+3		2.4
	4SA	+4		2.9

図 3. ペプチドライブラリーを用いたペプチド薄膜への BSA 吸着挙動

(3) センシング装置の開発

「アレルゲン物質→薄膜構造の変化→色変化によるアレルゲン物質の検出」に関して、低分子が薄膜へ収着する挙動をモニター可能な装置の開発を行った。本装置は、分子収着に伴う膨潤・収縮による構造色変化と水晶発振子マイクロバランス(QCM)法を用いた重量変化を同時に測定可能であるため、薄膜中への低分子の収着に伴うミクロな変化量を検知することが可能である。

以上より生体分子や微生物を検出するためのペプチド構造の設計指針を提示し、これらを検出する測定システムの開発に成功した。

同時・同条件測定

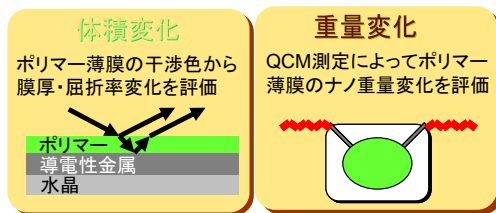


図 4. 低分子収着モニター装置の外観

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 21 件)

1. Controlled Self-Assembly of Amphiphilic Oligopeptides into Shape-Specific Nanoarchitectures, Tomoyuki Koga, Masahiro Higuchi, Takatoshi Kinoshita and Nobuyuki Higashi, Chemistry A European Journal, 12(5), 1360-1367 (2006). 査読有

2. Preparation and Optical Characterization of Particle Multilayer with Coherent Structure, A. Kato, K. Hase, M. Tanaka, T. Kinoshita, Advanced Material Research, 11-12, 627-630 (2006). 査読有

3. Inorganic-Organic Thin-Layers Which Transform Bio-Molecule Binding into Visible Color Change, R. Tominaga, M. Sivalumar, M. Tanaka, and T. Kinoshita, Advanced Material Research, 11-12, 631-634 (2006). 査読有

4. Nano-architecture of Peptide-Poly(ethylene glycol) Diblock Copolymer at Air/Water Interface, M. Hattori, M. Tanaka, and T. Kinoshita, Kobunshi ronbunshu 62(4), 132-134 (2007). 査読有

5. Construction of an arranged nano-fibrous structure by self-organization of a designed amphiphilic peptide based on β -strand, M. Hattori, S. Hayashi, H. Yokoi, M. Tanaka, and T. Kinoshita, E-polymers, 26, 1-9 (2007). 査読有

6. The Construction of the Two-dimensional Array of the Fibrous Objects from the Mixture of RFDF16-PEG and RFDF16 at Air/Water Interface, M. Tanaka, M. Hattori, and T. Kinoshita, Chem. Lett., 36(4), 562-563 (2007). 査読有

7. Visible Detection of Biotin by Thin-film Interference: Thickness Control through Exchanging Reaction of Biotin/Dethiobiotin-Avidin Bonding, R. Tominaga, M. Sivakumar, M. Tanaka, and T. Kinoshita J. Mater. Chem. 18, 976-980 (2008). 査読有

8. Self-Assembled pH-Responsive Hydrogels Composed of the RATEA16 Peptide, Y. Zhao, H. Yokoi, M. Tanaka, T. Kinoshita, and T. Tan, Biomacromolecules, 9, 1511-1518 (2008). 査読有

9. Controlled Release and Interaction of Protein Using Self-Assembling Peptide RATEA16 Nanofiber Hydrogels, Y. Zhao, T. Tan, H. Yokoi, M. Tanaka, and T. Kinoshita, J. Polym. Sci. Part A: Polym Chem., 46, 4927-4933 (2008). 査読有

10. Two-dimensional Self-assembly of A Designed Amphiphilic Peptide at Air/Water Interface, M. Tanaka, K. Ogura, S. Abiko, N. Koshikawa and T. Kinoshita, Polymer. J, 40, 1911-1914 (2008). 査読有

[学会発表] (計 32 件)

1. VISIBLE IDENTIFY OF PROTEIN ASSEMBLING AND DISASSEMBLING, Ryojiro Tominaga, Muthusamy Sivakumar, Masayoshi Tanaka, and Takatoshi Kinoshita International Workshop of Advanced Ceramics (2006年10月, 愛知県)

2. 干渉色を利用した高分子薄膜系の低分子収着・拡散の可視化, 岩瀬史一・松浦好信・

富永亮二郎・田中正剛・木下隆利, 第 17 回日本 MRS 学術シンポジウム (2006 年 12 月、東京都)

3. 薄膜干渉と QCM を利用した高分子-低分子間の親和性評価, 松下翔太・松浦好信・富永亮二郎・田中正剛・木下隆利・仲井和之・義元得治, 第 56 回高分子学会年次大会 (2007 年 5 月、京都府)

4. 薄膜干渉と QCM を利用した高分子-低分子系の収着挙動の解析, 松下翔太・田中正剛・木下隆利・仲井和之・義元得治, 第 56 回高分子討論会 (2007 年 9 月、愛知県)

5. 両親媒性ペプチドを用いた薄膜干渉基板の調製と生体親和性評価, ムッサミー シバクマール・田中正剛・木下隆利・杉山峰雄・山口研志, 第 56 回高分子討論会 (2007 年 9 月、愛知県)

6. 構造色を呈するポリペプチド薄膜の調製, 朝岡紀匠・田中正剛・木下隆利, 第 18 回日本 MRS 学術シンポジウム (2007 年 12 月、東京都)

7. 光干渉性発色を用いた抗原-抗体反応のセンシング, 齊藤 愛・富永亮二郎・田中正剛・木下隆利, 第 18 回日本 MRS 学術シンポジウム (2007 年 12 月、東京都)

8. 薄膜干渉と QCM を利用した高分子-低分子系の収着挙動の解析, 松下翔太・田中正剛・木下隆利・仲井和之・義元得治, 第 57 回高分子学会年次大会 (2008 年 5 月、神奈川県)

9. 相補的水素結合を利用した β -シートペプチド自己組織化膜上への金ナノ粒子の固定化, 野々山 貴行・田中正剛・木下隆利, 第 57 回高分子学会年次大会 (2008 年 9 月、大阪府)

10. In Vitro Controlled Release for Drug Delivery: Interaction of D- or L-Amino Acids with Nanofibers in Self-Assembling Peptide RATEA16 Hydrogels, Ying Zhao, Hidenori Yokoi, Masayoshi Tanaka, Takatoshi Kinoshita, The IUMRS International Conference in Asia 2008 (2008 年 12 月、愛知県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

1. 名称: 水晶振動子、並びに、それを用いた質量・体積測定装置及び質量・体積測定方法
発明者: 木下隆利、松下翔太
権利者: 同上
種類: 特願
番号: 2007-248258
出願年月日: 2007 年 9 月 25 日
国内外の別: 国内

2. 名称: ペプチドナノファイバーが表面に配列された基板の製造方法

発明者: 江龍修、木下隆利、河田研治、堀田和利

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2008-35844

出願年月日: 2008 年 2 月 18 日

国内外の別: 国内

3. 名称: ナノ構造を有する基板の製造方法

発明者: 江龍修、木下隆利、河田研治、堀田和利

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2008-35845

出願年月日: 2008 年 2 月 18 日

国内外の別: 国内

4. 名称: 二次元微細薄膜の作製方法

発明者: 田中正剛、安孫子宗平、江龍修、木下隆利、越川尚清

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2008-160822

出願年月日: 2008 年 6 月 19 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 隆利 (KINOSHITA TAKATOSHI)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 60135407

(2) 研究分担者

田中 正剛 (TANAKA MASAYOSHI)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 90397498