

ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを利用した 生体分子間相互作用解析

九州大学大学院工学研究院応用化学部門 野島 高彦

nojimtcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

<http://www.takenaka.cstm.kyushu-u.ac.jp/>

はじめに

生体分子間相互作用の解析ツールとして、蛋白質やペプチドを搭載した生体分子チップの開発が、基礎生命科学分野から創薬分野に至るまでの様々な領域で求められている。しかし、急速に実用化レベルに達した DNA チップと比較して、ペプチドや蛋白質実験対象とするチップに関しては、開発の余地が大きく残されている。その理由の一つとして、化学的バリエーションに富むペプチドや蛋白質の固定化方法が確立していないことが挙げられる。本稿においてはこの課題を解決するために筆者らが開発している、(1) 一本鎖 DNA(ssDNA)を固定した金チップ、(2) ssDNA とペプチドとが共有結合した「ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート(POC)」、そして(3) 新しい概念のマスク剤「アクリジン化ポリエチレングリコール(APEG)」から構成されるペプチド-蛋白質間相互作用検出法について紹介したい。

このシステムの概略図を図 1 に示した。(A) 5'-末端チオール修飾 ssDNA を金基板表面上に固定した後にメルカプトヘキサノールでマスクングを施し、(B) この DNA と相補的配列を持つ POC を二重鎖形成させる。続いて (C) APEG のアクリジン部位を DNA に結合させ、DNA 鎖間がエチレングリコールのネットワークで覆われるようなマスクングを施し、(D) ターゲットとなる蛋白質の相互作用を観察する。このようなシステムが実現可能であるかどうかを検証するため、性質のよくわかったペプチド-蛋白質相互作用系をモデルとして選び、実証実験を行った。

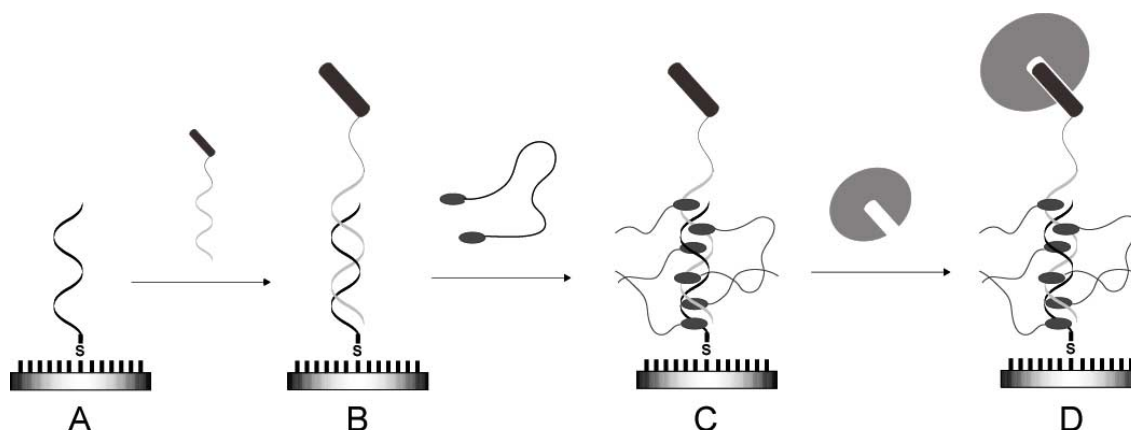


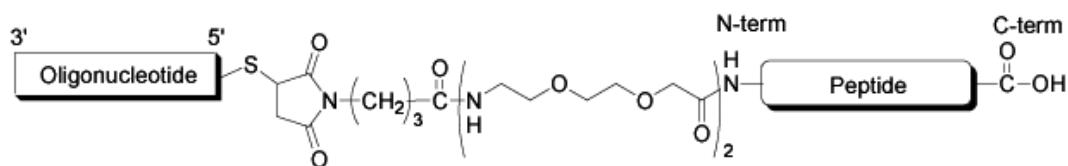
図 1. ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート(POC)を利用したペプチドチップの概略。(A) 一本鎖 DNA(ssDNA)を金基板表面に固定しておき、(B) ここに POC を二重鎖形成させ、(C) APEG によるマスクングを施し非特異的吸着を抑える。これにより (D) 目的蛋白質との特異的相互作用が達成される。

1. POC によるペプチドチップの作製

実証実験においてはリボヌクレアーゼ A (RNase A) に由来する 2 種類のポリペプチド鎖間相互作用を用いた。RNase A を蛋白質加水分解酵素サブチリシンで処理すると、20 残基の短鎖ペプチド (S-peptide) と 104 残基の蛋白質 (S-protein) とに分解されるⁱ。両者は会合することによって RNase 活性を復活させることが知られている。そこで本実験においては、S-peptide をペプチド部位に持つ POC を保持したペプチドチップの作製と、このチップ上における S-peptide-S-protein 相互作用を検討した。

本実験で用いた POC 及び APEG の構造を図 2 に示す。POC 合成には、ペプチド部位と核酸部位とを別々に調製した後に両者を結合する手法を用いたⁱⁱ。ペプチド部位となる 19 mer の S-peptide は、FastMoc 法に基づく手法ⁱⁱⁱにより調製した。ここで、N-末端を活性化しておくことにより、5'-アミノアルキル修飾オリゴヌクレオチド (24 残基, 5'-HS-(CH₂)₆-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') との共有結合が可能な状態としておいた。両者を二官能性架橋試薬で連結し、HPLC により精製した。HPLC で単一ピークを示すことを確認した後、MALDI TOF-MS により分子量をチェックした。APEG はアミノ基を両末端に持つ PEG (M_w=4000) から合成したものであり、平均重合度は 90, 100 mM の NaCl 存在下、二重鎖 DNA に対する結合定数は $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, 座位数 $n=9$ であることを別途確認してある。^{iv}

A



Oligonucleotide : (5')-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT (24 mer)

Peptide : H-KETAAAKFERQHMDSSSTA-OH (19 mer)

B

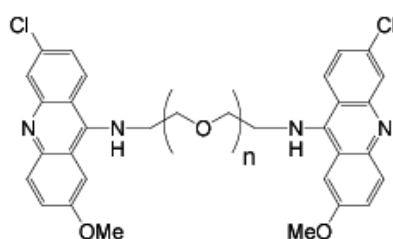


図 2. 本研究で用いた化合物の化学構造式。

(A) ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート(POC)と (B) APEG.

固体基板における POC 固定化に関して詳細な知見を得るために、水晶発振子(QCM)用チップ^vを用いた検討を行った(図 3)。まず、QCM チップの金コート表面(2.5 mmφ, 4.9 mm²)を硫酸-過酸化水素水で洗浄、および水洗した後、5'-SH 修飾 ssDNA(POC と相補的配列)水溶液をディップし、一晚室温放置することによって ssDNA 修飾チップとし、さらにメルカプトヘキサノールによるマスキングを施した。このチップに対して生理的条件下水溶液中で POC を滴下し(図 3A) 二重鎖形成の様子をチップ上の重量変化として QCM でモニタした(Affinix Q^{vi},

Initium, Inc.) . 続いてここに APEG を滴下して行ったところ(図 3A) , APEG 滴下量に応じて振動数変化が観測された . これが POC 二重鎖との相互作用に基づく重量変化であり , 金表面に対する非特異的吸着でないことは , 図 3B に示したとおり DNA 非存在下において QCM センサグラムに変化が見られないことからわかる .

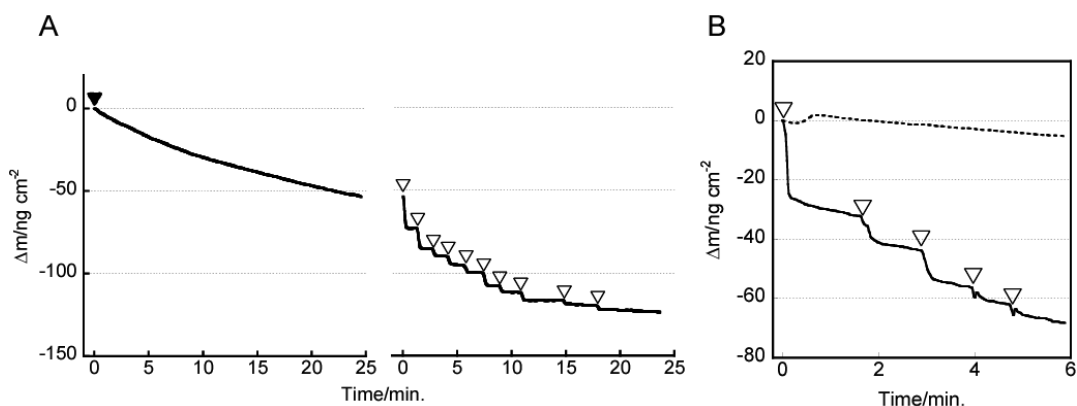


図 3. QCM を用いた APEG マスキング形成の観測 . (A) ssDNA が固定された金チップに POC を与えて()二重鎖形成させた後 , APEG を滴下して行った() . 振動数減少が生じたことから APEG が相互作用して行ったことが判る . (B) DNA が存在しない金チップ(メルカプトヘキサノールによるマスキングが施されている)に APEG を滴下しても有意な振動数変化は認められない(破線)が , ssDNA が固定された金チップには APEG が結合する(実線) .

2. POC を用いたペプチド-蛋白質相互作用検出

このようにして構築されたチップ上においては , 見かけ上 PEG のランダムなネットワークの上に S-peptide が呈示された状態となっていることが予想される . この場合 , ここに S-peptide と無関係な蛋白質を与えても PEG ネットワークが金表面への非特異的吸着を阻止してくれることが期待される . 一方 , S-protein を与えた際に , 特異的な S-peptide-S-protein 相互作用が生じ , これに基づく QCM センサグラム応答が得られるはずである . そこで我々は等電点の大きく異なる 2 種類の蛋白質 , 牛血清アルブミン (BSA)(pI=4.7) とリボヌクレアーゼ A (RNase A)(pI=9.3) を用いて特異性を検証した .

APEG によるマスキングを施さなかった場合 , BSA は非特異的に POC 固定化チップに相互

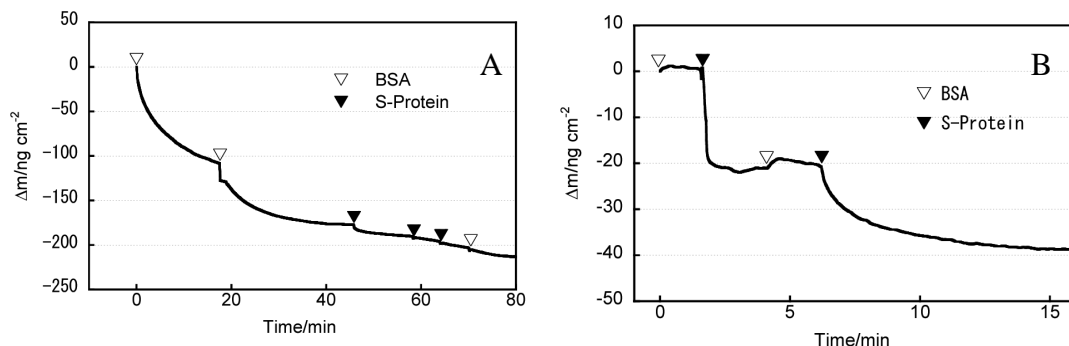


図 4. ペプチド-蛋白質相互作用における APEG マスキングの効果 . (A) APEG マスキングを施さなかった場合 , BSA を滴下すると()非特異的相互作用が生じ , 後から目的蛋白質 S-protein を滴下しても()相互作用が妨害されるが (B) APEG マスキングを施した場合は BSA 滴下に伴う()振動数変化は認められず S-protein を加えた際()に特異的に相互作用が観測された .

作用し、QCM 振動数変化を与えた(図 4A)。この場合、BSA 滴下後に S-protein を与えても十分なセンサグラム応答が得られなかった。これは BSA による非特異的な相互作用が、S-peptide-S-protein 相互作用を著しく阻害したためと考えられる。一方、POC 固定化 QCM チップを APEG で十分にマスキングしておいた場合には、BSA 滴下に伴う振動数変化は認められなかったが、その後に S-protein を与えた場合には振動数の減少がみられた(図 4B)。このことから、APEG によるマスキングが、POC チップに対する BSA の非特異的吸着を効率よく防いだことが判る。なお、同様の操作を RNase A を用いて行った際にも図 4B と同様の結果が得られることを確認している(data not shown)。以上の結果から、APEG マスキング法がチップ上における生体分子間相互作用に適したマスキング法であることが示された。

おわりに

先行する技術 DNA チップの場合と異なり、ペプチドや蛋白質をターゲットとした生体分子チップには開発の余地が大きく残されています。今後も生命現象の解明と応用に資する分析技術の実現を目指して行きたいと思っています。^{vii}

本稿で紹介した研究は、九州大学大学院工学研究院応用化学部門助教授・竹中繁織博士の研究グループで行われたものです。関係者の皆様にお礼申し上げます。

参考文献

- i) R. T. Raines, *Chem. Rev.*, **98**, 1045-1065 (1998).
- ii) N. J. Ede, G. W. Tregear and J. Haralambidis, *Bioconjugate Chem.*, **5**, 373 (1994).
- iii) K. Ohtsuka, R. Kajiki, M. Waki, T. Nojima and S. Takenaka, *Analyst*, **129**, 888-889 (2004).
- iv) K. Ohtsuka, K. Uemura, T. Nojima, M. Waki and S. Takenaka, in preparation.
- v) S. Fukusho, H. Furusawa and Y. Okahata, *Chem. Commun.*, **2002**, 88-89 (2002).
- vi) http://www.initium2000.com/affinix_q.html
- vii) 野島 高彦, 大塚 圭一, 脇 道典, 竹中 繁織, 「水素結合を利用したサーフェースエンジニアリング」, ソフトマテリアルの新展開, シーエムシー出版, 印刷中。