

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：57103

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710137

研究課題名(和文)リン酸化シグナル高感度検出が可能な質量分析型ペプチドチップの開発

研究課題名(英文)Development of peptide array for high sensitive detection of phosphorylation signal using MALDI-MS

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、基板そのものが非特異的吸着物除去能を有し、かつ高感度な質量分析による検出が可能なペプチド固定化酸化チタン基板を開発し、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。得られた成果について簡潔にまとめると、非特異的吸着物除去能を有する酸化チタン基板が調製でき、その上に光切断部位を有する基質ペプチドを固定化することで目的とする基板を作製することができた。この基板を使って質量分析を行ったところ、プレリミナリーな結果ではあるが、目的のイオンピークを確認することができ、本実験の有効性を示せた。

研究成果の概要(英文)：A peptide array using a titanium oxide plate has been investigated for detection of protein kinases activities. Because the one has self-cleaning ability to remove non-specific adsorption on the surface of itself, and plays a role of inorganic matrix at MALDI mass spectrometry, it will be expected to be able to realize more accurate analysis of protein kinases activities with high sensitivity. First, the titanium oxide plate was prepared by sol-gel method. It showed photo-induced hydrophilicity at UV irradiation and much of non-specific adsorption on its surface was removed only by washing with water. Next, substrate peptides were immobilized on the surface using 3-aminopropyl triethoxysilane and photo-cleaved linker by laser equipped with a MALDI mass spectrometer (MS). Finally, the peptide array were analyzed by MS. From above results, we would establish the basis technique to develop the peptide array using the titanium oxide plate for high sensitive detection at MALDI-MS.

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：ペプチドチップ リン酸化シグナル 質量分析 酸化チタン セルフクリーニング

## 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) この課題を解決するために、我々はこれまでに2つの手法を提案し研究を進めてきた。一つは、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をアレイの基板に利用する方法であり、もう一つは質量分析(特にMALDI-TOF-MS)による検出が可能なペプチドアレイを利用する方法である。前者は、酸化チタンが有する光誘起超親水化現象(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)を利用して、基板上に吸着した非特異的吸着物の除去を行う方法であり、後者はMALDI-TOF-MSに搭載されたイオン化レーザーによって切断される部位を有する基質ペプチドを合成することで、多少の夾雑物が存在している状態でもペプチドの検出が可能な方法である。

(4) ここで本研究では、酸化チタンが質量分析における無機マトリクスとして作用することに着目し、両者の特徴を併せ持つペプチドアレイの開発を目的とした。すなわち、酸化チタンを基板に持ち、かつ光切断部位を有する基質ペプチドを固定化したアレイを開発する。酸化チタンの非特異的吸着物除去能と無機マトリクスとしての性能を活用することで、質量分析において高感度な検出が可能になると期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 光切断化合物または光酸化切断化合物の合成とこれを組み込んだ基質ペプチドの合成

これまでの研究成果をもとに、イオン化レーザー光によって光切断され、かつ基質ペプチドと基板をつなぐリンカーとしての役割を担う化合物として、2-bromo-2-(2-nitrophenyl)acetic acid (BNPA) と 2-bromo-2-(2,4-di-nitrophenyl)acetic acid (BDNPA) を合成した。これらの化合物を酸クロライド化し、アミノ基修飾ガラス基板に固定化した。さらにN末端にシステインを有する基質ペプチドを合成し、基板上の化合物と反応させることで固定化を行った。

(2) 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

スピコーティング法を用いてガラス上に酸化チタンの薄膜を形成した。原子間力顕微鏡観察、X線光電子分光分析を行い、表面粗さや結合様式といった物性値を測定した。

基質ペプチドはシランカップリング剤を用いて酸化チタン薄膜表面に導入した官能基を利用して固定化する方法を利用した。

(3) 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

作製した基板に非特異的吸着物のモデルタンパク質として、蛍光標識ストレプトアビ

ジンを利用して、光照射による酸化チタン基板の非特異的吸着物除去能を蛍光分光分析により評価した。

(4) ペプチド固定化酸化チタン基板を用いた質量分析測定

市販リン酸化酵素を使い、作製した基板上で on-chip リン酸化反応を行った。その後、質量分析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 合成した光切断化合物の評価

2-(2-nitrophenyl)acetic acid または 2-(2,4-dinitrophenyl)acetic acid を出発原料として、塩化チオニルで酸クロライド化したのち、N-bromosuccinimide を使ったラジカル置換反応により目的物を合成した。ニトロ基一つの化合物を出発物質とした場合の収率は 35% で、融点は 103.0~118.9℃ と少し幅があり、多少不純物を含んでいることが示唆された。これは精製過程で蛍光灯などに含まれる不可避な紫外線によって化合物が分解していることに起因していると推察される。<sup>1</sup>H-NMR 測定 (Fig. 1)、FT-IR 測定、質量分析によって、目的物であることを確認した。ニトロ基 2 つの化合物を出発物質とした場合も同様の方法で確認した。

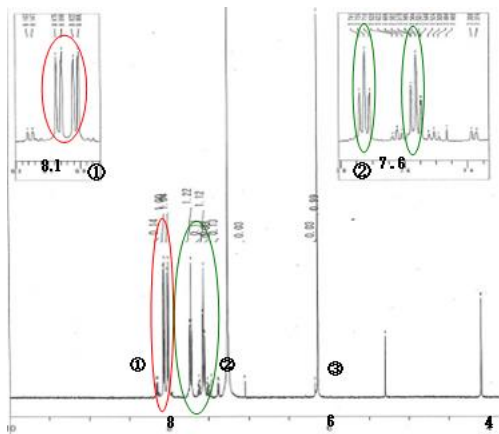


Fig. 1 BNPA の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

##### (2) 光切断化合物の基板への固定化

合成した化合物 BNPA、および BDNPA を改めて酸クロライド化したものをジクロロメタンに溶解し、アミノ基修飾ガラス基板上に展開した。基板上的アミノ基と反応したかの確認は、アミノ基と反応することで蛍光を発する試薬であるフルオレスカミンを用いて行った。結果を Fig. 2 に示す。(A) のように BNPA と反応させる前は蛍光が観測されたが、反応後は (B) のようになり、フルオレスカミンを使用せずガラス基板のみを測定した (C) とほぼ同じスペクトルとなった。このことから、BNPA は基板上に固定化されていることが示された。なお、BDNPA についても同様の結果が示された。

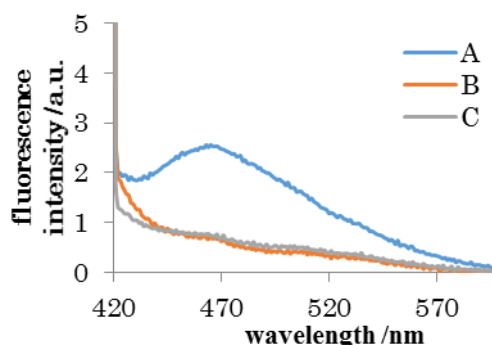


Fig. 2 BNPA 処理前後におけるガラス基板の蛍光スペクトル測定結果

続いて、BNPA 処理後の基板にアミノエタンチオールを塗布し、その後、フルオレスカミン処理をして、蛍光スペクトル測定を行った。その結果、フルオレスカミンの蛍光が回復した。このことから、アミノエタンチオールが基板上的 BNPA のブロモ基と反応して固定化されたことが示唆された。したがって、同じくチオール基を有する基質ペプチドは基板上に固定化できるものと判断して、実験を進めた。

##### (3) 調製した酸化チタン薄膜の物性評価およびアミノ基導入方法の検討

ゾルゲル溶液を用いてスピニング法によりガラス基板上に調製した酸化チタン薄膜の DFM 観察像を Fig. 3 に示す。平均面粗さは 0.58 nm であり、ガラス基板とほぼ同程度の滑らかさを有していることが分かった。粗い表面ではタンパク質の非特異的吸着量が増加することが確認されているので、このような滑らかな基板ができたことは重要な点である。



Fig. 3 酸化チタン基板の DFM 観察像

また、薄膜 XRD 測定を行った結果、一部アナターゼ結晶を含むアモルファス構造であることが示された。この基板に波長 365 nm の紫外線 (500 μW/cm<sup>2</sup>) を照射し水の接触角測定を行ったところ、2, 3 時間の照射により接触角が 10° 以下になる光誘起超親水化現象が起こった。

この基板にアミノ基を導入するために、3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) を溶解したエタノール溶液を調製し、スプッターを利用して酸化チタン基板上にスポットした。その後、アミノ基と反応する蛍光物質 TAMRA-SE で基板を処理し、蛍光アレイスキャナーで残存する TAMRA の蛍光を観察した。

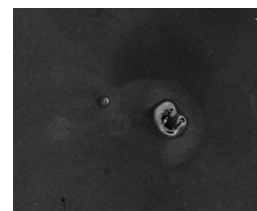


Fig. 4 シランカップリング処理後の蛍光画像

その結果を Fig. 4 に示す。バックグラウンド蛍光が高いため少しわかりづらいが、APTES を連続して3点スポットした部分の蛍光が観察されたため、アミノ基が導入されたことが示唆された。なお、1点だけが非常に強い蛍光を示し、残り2点は微弱な蛍光を示しているが、これはスポットがマニュアルであるためスポット液量が一定しないことが原因であると考えられる。以上の結果より、酸化チタン基板にもアミノ基を導入することができ、これを足がかりにして光切断化合物の固定化ができることが示された。

#### (4) 酸化チタン基板の非特異的吸着物除去能の検討

モデルタンパク質として Dylight448 標識ストレプトアビジンを用いて、この水溶液をガラス基板、または酸化チタン基板にスポットすることで非特異的吸着物とした。この物質が紫外線照射前後の水洗によってどの程度除去できるか検討した。結果を Fig. 5 に示す。

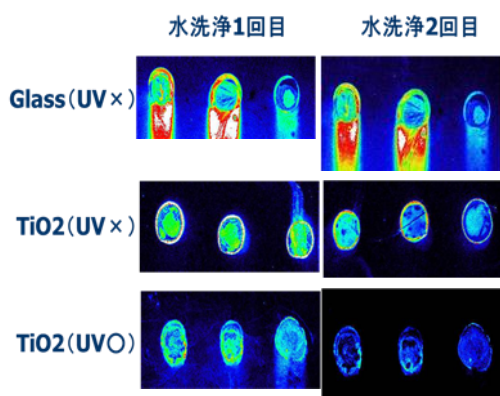


Fig. 5 各種基板の水洗浄後の蛍光画像

ガラス基板 (Glass) の場合、水洗浄ではほとんどタンパク質が除去できないが、酸化チタン基板の場合は、特に波長 365 nm の紫外線照射を行った際には、かなりのタンパク質が除去できていることが分かった。当初、これは光誘起超親水化によって水分子が基板とタンパク質の隙間に入り込み、洗浄されているものと考えていた。それは、この酸化チタンがアモルファス構造であり、光触媒として作用するには紫外線強度が不十分であると判断していたためである。しかしながら、より詳細に検討したところ、この現象は酸化チタンの光触媒作用による効果もある程度含まれていることが分かった。この場合、固定化した基質ペプチドも分解される恐れがあるため、今後は分解しないような方法を検討することが課題として挙げられる。

#### (5) ペプチド固定化酸化チタン基板を用いた質量分析

アミノ基修飾酸化チタン基板を用いて、BNPA を介して N 末端に Cys を持つ基質ペプチドを固定化した。この基質ペプチドはプロテ

インキナーゼ A の基質配列を有しているため、この酵素を作用させることでリン酸化を起こすことができる。この基板を使って質量分析を行った。まだプレリミナリーな結果しか得られていないが、有機マトリクスを共存させることでイオンピークを確認することができた。また、細胞破碎液を利用した場合にはペプチドの検出に成功していないので、今後は最適な処理方法を検討していく。

#### 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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 園田達彦 他, 細胞内リン酸化シグナル網羅的解析のための酸化チタン基板の開発, 第 49 回化学関連支部合同九州大会 (2012 年 6 月、北九州国際会議場)
- ② 園田達彦 他, 酸化チタンを用いたペプチドチップの開発, 日本化学会西日本大会 2012 (2012 年 11 月、佐賀大学本庄キャンパス)
- ③ 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質量分析検出型ペプチドアレイの開発, 日本化学会第 93 春季年会 (2013 年 3 月、立命館大学びわこ・くさつキャンパス)
- ④ 園田達彦 他, 質量分析検出型ペプチドアレイの開発, 第 50 回化学関連支部合同九州大会 (2013 年 7 月、北九州国際会議場)
- ⑤ 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質量分析検出型ペプチドアレイの開発, 2013 年日本化学会中国四国支部大会 (2013 年 11 月、広島大学東広島キャンパス)

[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