

機関番号：57103  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009 ～ 2010  
 課題番号：21710121  
 研究課題名（和文） 細胞内リン酸化シグナル網羅的解析のための  
 ペプチド固定化酸化チタンチップの開発  
 研究課題名（英文） Development of peptide-immobilized TiO<sub>2</sub> chip  
 for monitoring of intracellular protein phosphorylation signals.  
 研究代表者  
 園田 達彦 (SONODA TATSUHIKO)  
 北九州工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授  
 研究者番号：30403992

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、光触媒や太陽電池として利用されている酸化チタンのセルフクリーニング機能に着目し、これを基板として用いることで、基板そのものが非特異的吸着物除去能を有するペプチドアレイを開発し、プロテインキナーゼ活性の網羅的解析技術確立に向けての有効性を示すことを目的とする。具体的には夾雑物除去能の高い酸化チタン基板の作製方法、基質ペプチド固定化方法などを検討した。

まず酸化チタン薄膜を塗布した基板へのペプチド固定化方法の検討を行った。ここでは、ポリアクリル酸による基質ペプチドの固定化を試みた。これは酸化チタンがカルボキシ基とエステル結合を形成することを利用した方法である。蛍光標識したポリアクリル酸溶液を酸化チタン基板あるいはガラス基板にスポットし、超音波洗浄を数回繰り返したのちアレイスキャナーにて観察したところ、酸化チタン基板においてのみ強い蛍光が観察され固定化されていることが確認できた。次に、タンパク質の非特異的吸着抑制効果について検討した。ここでは蛍光標識したタンパク質を基板に吸着し、水洗浄操作の前後でアレイスキャナーにより吸着量を測定した。ガラスと酸化チタン基板で比較したところ、酸化チタン基板では吸着したタンパク質の大部分を水洗浄のみで除去できることが示され、酸化チタン基板の利点を示すことができた。

## 研究成果の概要（英文）：

A peptide array using a titanium oxide plate for detection of protein kinase activity has been investigated. First, the titanium oxide plate was prepared by sol-gel method. The plate has relatively flat surface and high hydrophilicity rate of photo-induced surface wettability conversion by UV irradiation. Furthermore, we succeeded that the surface wettability was controlled reversibly using hypobaric drying and UV irradiation. Next, complex with poly(acrylic)acid and protein kinase A (PKA) substrate peptide (PAA/PEP) was synthesized. We confirmed that PAA/PEP was phosphorylated by PKA, by coupled enzyme assay. Finally, fluorescenced poly(acrylic)acid (F-PAA) was immobilized on the titanium oxide plate, and the plate was sonicated in water. After washing, F-PAA still remained on the plate. It suggested that a bonding is formed between F-PAA and titanium oxide plate. From above results, we would establish the basis technique to develop the peptide array using the titanium oxide plate.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

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：バイオチップ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノム解析の終了に伴い膨大な数の遺伝子が明らかとなった現在、これら遺伝子の機能を解明し創薬に応用するゲノム創薬研究が世界的に行われている。なかでも遺伝子の機能を担う存在であるタンパク質を網羅的解析するプロテオーム研究は創薬研究において重要な役割を担っている。

(2) プロテオーム研究では、二次元ゲル電気泳動法あるいは高速液体クロマトグラフィーと質量分析の組み合わせが一般的に利用されている。これらの手法により数多くのタンパク質の発現状況を一度に観察できるようになり、疾病に関連すると予想されるタンパク質の同定が比較的簡単に行えるようになった。

(3) 一方、ある遺伝子から発現したタンパク質の機能を網羅的に解析するための技術開発は画期的には進んでいない。従来からある yeast-two-hybrid system やそれに類する手法に限られている。近年、ゲノム解析で威力を発揮した DNA アレイに倣ってタンパク質アレイやペプチドアレイの開発が進められ、high-throughput にタンパク質間相互作用を解析できる技術として注目を集めているが、課題も多く実用化には至っていない。タンパク質の機能が分からない間は創薬に結びつけることが出来ないため、この点がゲノム創薬の大きなネックとなっていた。

### 2. 研究の目的

(1) ゲノム創薬における遺伝子機能解明や新薬探索を行うための評価指標として様々な細胞機能を制御しているタンパク質リン酸化シグナルに着目し、このシグナルの担い手であるプロテインキナーゼ群の酵素活性を網羅的にアッセイできるペプチドアレイの開発を進めてきた。本システムの大きな特徴は、ある環境における細胞内リン酸化シグナルの状態を、ペプチドアレイのリン酸化パターンによって捉えることが可能な点にある。これにより、機能未知遺伝子に関係する複雑なタンパク質間相互作用を明らかにすることなく、創薬の第一段階である薬物候補の探索が可能となる。

(2) 一方、夾雑物の基板への非特異的吸着による擬陽性・擬陰性の発生が、プロテインキナーゼの酵素活性を定量的に評価する上でしばしば問題となっている。これはリン酸

化反応に限らずアレイを用いた検出系共通の課題であり、ペプチドアレイの実用化に向けて早急な解決が望まれる。しかしながら従来から行われている対策としては基板の洗浄行程の見直し、ブロッキング剤の使用といった手法に限られており、その有効性はターゲットとするタンパク質（酵素）の種類や固定化するペプチドの物理的、化学的性質によって変化するものであった。

(3) そこで本研究では、この課題を解決するための全く新しい手法として、アレイとして使用する基板そのものに機能を付与することを考えた。そのための材料として着目したのが光触媒や太陽電池の分野で広く利用されている酸化チタンである。酸化チタンは外壁などに塗布することでセルフクリーニング機能（光により吸着した有機物を分解、除去する機能）を発揮することが知られている。この機能には酸化チタン表面で起こる光酸化と光誘起超親水化（光照射により酸化チタン表面の水の接触角が  $10^\circ$  以下になる現象）の2つの現象が関係していると考えられている。そこで、酸化チタン薄膜を塗布したペプチド固定化基板を作製し、プロテインキナーゼ活性の網羅的解析技術確立に向けての有効性を検討することを目的とした。上記の性質から酸化チタン基板は夾雑物除去に極めて優れた性能を発揮することが期待できた。

### 3. 研究の方法

(1) 酸化チタン薄膜を塗布した基板の作製とペプチド固定化方法の検討

スピニング法を用いてガラス上に酸化チタンの薄膜を形成する。X線結晶構造解析や各種顕微鏡観察、X線光電子分光分析を行い、結晶構造、表面荒さといった物性値を測定した。

ペプチドはシランカップリング剤を用いて薄膜表面に導入した官能基を利用するか、酸化チタン微粒子に結合するペプチドアプター配列を利用して直接薄膜上に固定化する。これらの手法に関しては既に報告例があるので、これを利用した。

(2) 酸化チタン薄膜へのタンパク質吸着と光照射による除去効果の検討

作製した基板を細胞破砕液で処理することで夾雑物の非特異的吸着を起し、拡散反射型紫外・可視吸光度計、あるいは蛍光アレイスキャナーにより確認する。その後、最

適化した条件で一定時間紫外光を照射したのち同様の測定を行い、非特異的吸着物質の除去効果を評価する。対照としてガラス基板を用いても同様の実験を行う。得られた結果から酸化チタン薄膜の有用性を示す。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酸化チタン基板の作製及び物性評価

酸化チタン基板の作製にはゾルゲル法を用いた。スライドガラスに 0.5 M チタンテトライソプロポキシドと超純水を混合して調製したゾルゲル溶液をスピンコート法にて塗布後、空气中、723 K にて 30 分間焼成し、酸化チタン基板を得た。

次に、酸化チタン基板の表面状態を原子間力顕微鏡にて観察したところ、平均面粗さ 0.57 nm という平滑な表面を有することを確認した。

続いて、初期接触角が約 40° の酸化チタン基板に紫外線（波長：365 nm、出力：743・Wcm<sup>2</sup>）を照射し、基板表面での水の接触角を測定することで、紫外線照射前後における基板表面の親水性を比較した。その結果、紫外線照射 1 時間で基板表面での水の接触角が超親水化の目安である 10° 以下を示した。さらに、超親水化状態の酸化チタン基板を 313 K、10 kPa 以下の条件で、2 時間減圧乾燥したところ、基板表面の接触角は約 23° となった。以上のことから、作製した酸化チタン基板での光誘起超親水化現象の発現を確認したと共に、紫外線照射と減圧乾燥を組み合わせることで、酸化チタン基板表面の濡れ性を制御できることが示された。

##### (2) 基質ペプチドの酸化チタン基板への固定化

当初考えていたペプチドアダプターを使用する方法は結合定数があまり大きくないためか、ペプチドを固定化するには至らなかった。そこで、酸化チタンがカルボキシ基とエステル結合を形成する性質を利用して、カルボキシ基を持つ高分子であるポリアクリル酸（PAA）と基質ペプチドとの複合体（PAA/PEP）を用いれば、基質ペプチドを酸化チタン基板へ固定化できるのではないかと考えた。そこで、PAA/PEP を合成し、基質としての評価を行うとともに、蛍光標識ポリアクリル酸（F-PAA）を用いて酸化チタン基板への結合能を評価した。

まず Coupled Enzyme Assay を用いて、PAA/PEP が PKA の基質となり得るかを調べた。Fig. 1 にその結果を示す。基質を添加しなかった場合、吸光度の減少は観測されなかった。これに対して、基質ペプチド溶液及び PAA/PEP 溶液においては、吸光度の減少が観測された。これより PAA/PEP のリン酸化、すなわち PAA/PEP が PKA の基質となり得ること

が示された。

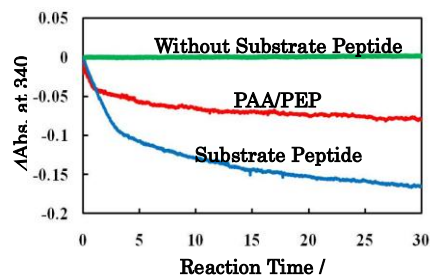


Fig. 1 各溶液の PKA 添加後の吸光度変化。

続いて、蛍光標識ポリアクリル酸（F-PAA）を用いて酸化チタン基板への結合能を評価した。F-PAA 水溶液 0.1 μL を酸化チタン基板にスポットした後、湿潤雰囲気中で 1 時間静置することによって F-PAA の固定化を行った。次に、基板を水中にて 5 分間超音波洗浄した。そして、洗浄前後において蛍光顕微鏡観察を行い、F-PAA の残存量を比較した。また、ガラス基板においても同様の操作を行った。その結果、ガラス基板では蛍光はほとんど観測されなかったのに対して、酸化チタン基板では洗浄前後で蛍光強度はほとんど変化しなかった。このことから、F-PAA は酸化チタン基板に固定化されることが示された。

##### (3) 酸化チタン基板の非特異的吸着物除去効果

ここでは非特異的吸着物のモデルとして蛍光標識ストレプトアビジンを用いた。これはリン酸化検出試薬として使われているタンパク質である。このタンパク質を含む溶液を所定の濃度で酸化チタン基板、ガラス基板にスポットし、1 時間静置した。この間、酸化チタン基板の一部には 365 nm の UV 光を照射した。その後、超純水を用いて 5 分間超音波洗浄を行い、洗浄前後で蛍光強度を比較した。その結果、ガラスではほとんど蛍光強度に変化が見られなかったが、酸化チタン基板に UV を照射した場合はほとんど蛍光が観測されなかった。これは基板表面が超親水化した結果、水が基板とタンパク質の間に入り込んでタンパク質をはがしてしまうためであると考えられる。以上の結果より、酸化チタンを基板に用いることで、非特異的吸着物の除去を容易に行える可能性が示された。今後は細胞破碎液のような実際に使用するものを用いて検討を進めていく予定である。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 6 件）

① 園田達彦 他、細胞内リン酸化シグナル網羅

的解析を指向したペプチド固定化酸化チタン基板の開発、第 46 回化学関連支部合同九州大会（2009 年 7 月）

- ② 園田達彦 他、酸化チタンをベースとした細胞内リン酸化シグナル網羅的解析のためのペプチドアレイの開発、日本化学会西日本大会 2009（2009 年 11 月）
- ③ 園田達彦 他、キナーゼ基質ペプチド固定化酸化チタン基板の調製とペプチドアレイへの応用、第 12 回化学工学会学生発表会（2010 年 3 月）
- ④ 園田達彦 他、酸化チタンを用いたプロテインキナーゼ基質アレイの開発、第 47 回化学関連支部合同九州大会（2010 年 7 月）
- ⑤ 園田達彦 他、キナーゼ活性検出のためのペプチド固定化酸化チタン基板の創製、日本化学会西日本大会 2010（2010 年 11 月）
- ⑥ 園田達彦、細胞内リン酸化シグナル網羅的解析を指向したペプチド固定化酸化チタン基板の開発、高分子九州支部フォーラム（2011 年 3 月）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園田 達彦 (SONODA TATSUHIKO)

北九州工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授

研究者番号：30403992

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：