

## ペプチドアレイを用いたプロテインチップの実用化を目指した研究

軒原 清史<sup>\*1, \*2</sup>・大山 貴史<sup>\*1</sup>・臼井 健二<sup>\*3</sup>・米村 耕一<sup>\*1</sup>・富崎 欣也<sup>\*3</sup>・三原 久和<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup> (株)ハイペップ研究所 (〒602-8158 京都市上京区下立売通千本東入中務町 486-46)

<sup>\*2</sup> 南京医科大学 (210029 中国南京市広州路 300 号)

<sup>\*3</sup> 東京工業大学大学院生命理工学研究科 (〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259)

### 要旨

電気泳動や質量分析による解析に代わる新規なハイスループット技術はタンパク質の機能解析には不可欠となっている。筆者らは高感度で検出が可能な、実用性のある新しい手法によるプロテインチップの開発を実施している。すなわち、蛍光プローブで標識された  $\alpha$ -ヘリックスやループといった二次構造をとるペプチドを設計・合成し、これをアレイとしてタンパク質との相互作用を検出する手法である。ライブラリー構築、標識、2 種のアレイヤーの試作、固定化、検出など、製造という観点に重点をおき実用化を目指している。最近、筆者らはペプチドライブラリーと各種タンパク質による認識が蛍光強度パターンとして、各タンパク質に特異的な編模様として検出できることを見いだした。フィンガープリント法と名付けたこの手法を用いて次世代バイオチップの実用化を図ろうと考えている。

### [Comprehensive Papers]

### Development of a practical protein-chip using designed synthetic peptide-arrays

Kiyoshi NOKIHARA<sup>1, 2</sup>, Takafumi OHYAMA<sup>1</sup>, Kenji USUI<sup>3</sup>, Koichi YONEMURA<sup>1</sup>, Kin-ya TOMIZAKI<sup>3</sup>, and Hisakazu MIHARA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>HiPep Laboratories (Kyoto 602-8158, Japan)

<sup>2</sup>Nanjing Medical University (Nanjing, China)

<sup>3</sup>Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology (Yokohama 226-8501, Japan)

Novel high throughput technologies, which can replace conventional electrophoresis and mass spectroscopic analyses, are in great demand for understanding the structure-function relationships of proteins. For a practical protein-detection system, arrays with immobilized designed synthetic peptides have been constructed. In order to achieve high sensitivity, peptides were labeled with fluorescent dyes. Two different types of prototype-arrayer have been constructed, one has a micro-dispensing system and the other a spot-printing system. Combinatorial peptide libraries, which consisted of  $\beta$ -loop,  $\beta$ -strand and  $\alpha$ -helical peptides, were constructed by improved highly efficient solid-phase synthesis. Labeled peptides were covalently immobilized on solid support such as precision glass plates. Various proteins were characterized with these peptide-arrays using a fluorescent scanner to give the "protein fingerprint" which is characteristic of the individual proteins. The results of the present prototype system demonstrate the practicality of protein-chips as a new generation of biochip.

KEY WORDS Peptide library / High throughput synthesis / Fluorescent labeling / Protein chip / Arrayer / Finger print method / Protein detection

#### Corresponding author:

Dr. Kiyoshi NOKIHARA, CEO & CSO HiPep Laboratories, Visiting Professor of Nanjing Medical University

Nakatsukasacho 486-46, Kamigyo-ku, Kyoto, Zip 602-8158, JAPAN

Phone +81-75-813-2101 Fax +81-75-801-0280 email: [noki@hipep.jp](mailto:noki@hipep.jp) URL: <http://www.hipep.jp>

### 1 はじめに

ポストゲノム時代において、ゲノム解析に比べ遙かに複雑なタンパク質解析を従来の方法よりも簡単に、しかもタンパク質個々の性質をも同時に解析できる系の確立は重要な課題である。近年、ヒトゲノム解明の成功について、産生するタンパク質の意義の解明や同定が盛んとなり、いわゆるプロテオームという用語が生まれた。このため、電気泳動や質量分析装置、そして DNA 解析のデータベースによるタンパク質の解析手法が一般化した。しかし、実際に同定すべきタンパク質の種類と数は、異なる翻訳後修飾や生体の置かれた状況による変化まで加算すると膨大となる。また多くの重要なタンパク質の発現量は非常に少量であり、DNA の様に増幅する技術はいまだ無い。さらにタンパク質の発現量パターンの

多くは細胞の状況やシグナル分子によって鋭敏に変化する。生物のもつ膨大な情報の解明のためにタンパク質の研究は、ますます迅速高効率化が必要となっている。生体機能において最も複雑で多様性の高いタンパク質検出に関しても、分子アレイとして“DNA チップ”の延長上で“プロテインチップ”が提唱されており、多くの場合、抗体タンパク質が固定化されているが、その価格まで含めた実用的なチップはまだ市場にはない<sup>1)</sup>。筆者らはタンパク質相互作用をペプチドでミメティックするために、タンパク質立体構造認識特性を利用した二次構造形成ペプチドをアレイとするタンパク質検出系の構築を目的に研究をすすめている。

プロテインチップの用途はプロテオーム解析、創薬、臨

床医学や環境科学などの研究分野はもとより、迅速な診断検査による疾病の早期発見予防、環境モニター、食品・農業などの安全性の検査など極めて広範であり、市場も大きい。迅速

・省エネ・低価格・高効率、新規産業の創出など社会的な貢献度も極めて高い。

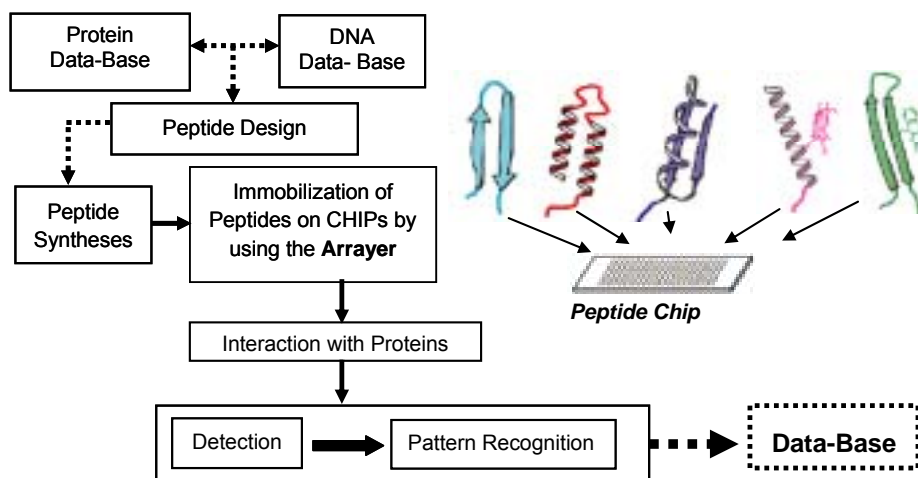


Fig. 1. Concept of the present research.

## 2 研究の背景、課題と特徴

生体は、その生命維持のために分子どうしの認識を用いて各種の情報伝達を行っているが、その核となるのはタンパク質-ペプチドの相互作用である。ペプチドは、その構成ユニットであるアミノ酸側鎖の官能基の数や種類による組合せによって認識における多様性が生み出され、設計が可能である。筆者らはここに着目し、デザインした構造に基づく化学合成ペプチドをセンサー素子として応用し、タンパク質を検定同定するための次世代バイオチップの創製に挑戦してきた。Figure 1 に本研究のコンセプトを模式図で示す。

将来的なバイオチップ需要は、臨床を中心とした場合年間 10 兆円を越えると推定され、プロテインチップの需要は、10 年後には臨床を中心に DNA チップの需要を超えるものと推定されている。そこで著者の一人は、生体機能に関わる分子認識研究のライフワークを進めるべく 2002 年 3 月ハイペップ研究所を設立し、これまでのペプチドに関する合成化学、生物化学、工学、医学・生理学・薬学的研究を応用してペプチドチップの実用化をめざした研究開発を進めている。

最近、デザインペプチドをアレイ上でタンパク質と認識させた時に得られる蛍光強度をパターン化し、各タンパク質に特有なパターンを得る手法、フィンガープリント法を考案した。この原理は、アレイとした個々のペプチドとタンパク質の認識が DNA チップのように 1 対 1 である必要はなく、むしろ類似タンパク質の場合でも微妙な認識パターンの差が生じ、これによってタンパク質の同定、定量が可能となることを強く示唆したものである。実験では 100 種程度のペプチドライブラリーによる結果であるが、ペプチドの種類・数を増加さ

### 2.1 多種の標識ペプチドの高効率合成

実用化へのキーテクノロジーは、設計ペプチド群の高効率多種同時合成<sup>2,3)</sup>である。一般に、ペプチドの固相合成は確立されているが、いわゆる難シークエンスなどの問題点はスループットを低下させる。固相から切り出されたペプチドの純度と収率は、製造という観点から特に価格に大きく影響する。また、精製に要する時間はアレイ構築のスループットに直接影響する。筆者らはこのために、合成装置<sup>4)</sup>・合成プロトコル、高性能の逆相カラム<sup>5)</sup>などを開発してきた。そして効率よい検

定にはイオントラップ質量分析装置をルーチンで用いた。デザインしたペプチドの概要を Figure 2 に示す。設計ペプチドの立体構造は化学合成、検定の後、アレイのためのライブラリーとした<sup>6-8)</sup>。すなわち、タンパク質の基本構造であるループ、ヘリックス、ストランドなどの構造をとるために必要な残基数を Figure 2 に示す。それぞれ 12 残基、14 残基、7 残基とし、基礎研究として立体構造をとるように基本のアミノ酸配列をデザインし、さらにこのアミノ酸を種々置換し、

一般的に研究されている抗原抗体反応を利用したチップは抗体を固定化することでタンパク質を定量する。事実、ELISA 法という抗原抗体反応によるアッセイ法は研究のみならず臨床検査の場で広く用いられている。標的タンパク質に反応する抗体を作製し固定化するわけであるが、この手法では膨大な数の抗体が必要になり、すべてのタンパク質に対応するためには天文学的な数となる。この手法は基本的には特定タンパク質の特異抗体という、1 対 1 の相互作用に基づいている。また、抗体の安定性、再現性、固定化される量、固定化位置のパラッキ、価格の問題、これらに加えて抗原抗体反応では避けられない交差反応性の問題（非特異反応）など、実用化を阻む要因が多い。

本技術研究の発展には、多種の標識ペプチドの高効率合成と検定、基板材料の最適化、基板上への固定化ケミストリーの最適化、固定化のためのデバイス、検出法（アッセイ法）と検出器の最適化、データマイニングとデータベースの構築と、数多くの課題があり、それぞれの要素技術を確立せねばならない。さらに、それぞれの成果が互いに密接に関連しているため、統合的な研究が不可欠である。

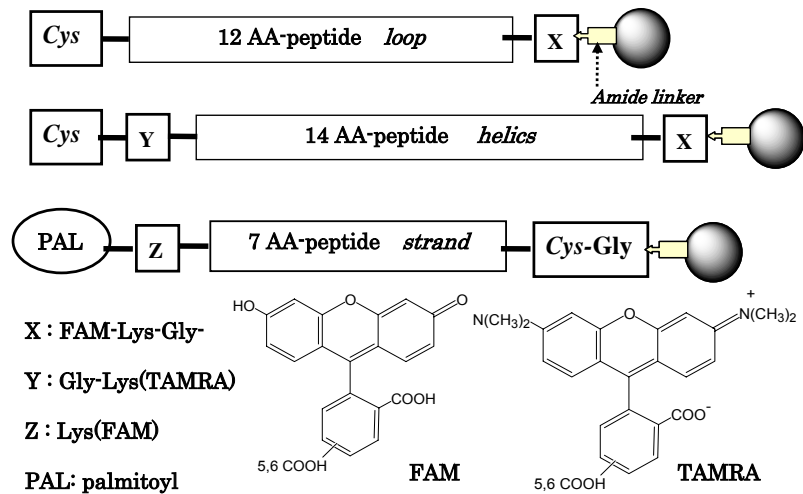
定にはイオントラップ質量分析装置をルーチンで用いた。デザインしたペプチドの概要を Figure 2 に示す。設計ペプチドの立体構造は化学合成、検定の後、アレイのためのライブラリーとした<sup>6-8)</sup>。すなわち、タンパク質の基本構造であるループ、ヘリックス、ストランドなどの構造をとるために必要な残基数を Figure 2 に示す。それぞれ 12 残基、14 残基、7 残基とし、基礎研究として立体構造をとるように基本のアミノ酸配列をデザインし、さらにこのアミノ酸を種々置換し、

配列に多様性をもたせた。すなわち、アミノ酸残基をイオン性、疎水性、側鎖のかさ高さなどで変換させたライブラリー配列である<sup>6)-8)</sup>。それぞれの配列が所定の構造をとることは円二色性スペクトルによって確認した。共通アミノ酸の末端部 Cys 残基は SH を介して基板に固定化するために用いた。標識のための蛍光基は Figure 2 の X, Y, Z で記した Lys 残基のアミノ基側鎖に導入した。蛍光色素として、5(6)-carboxyfluorescein (FAM), 5(6)-carboxy tetramethylrhodamine (TAMRA), 5-dimethylamino naphthalene-1-sulfonyl (dansyl), 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid (DAC) および N-(acetamidoethyl)-1-naphthylamine-5-sulfonic acid (EDANS) などを検討した。吸光特性, 合成技術, 価格, 安定性など多方面から検討した結果, Figure 2 に示す FAM と TAMRA を選択した。このデザインでは蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法も使える利点があり, 試作実験では感度の良い検出が可能であることが示された。Lys (TAMRA) はビルディングブロックとして導入した。C 末端の蛍光色素は on-resin で導入した。異なる配列をもつ多種

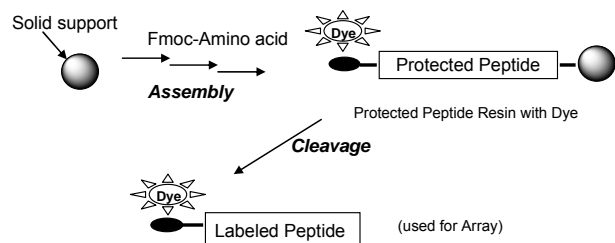
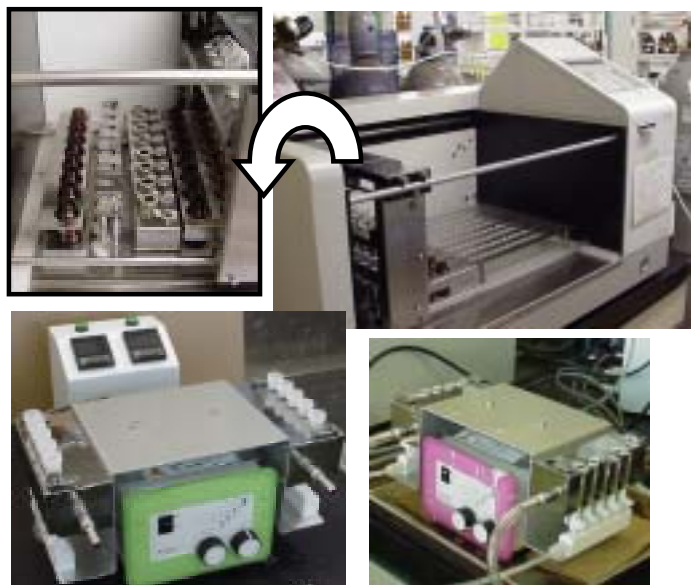
ペプチドは PSSM-8 (株島津製作所) および PetiSyzer (株ハイベップ研究所)<sup>4)</sup>などを用いて合成し, 加温および溶媒の選択<sup>10)</sup>により高い収率で得られた。アミノ酸の導入は N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)-methylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide (HBTU) と 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) を用いる系により, Fmoc 法で行った。Fmoc 基の脱保護は piperidine-DBU 系を用いた<sup>2)-4), 10)</sup>。別途大量合成した C 末端蛍光標識ジペプチドレジン を原料とし, 構造デザイン部分のペプチドは自動合成機 PSSM-8 でアッセムリーを行った。ヘリカルペプチドは膨潤させたまま自動合成機より反応容器を取り出し, マニュアル合成機 PetiSyzer に装填し N 末端部の高価な蛍光基入りビルディングブロックの導入を難シークス用のプロトコルによって, しかもできるだけ小過剰の試薬を用い, 副反応を避けながら実施した。なお, 自動合成において難シークスと推定されるペプチド群は別途マニュアルで再合成した。Figure 3 は自動, 手動合成, 多種同時クリーページなどライブラリーの合成実験を示す。

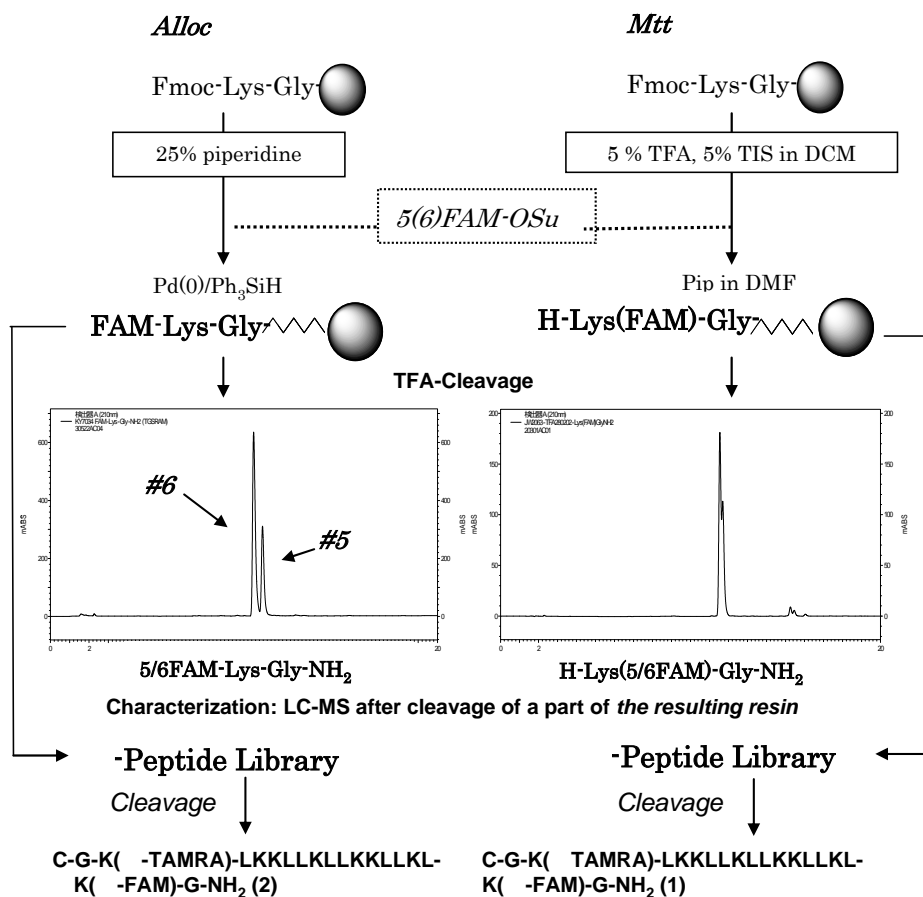
**Fig. 2.**

Design for fluorescent peptides. The middle part in structures, which may interact with proteins, exhibits secondary structure and their sequences have large diversity by systematic replacement with charge and/or hydrophobicity. In the preliminary studies we have constructed ca. 300 peptides, which were characterized by LCMS. A representative chromatogram of a crude  $\alpha$ -helical peptide with two dyes is illustrated in Fig 6.

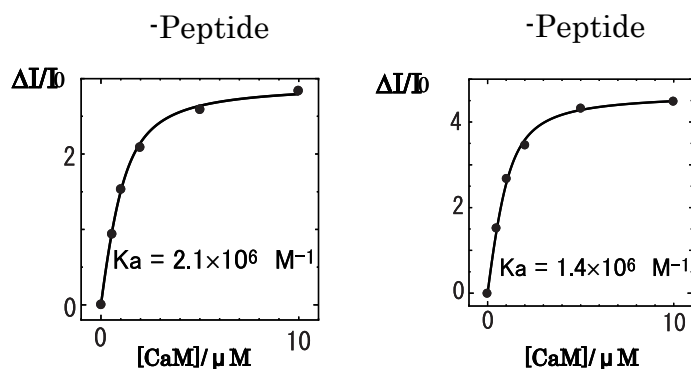


**Fig. 3.** Assembly of libraries (upper left: simultaneous multiple syntheses using PSSM-8, upper right: manual coupling and lower right: cleavage reaction using PetiSyzer®).

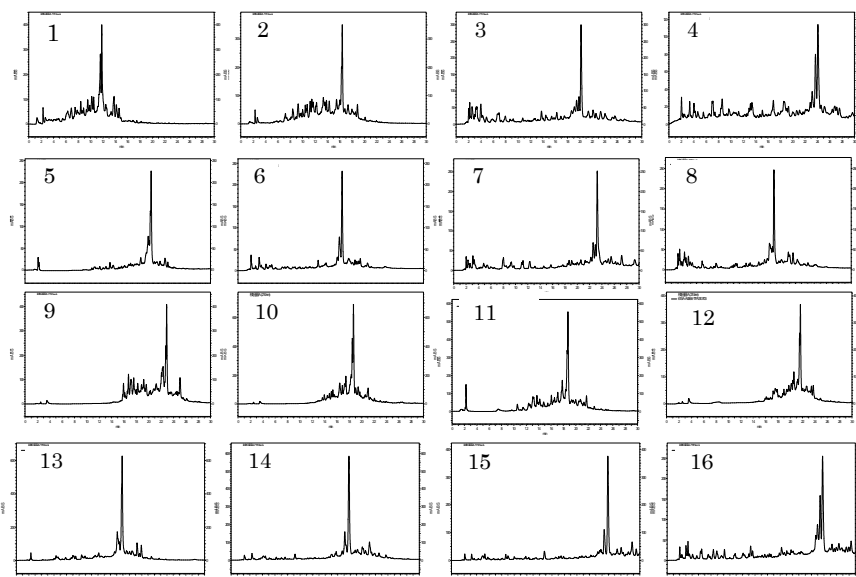




**Fig. 4.** Synthesis routes for the labeled dipeptide-resin as the C-terminal starting material and  $\epsilon$ - and  $\alpha$ -helical peptide used for recognition study (Fig 5). Chromatograms show quality of crude two dipeptides generated by different routes



**Fig. 5.** Between  $\epsilon$ - and  $\alpha$ -peptide, no predominant difference has been observed for recognition in the protein model system when used as an array. A spindle indicates increment of the fluorescent intensity ( $\Delta I/I_0$ ,  $I_0$  = initial intensity without protein, FRET:  $\lambda_{ex}$  485 nm,  $\lambda_{em}$  580 nm).



**Fig. 6.** HPLC profiles of crude  $\alpha$ -peptides for array (desired labeled material consisting of four components due to mixtures of 5&6 FAM and 5&6 TAMRA, respectively).

将来、工業的な生産を行う上で合成法の最適化は重要かつ不可欠な研究である。試薬反応条件、ペプチド合成のストラテジー（保護基の選択、カップリング法、固相担体、クレーベジ法）など反応すべてについて多角的に最適化条件確立のための実験を行った。ここでライブラリーの出発原料となる C 末端部分の合成において、Lys 残基への蛍光色素の導入はレジン上で行った。当初、Lys 残基の側鎖保護基として酸による選択的除去が可能な 4-methyltrityl (Mtt)基を選択したが、コストや副反応の低減を目指して allyloxycarbonyl (Alloc)基についても検討を行った。合成のストラテジーから Mtt 基は FAM-Lys( -ペプチド)、Alloc 基は FAM-Lys( -ペプチド)を与えた (Figure 4)。2 種類のスタートレジンからペプチドを伸長した -ペプチド(1)と -ペプチド(2)に対し、タンパク質への認識の比較を行った。その結果、両種のヘリカルペプチ

ドとカルモジュリン (CaM) の系において両者に有意差は認められなかった (Figure 5)。実際の製造コストの検討では、Mtt 保護から得られる Figure 4 における化合物(1)の生産コストは Alloc 保護からの化合物(2)の約 5 倍であった。ライブラリーの構築を効果的に行うため合成法を検討し多種の TAMRA-FAM 二重標識ヘリカルペプチドを得た。得られたペプチドは LC-MS で検定した。Figure 6 に代表的なペプチドのクレーベジ後の粗ペプチド Cys(SH)-Gly-Lys( TAMRA)-[14 Amino acid fragment]-Lys( FAM) の逆相 HPLC クロマトグラムを示す。蛍光色素はそれぞれ 5, 6 異性体の混合物を用いたため、少なくとも主生成物は四つのコンポーネントから成る。異性体の混合比は目的とする検出に影響を与えないことを確認した。

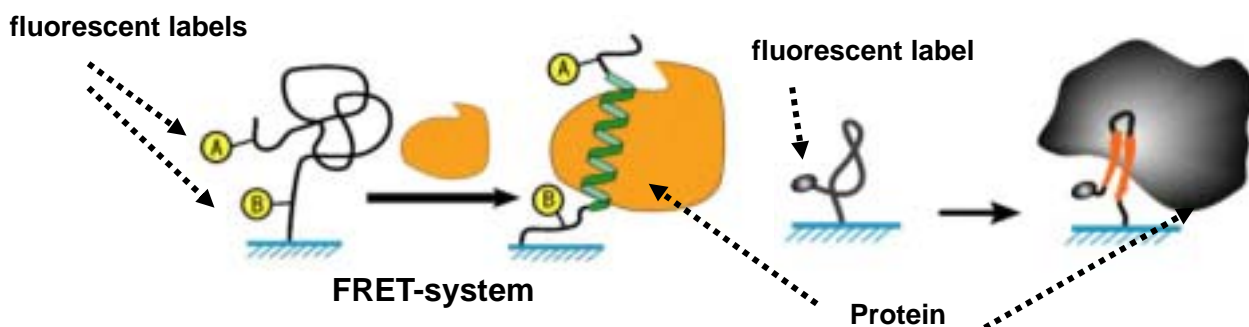


Fig. 7. Protein recognition model: calmodulin and  $\alpha$ -helical peptide labeled with two different fluorescent dyes for fluorescent resonance energy transfer (FRET) (upper),  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -loop structure with single dye (lower).

なお、本研究における基礎検討では、タンパク質の認識モデルとしてカルモジュリンの系並びに  $\alpha$ -アミラーゼの系を応用した。Figure 7 にその模式図を示す。カルモジュリンは

カチオニックな両親媒性の  $\alpha$ -ヘリックスペプチドと相互作用をし、一方、 $\alpha$ -アミラーゼは  $\beta$ -ループ構造を認識することが知られている<sup>11),12)</sup>。

## 2.2 基板材料と固定化ケミストリー

本研究で我々はガラスプレートとプラスチックマイクロウェルプレートタイプの 2 種類の材料で基礎検討を行った。前者は精度の高い研磨ガラス板をアミノ化したものである。後者のマイクロウェルタイプはアミノ基でコーティングした<sup>6)</sup>。両者ともアミノ基をプロモ酢酸と反応させ、プロム化し、各

ペプチドのスルフィドリル基と反応させ固定化した。現在、ウェルタイプの方が感度は高い (サブ pmol 量のタンパク質の検出を可能としている)。今後、表面化学や検出法などを工夫してプレートによるドライタイプでも、ウェルによる溶液アッセイに近い感度と精度のチップ開発を行う予定である。

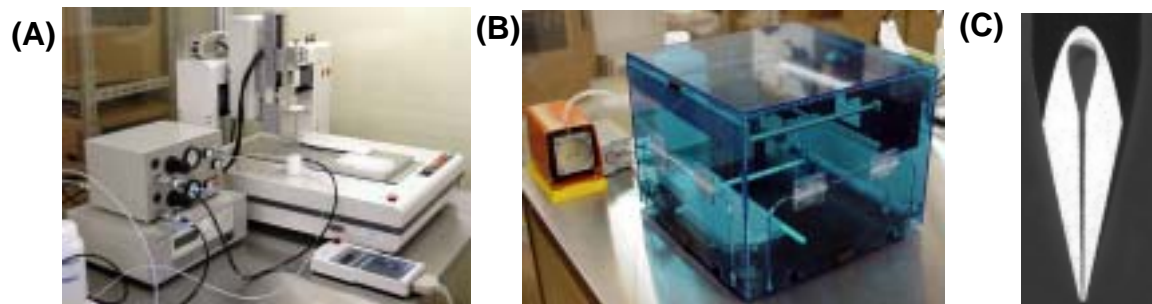
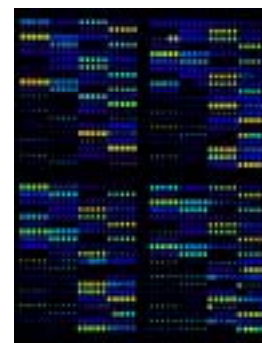


Fig. 8. Two types of arrayers have been constructed: (A) is a dispensing system with a micro-syringe and, (B) is a spot-printing device involving the special micro spotting pins (C), which was purchased from TeleChem International, Sunnyvale, CA.

### 2.3 固定化デバイス

アレイ製作用のデバイス, 機能性ペプチドチップ製造のためのプロトタイプ装置(微量ペプチド固定化用装置), マイクロディスペンス法 (Figure 8A) とピンスポッティング法 (Figure 8B) と 2 種のデバイスを試作した. クロスコンタミネーションは感度と精度の敵である. これを避けるために両試作機とも洗浄および乾燥モジュールを設置した.

マイクロディスペンス法による装置は, ディスペンサーによって微量のビルディングブロック, 活性化試薬, 溶媒などをチップ上に送り込み, 基板を固相担体として, ペプチド合成を行い, アレイを製造することを目的として試作した. しかしながらセンサー素子となるペプチドを基板上で合成し, 固定化されたペプチドのクオリティーは, ペプチドの構造, アミノ酸配列に依存し, いわゆる難シークエンスでは目的とするペプチド以外に欠損ペプチドも生成する. しかもその純度は直接には検定できず, 基板上への導入量のコントロールも困難であった. さらに実用上, ディスペンス法ではハイスループットな固定化が困難であった. 当該手法はしかし, 固定化をしない, 溶液アッセイのためのアレイペプチドの分注には有用である. 一方, ピンスポッティング法として, DNA チップの作製用に開発されたモジュールを改造し検討を行った. この方法はチップ表面上で細かい化学反応を行うことはできないが, スループットは大変優れている. ピンスポッティング法では専用のマイクロスポッティングピン (TeleChem International Inc.) を用いた. ピンは平らな先端と独特のサンプルの取り込み路を特徴とし, 他のスポッティング技術と異なり吐出のメカニズムはタッピングではなく表面張力である. 当該のピンにサンプルが充填されると, 先端に薄いサンプル膜が形成される. この薄いサンプルの層が基板に近接すると, 薄いサンプル層は表面張力によってピン先端から引っ張られ, サンプルの吐出を促進する. このためプリントする基板表面とピン先との物理的接触は必要でない. スポットサイズと吐出量はピン先のサイズによってコントロールする. 筆者らのスポットは直径 210~230  $\mu\text{m}$ , デリバリー容量は 1.8 nL である. 平方センチメートルあたりで 1254 スポットが可能である. すなわち, 通常のスライドガラスサイズ 1 枚には  $1.6 \times 10^4$  以上のスポットが形成できることになる. Figure 9 はスライドガラス上のアレイペプチドの蛍光検出の典型例である.



← ca 10 mm →

Fig. 9. A representative peptide array detected by a commercial scanner (Resolution 10  $\mu\text{m}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}$  550,  $\lambda_{\text{em}}$  570 nm).

### 2.4 タンパク質との相互作用の検出

タンパク質とペプチドの立体構造に基づく相互作用のモデル系 (Figure 7) を用いて検出法に関して種々検討した. ループペプチドとしては  $\beta$ -アミラーゼ阻害剤であるテングミスタットの活性部位を含むペプチド Ten(15-23)を用いた.  $\beta$ -ヘリックスペプチドには, カルモジュリン (CaM) が認識し結合す

ることが知られている塩基性の両親媒性ペプチド (Figure 4 類似体) を, さらに  $\beta$ -ストランドは, 機能性基であるアルキル鎖を付与し,  $\beta$ -ラクトグロブリンを検出する系を検討した. これらループ, ヘリックス, ストランドなどはタンパク質相互作用の代表的な構造である.

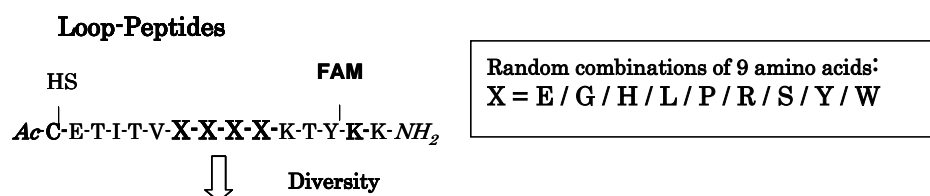


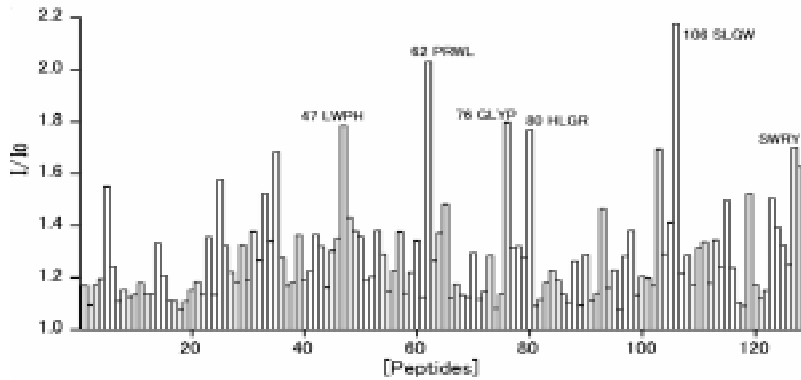
Fig. 10. Diversity in the loop-peptide library constructed in the present study.

まず, 筆者らはさまざまなターン配列を含む約 130 種類のループペプチドライブラリーを構築した<sup>6)</sup>. 構築したライブラリーの構造を Figure 10 に示す. ここでは蛍光基として FAM を用いてペプチドを標識した<sup>6)</sup> 親水性コーティングし, プロモアセチル基を結合させたポリスチレン 96-ウェルプレート上にライブラリーペプチドの Cys 残基側鎖スルフィドリルを介して固定化した. ペプチドを固定化したマイクロプレートに  $\beta$ -アミラーゼや phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) で処理したトリプシンなどさまざまなタンパク質を添加し蛍光変化を測定した. タンパク質溶液を各ペプチド固定化ウェルに加え, 蛍光強度 ( $I$ ) をマイクロプレートリーダーにより測定した後, 溶液を取り除き, 水で洗浄後, ウェルにパフファを添加しペプチドのみの強度 ( $I_0$ ) を測定した. これらの値はタンパク質を加えた蛍光強度とタンパク質のないペプチドのみの初期強度の比較から蛍光変化の値 ( $I/I_0$ ) で評価した. Figure 11 に示すごとく 47, 62, 76, 80, 106 番のペプチドは

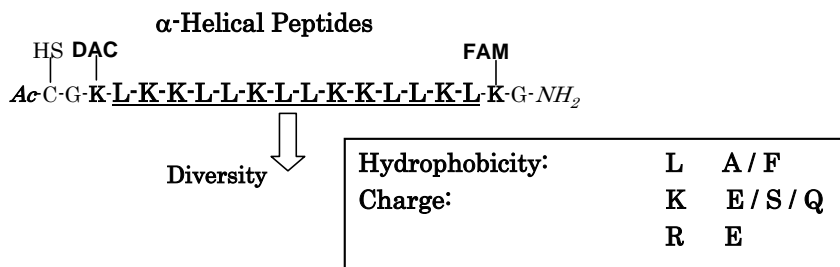
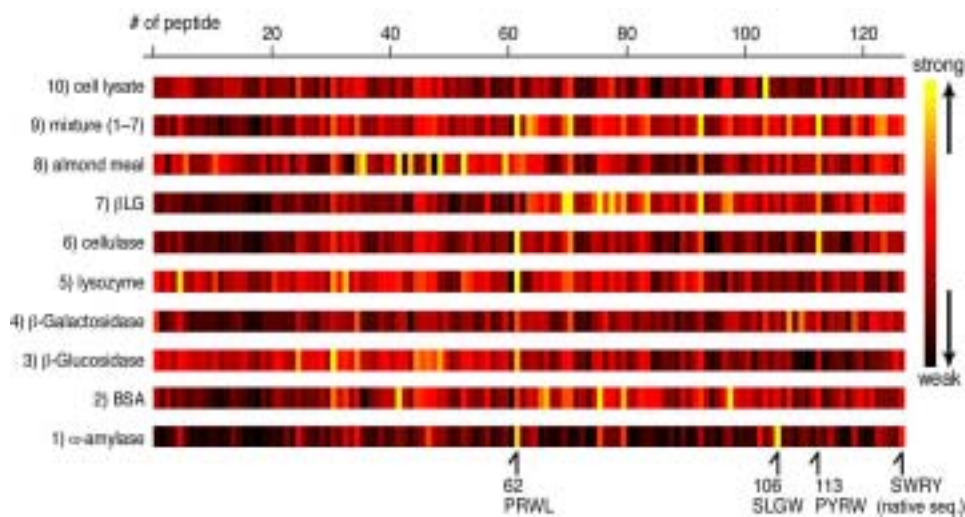
$\beta$ -アミラーゼに対して他のペプチドに比べて強い変化を示した. 一般に,  $\beta$ -アミラーゼに対して相対的に強い蛍光変化を示すペプチドはターン部位において Trp, Arg, Ser 残基を含んでいた. これらのアミノ酸はテングミスタットのループ内にある残基である. 正電荷をもつペプチドは  $\beta$ -アミラーゼやトリプシンに対してより高いレスポンスを示したが, 負電荷をもつペプチドに対しては弱かった. この結果はこれらタンパク質の結合特性と一致していた. すなわち,  $\beta$ -アミラーゼやトリプシンのインヒビター結合部位は正電荷残基を含んでいる. 今回得られた結果は, さまざまなターン配列をもつループペプチドライブラリーを用いた蛍光検出パターンによりタンパク質の特徴づけが可能であることを示唆している. さらに多くのタンパク質について調べるため, グリコシダーゼファミリー ( $\beta$ -アミラーゼ,  $\beta$ -グルコシダーゼ,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ, リゾチーム, セルラーゼ), 2 種のタンパク質 (牛血清アルブミン (BSA),  $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -LG)),

そしてそれらの混合物 (各 0.25 mg/mL) などについて実験を行った。タンパク質に対する蛍光変化のパターンをその強度に応じて黒-赤-黄色としてのカラーイメージに変換させることによって、アレイ上に固定化したデザインペプチドとさまざまなタンパク質間の相互作用を特殊なカラーパターンとし

て可視化することができ、個々のタンパク質に特徴的な縞模様を得ることに成功し (Figure 11), 筆者らはこのパターン分析を「プロテインフィンガープリント法」と命名した。



**Fig. 11.** Recognition pattern of several proteins to the  $\beta$ -loop peptide library by the "protein finger print method"<sup>6)</sup>. The fluorescent responses were converted using the program Igor Pro (WaveMetrics, Inc.) ( $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$ ).



**Fig. 12.** Diversity in the  $\alpha$ -helical peptide library constructed in the present study.

次に高次構造や機能性基を保持したまま、アミノ酸残基を置換していくことで、ペプチドの疎水性や電荷などを変化させた  $\alpha$ -ヘリックスペプチドのミニライブラリー (Figure 12) を構築し、検討を行った<sup>7), 8)</sup>。タンパク質検体として CaM, S-100, ミオシン, プロテインキナーゼ A,  $\alpha$ -アミラーゼ,  $\beta$ -LG, インシュリンなどを用いた。112 種類の  $\alpha$ -ヘリックスペプチドアレイを 96-ウェルプレートに加えて液相系で相互作用を検討した。バッファ中のペプチドおよびタンパク質溶液とペプチドのみの各ウェルの蛍光強度を測定した。添加したタンパク質中のペプチドの蛍光強度とタンパク質を入れない初期の強度から蛍光変化 ( $I/I_0$ ) を求めた。 $\alpha$ -ヘリックスにおいては、1 種類の蛍光色素を用いるよりも、ペプチドの

両末端に DAC と FAM の 2 種類の蛍光色素を導入し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) システムを用いることによって、より高感度なタンパク質の検出が可能であることを見いだした。これらタンパク質の結合特性をより簡単に理解するために、蛍光強度のパターンをループペプチドライブラリーの場合と同様にカラーイメージに変換したところ同様にフィンガープリントを得た。さらにこのアレイにおいて、X 軸に疎水性、Y 軸を電荷で分類することによって二次元パターンが得られた (Figure 13)。これによってタンパク質は疎水性と電荷のパターンの両方から同定できることが示唆された。このように、二次元解析によりフィンガープリント法から得られる情報はさらに増大する。

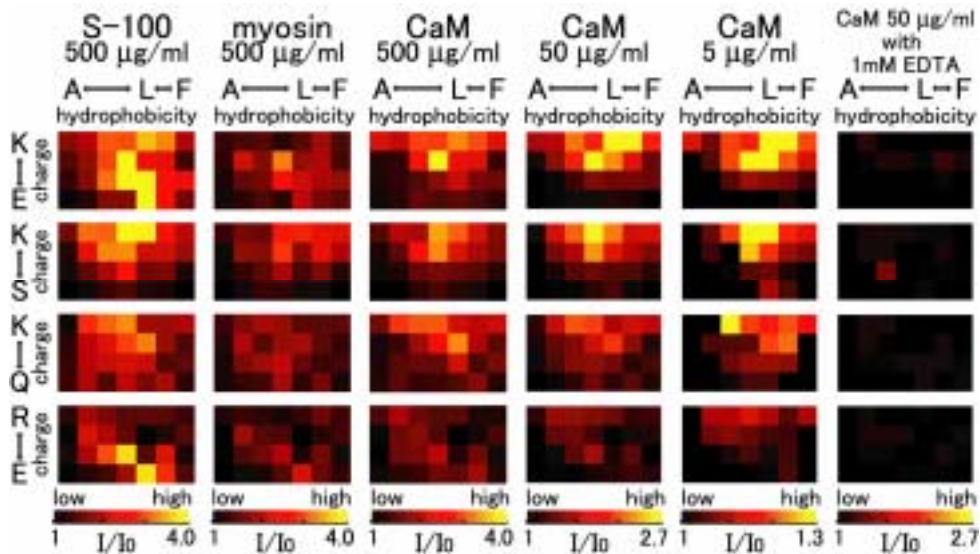


Fig. 13. Two dimensional fingerprint patterns obtained by the array of  $\alpha$ -helical peptides in the present model system<sup>7)</sup>.

CaMによるタンパク質フィンガープリントでは、数種類のペプチドがより高い蛍光レスポンスを示し(3~4倍),ほかのものは2倍以下であった.このことはCaMがLeuを有するカチオン両親媒性ヘリックスペプチドとより強く結合することを示している. EDTA添加によって遊離のCa<sup>2+</sup>を除去するとCaMは反応を示さなくなる.遊離のCa<sup>2+</sup>が存在しない時は, CaM自身の構造的な変化のためほとんどペプチドと結合しない.このことはタンパク質フィンガープリントがタンパク質

の三次構造に厳密に依存していることを示している.さらにCaMの濃度変化により,タンパク質フィンガープリントのレスポンスは異なる.結果として,この $\alpha$ -ヘリックスペプチドアレイはタンパク質の三次構造を認識し, $\beta$ -ヘリックスモチーフのような構造的に類似のタンパク質もそれらのタンパク質フィンガープリントによって区別できる.また,タンパク質フィンガープリントと蛍光強度の両者からタンパク質の濃度が推定できることを示した.

### $\beta$ -Strand Peptides

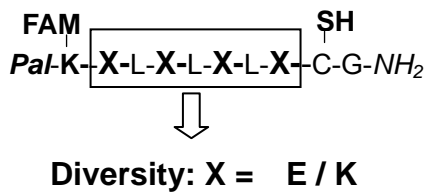


Fig. 14. Diversity in the  $\beta$ -strand library constructed in the present study.

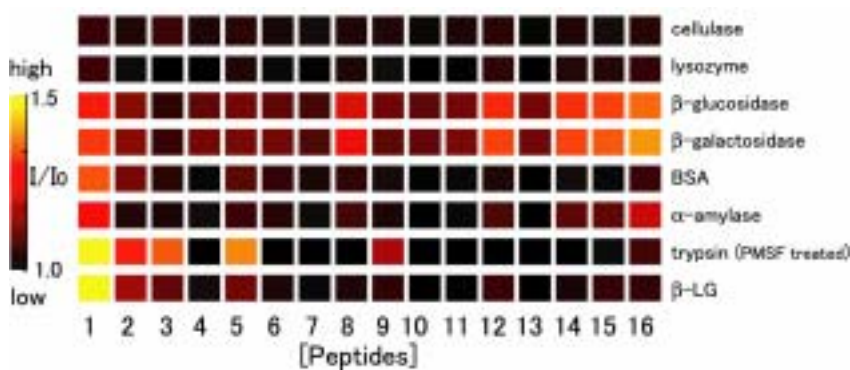


Fig. 15. Protein fingerprints generated with the fluorescent responses of the  $\beta$ -strand library peptides immobilized onto microtiter plates<sup>7)</sup>.

アルキル基をもつ $\beta$ -ストランドペプチドアレイをルーペペプチドと同様の方法で固定化し構築した(Figure 14)<sup>8)</sup>.固定化した $\beta$ -ストランドペプチドライブラリーを用いてもタンパク質をキャラクタライズすることができた.選択したタンパク質サンプルは $\beta$ -LG, グリコシダーゼファミリー(前述), BSA, トリプシンである.ルーペペプチドと同様に蛍光強度( $I/I_0$ )を用いてカラーイメージに変換し,個々のタンパク質のタンパク質フィンガープリントを得た(Figure 15). $\beta$ -LG,

$\beta$ -グルコシダーゼ, $\beta$ -ガラクトシダーゼ,トリプシンではいくつかのペプチドが1.3~1.5倍の蛍光増加パターンを示した.リゾチームとセルラーゼはほぼレスポンスがなかった. $\beta$ -LGのタンパク質フィンガープリントにおいて,3つまたは4つのLys残基をもつペプチドは高いレスポンスを与えた.これは $\beta$ -LGの結合特性を示していると考えられる. $\beta$ -グルコシダーゼや $\beta$ -ガラクトシダーゼのタンパク質フィンガープリントは同じ結合特性をもつため類似していた.アルキル基



をもつ  $\alpha$ -ストランドペプチドにおいても、タンパク質フィンガープリントにより、タンパク質を特徴付けることができた。しかしそれらの蛍光強度の変化量は小さいものであった。

以上、筆者らはアレイ状に配置した、設計・合成ペプチド群とさまざまなタンパク質との間の相互作用をパターンとして可視化することに成功した。この手法によって、ガラス基板へ固定化したペプチドもマイクロウェルの場合と同様の結

果、すなわちフィンガープリントを与えた。筆者らが命名したこのタンパク質フィンガープリント法はタンパク質検出系として有用であり、工業的なスケールのタンパク質チップ生産に最適であるという確信を得た。

さらに、当該ペプチドアレイをチップ基板上に固定化したバイオチップは再使用できることが予備的な実験によって示されている<sup>9)</sup>。

### 3 まとめ

筆者らは、デザインペプチドをチップ上に固定化しタンパク質を検出するマイクロアレイを開発した。さらにタンパク質と認識させた時に得られる蛍光強度をパターン化するフィンガープリント法を発明した。タンパク質と比べて分子量の小さいペプチドのアフィニティは低いと考えられ、微小なチップ上で行うタンパク質認識には用いることができないという考えが一般的であったが、当該手法を用いることにより、ペプチドによるチップ開発への道が拓かれたと確信している。筆者らのコンセプトの大きな利点は次の点である。

ペプチドを位置特異的に基板上に固定化が可能である。有効な固定化量を任意に調節可能である。

ペプチドの自由なデザインが可能である。ペプチドはタンパク質よりも低分子でデザインしやすく合成法が確立されている。

研究ターゲットに応じたカスタムメイドのチップの製作が容易となる。

任意の位置に任意の標識や機能性分子団を結合できる。これによって検出デザインにフレキシビリティがもたらされる。

リコンビナント DNA とは異なり、糖鎖や脂質、あるいは分子間の距離を調節した化合物、環状化合物、非天然アミノ酸や微量検出用標識分子など、自由に組込むことが可能である。

ペプチドの固相合成はコンビナトリアルケミストリーのルーツであり、ライブラリー構築法が確立されている。

安定品質のチップの工業生産が可能である。

抗体タンパク質チップとは異なり、固定化するライブラリーの種類数は遙かに少なく、マスキングに適している。

相互認識は可逆的であることを考えると、一つのチップで数回の測定も不可能ではない。すなわち、繰返しの使用が可能である。(5回再使用できれば1回分の価格は1枚のチップの5分の1であるから価格競争力が高い)

筆者らのタンパク質チップ実用化の研究では、合成ペプチドをアレイとするため工業的な生産に有利であり、大量生産に適している。したがって製造原価的に優位である。またアレイそのものの保管に対しても、遮光で十分安定性が維持できると推定され、抗体などを固定化したチップと比べて扱いも容易である。

しかしながら現在、当該プロジェクトにはなお、多くのサイエンス上、技術上の困難な諸問題が山積みとなっている。すでに開発した技術に磨きをかけ、さらに改良して、データマイニングが可能となるようなチップの産出を目指したい。たとえば、タンパク質混合物の検出法も含め、ペプチドフィンガープリント法に最適の応用例についても開発中である。

### 謝辞

本研究の一部は平成 12～14 年度文部科学省「産学連携イノベーション創出事業費補助金」の支援を得た。

### 文 献

1. 軒原清史, 三原久和, タンパク質・核酸・酵素, **47**, 626 (2002)
2. 軒原清史, 高分子学会誌, **43**, 611 (1994)
3. 軒原清史, 有機合成化学協会誌, **52**, 347-358, 1994.
4. K. Nokihara, S. Yamamoto, C. Toda, and J. Wang, *Peptide Science 2001*, ed. H. Aoyagi, The Japanese Peptide Society, **2002**, 61.
5. <http://www.hipep.jp>, (HiPep-CadenzaC18)
6. M. Takahashi, K. Nokihara, and H. Mihara, *Chemistry and Biology*, **10**, 53 (2003)
7. K. Usui, M. Takahashi, K. Nokihara, and H. Mihara, *Molecular Diversity*, in press
8. K. Usui, T. Ojima, M. Takahashi, K. Nokihara, and H. Mihara, *Biopolymers*, **76**, 129 (2004)
9. K. Nokihara, T. Ohyama, K. Usui, K. Yonemura, M. Takahashi, and H. Mihara, *Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Chemical Libraries 2004*, ed: Epton, R., Mayflower Scientific, UK, in press
10. K. Nokihara, S. Shimizu, R. Pipkorn, T. Yasuhara, and T. Shioda, ed. Shioiri, T., *Peptide Science 2000*, The Japanese Peptide Society, **2001**, 13
11. J.A. Cox, M. Comte, J.E. Fitton, and W.F. DeGrado, *J. Biol. Chem.*, **260**, 2527 (1985)
12. S. Ono, M. Umezaki, N. Tojo, S. Hashimoto, H. Taniyama, T. Kaneko, T. Fujii, H. Morita, C. Shimasaki, I. Yamazaki, T. Yoshimura, and T. Kato, *J. Biochem.*, **129**, 783 (2000)

Received June 8, 2004; Accepted July 26, 2004 高分子論文集

This paper is the reproduction of Kobunshi Ronbunshu Vol 61, No 10, pp. 523-532 (Oct. 2004)