

タンパクアレイを指向した新規タンパク固定化センサを用いるタンパク機能評価システム

●村田 正治¹⁾ ◆片山 佳樹²⁾

1) 九州大学大学院医学研究院ナノバイオメディスン講座 2) 九州大学大学院工学研究院応化分子

〈研究の目的と進め方〉

本研究では電気化学検出法を用いたタンパク質固定化センサを開発し、それらを集積化した新しいプロテインチップの実現を目指している。ゲノム解析により多くのタンパクをコードする遺伝子が解明されつつあるが、今後は未知のタンパクの機能や変異が生命システムに及ぼす影響を迅速かつ簡便に評価することが必要になる。また新規薬物のスクリーニングにおいても、薬物-標的タンパク質間の相互作用を高速解析する手段が必要とされている。このためには多くのタンパクを基板上に固定化し、一度に評価できるシステムが望ましい。この時、タンパクの種類によらず、その機能を変性させることなく簡便に基板上に固定化できることが重要な課題となる。

そこで本研究では、標的タンパク質に付加したアミノ酸タグを利用して種々のタンパクを金電極上に固定化し、その機能を電気化学的に評価するシステムを確立する。すでにチオールを介して金属錯体を金電極上に修飾できる修飾剤を開発しており、これを用いてヒスチジンタグを融合したタンパク質を金属イオンとの錯形成を介して金電極に固定化する。モデルとして核内受容体、抗体などのタンパク質を用い、リガンド分子、DNA、あるいはタンパク質の存在下における機能発現を、マーカーイオンを用いるイオンチャンネルメカニズムや電気化学プローブを用いて評価する。

〈研究開始時の研究計画〉

- ・核内転写因子として、ヒトダイオキシンレセプター (hAhR) およびヒト甲状腺ホルモンレセプター (hTR) 固定化電極の作製を目指す。このために各クローンの作製と大腸菌からの大量発現を行う。
- ・リガンド結合によって誘起される転写複合体を検出するシステムの開発を行う。hER-LBD固定化電極をモデルとし、そのコアクチベーターであるSRC-1共存下において17 β -エストラジオールを添加することによって電極表面上において複合体を形成させる。これをサイクリックボルタンメトリー、もしくは水晶振動子法によって高感度検出することを目指す。また固定化タンパク質とその応答配列を有するDNAとの結合解析を行う。
- ・本年度内に作製する、hER-LBD、hAhR、そしてhTR固定化電極の集積化を目指す。マルチチャンネル型電気化学アナライザーとの連結により、同時検出を行う。この新しいシステムを使って、環境中に存在する膨大な化学物質の中から新しい内分泌攪乱物質の探索を行う。
- ・新たに、電極表面上へ抗体を固定化した電極を作製する。これにより血液中の標的物質の高感度・高速検出を達成し、臨床診断への展開を目指す。
- ・核内転写因子として、ヒトレチノイドXレセプター (hRXR) 固定化電極の作製を目指す。このためにクローンの作製と大腸菌からの大量発現を行う。
- ・これまでに作製した、レセプター固定化電極の集積化

を目指す。マルチチャンネル型電気化学アナライザーとの連携により、複数のレセプターに関する同時検出を行う。この新しいシステムを使って、網羅的リガンドスクリーニングを行う。

- ・リガンド結合によって誘起される転写複合体を検出するシステムの開発を行う。hTR-LBD固定化電極をモデルとし、そのコアクチベーターであるp300共存下において甲状腺ホルモンを添加することによって電極表面上において複合体を形成させる。これをサイクリックボルタンメトリー、もしくは水晶振動子法によって高感度検出することを目指す。また固定化タンパク質とその応答配列を有するDNAとの結合解析を行う。
- ・マイクロフローポンプとフローセルを用いることによって、システム全体を流れ分析系に発展させる。これによって繰り返し測定の実現性を向上させ、同時にシステムのHigh-throughput化を図る。
- ・新たに、電極表面上へ抗体 (抗CRP抗体) を固定化した電極を作製する。これにより血液中の標的物質の高感度・高速検出を達成し、臨床診断への展開も視野に入れる。

〈研究期間の成果〉

1 遺伝子組み換えによる核内レセプターの大量発現^{1,2)}
電極上に固定化する核内レセプターは全て遺伝子組み換え操作により大腸菌から発現した。一例としてhAhRの遺伝子クローニングおよび発現例を下記に記した。子宮頸がん細胞 (Hela) から得たcDNAライブラリーをテンプレートとして、AhRのリガンド結合ドメイン (102～446アミノ酸残基) をPCR法により増幅した (プライマーの塩基配列CGGCCGAAGCACCACCACCACCACAGAGCACAAATTTCAGAGAA, GCGGCCGCTAGAGTGGATGTGGTAGC, 下線はEagIとNotIの認識部位)。これをT-ベクターに挿入した後、さらにpGEX-5Xへサブクローニングし、発現用ベクターpGEXhAhR¹⁰²⁻⁴⁴⁶を得た。このpGEXhAhR¹⁰²⁻⁴⁴⁶を大腸菌株BL21 (DE3)pLysSへ形質転換し、抗生物質 (200 mg/ml アンピシリン、34 mg/ml クロラムフェニコール) を含むLB培地に接種した。37℃で振とう培養を続け、OD600が0.6になった時点で1mMイソプロピルアクリルアミド (IPTG) を添加、AhRの発現を誘導した。培養温度を27℃に下げ、そのまま5時間培養を続けた。

発現終了後、4℃で遠心分離によって大腸菌を回収した後、バッファーを加えて凍結融解を行った。200Wで45秒間超音波照射し、可溶性分画に含まれる組み換えAhRをHitrap™ chelating カラム (Amersham Pharmacia Biotech) によってアフィニティー精製した。これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、組み換えAhR (68kDa) がほぼシングルバンドで精製されていることが確認された。なお培養液1lあたりの発現量は1.0mgであった。

2 電極表面へのタンパク質固定化^{3,4,9)}

本研究では電極表面へのタンパク質の固定化法として、

新たにHis-Tag法を開発した。これは担体上に固定化したニトリロトリ酢酸誘導体 (NTA誘導体) を遷移金属イオン (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} など) と錯体形成させ、次にフリーの配位サイトへヒスチジン残基からなるタグ (His-Tag) を有するタンパク質を固定化する方法である。この鍵となる固定化剤、3,3'-Dithiobis [N-(5-amino-5-carboxypentyl)propionamide-N',N'-diacetic acid] dihydrochlorideを新たに設計・合成し、金電極表面上への組み換え核内レセプターの固定化に用いた。実験操作は以下の通りである。金ディスク電極(電極面積 0.08cm^2)をアルミナ研磨剤で十分に研磨した。これを 0.1M 硫酸で電解研磨を行い、さらに超音波照射下、脱イオン水で洗浄後、窒素ガスで乾燥させた。この電極を 1mM NTA溶液に 4°C で10分間浸漬した。つづいて 0.1M 硫酸ニッケル溶液に 5°C で10分間浸漬した。さらにHis-Tagタンパク質溶液に 5°C で10分間浸漬し、レセプターを金電極に固定化した。NTAの固定化は、測定溶液(各 5mM $\text{K}_3/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 100mM KCl , 10mM Tris-HCl (pH 7.4))中でサイクリックボルタメトリー (CV) 測定し、レドックスマーカ由来の酸化還元電流を観察することで確認した。

3 電気化学測定による固定化タンパク質の機能評価

タンパク質の機能評価は、本研究において開発した電気化学検出システムによって行った。レセプター固定化電極を測定溶液 (50mM HEPES-KOH (pH 7.5), 5mM フェロシアン/フェリシアンカリウム, 100mM KCl) 10ml 中に浸せきし、これにリガンド分子を含む溶液を適宜滴下した。5分間攪拌した後、その電気化学応答変化をCV測定により観察した。なお全ての電気化学的測定は、BAS ALS411ポテンシオスタットを用い、参照電極に Ag/AgCl (飽和 KCl)、対極に白金ワイヤー、作用極に金ディスク電極を用いた3極構成とし、 25°C で測定した。

図1にダイオキシシンレセプター固定化電極による多環芳香族炭化水素 β -ナフトフラボンに対する電気化学的応答を示した。その結果、添加した β -ナフトフラボンの濃度依存的にピーク電流値の減少が観察された。対照的にAhR未修飾電極や β -ナフトフラボンと結合しないER固定化電極ではそのサイクリックボルタモグラムに優位の変化は見られなかった。これらの結果より、観察されたピーク電流値の変化は、電極表面上に固定化されたAhRとそのリガンド分子である β -ナフトフラボンとの特異的な相互作用に基づくことが示唆された。10)

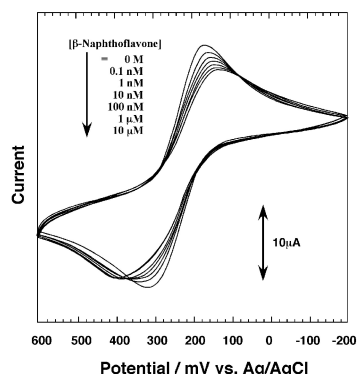


図1 AhR固定化電極による β -ナフトフラボンに対する電気化学的応答

4 核内レセプター固定化電極によるリガンドスクリーニング

我々の生活環境中には、天然由来の化学物質に加え、

医薬品、農薬、産業用化学物質、食品添加物など様々な人工合成化学物質が存在する。これまで我々はこれらの化学物質を有効に活用し、それらの恩恵に浴してきたが、その一部に健康を脅かすものの存在が明らかとなってきた。そこで本研究では、核内レセプターを標的とすることが知られる内分泌攪乱物質に着目し、レセプター固定化電極によるそのスクリーニング法開発を目指した。

実験項にしたがって、ER、AhR、TR、そしてRXRの4種の核内レセプター固定化素子を作製し、これらの電極を使ってそれぞれのリガンド分子の検出を行った (図2~4)。縦軸の Δip はピーク電流値の変化量を示している。この結果、ER固定化電極は 17β -エストラジオールに対して最も感度よく応答し、 10^{-10} to 10^{-7}M の濃度領域において線形応答を示した。この検出感度はRI標識リガンドを用いた競合アッセイ法など他のスクリーニング法と同等であった。また内分泌攪乱作用が疑われるビスフェノールAやジブチルフタレートは、エストロゲンアンタゴニストであるICI 182,780や合成エストロゲンDESと同程度の結合活性を示したが、p-ノニルフェノールは男性ホルモンであるテストステロンと同様に高濃度でしか応答を示さなかった。これらの化合物とは対照的に、コントロールとして使用したDMSOに対して有意の応答を示さなかった。^{6,8)}

一方、AhR固定化電極は β -ナフトフラボンや発癌性物質として知られるベンゾ[a]ピレンといった多環芳香族炭化水素に感度よく応答した。ベンゾ[a]ピレンに対する EC_{50} は 5 nM であり、酵母two-hybridシステムで得られた結果とほぼ一致した。10) またTR固定化電極も天然リガンドであるT3やT4に対して優れた応答をしめした。7) これらの結果から、核内レセプターを固定化したバイオセンシングシステムは、新しいリガンド解析法として有効であることが示された。感度はラジオアイソトープを使用したシステムに匹敵し、測定時間では従来法を大幅に短縮することが可能である。もちろんラベル化反応などの前処理も一切不要であり、化学物質の高速・高感度スクリーニングシステムとして期待できる。

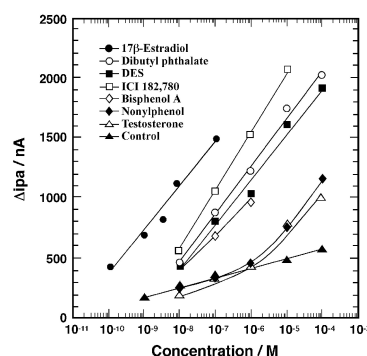


図2 ER固定化電極によるリガンド分子の検出

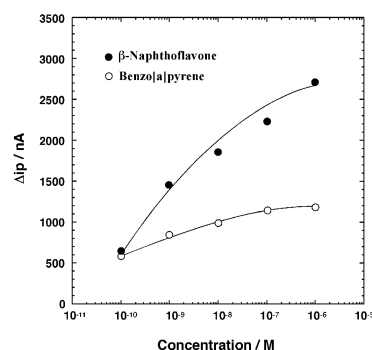


図3 AhR固定化電極による多環芳香族の検出

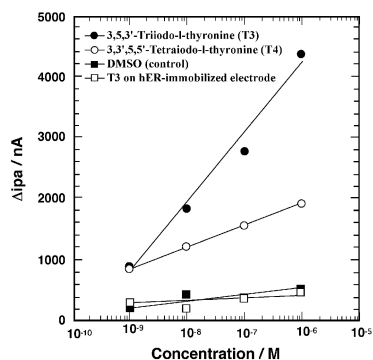


図4 TR固定化電極による甲状腺ホルモンの検出

5 マルチ電極システムによるリガンドスクリーニング

膨大な数におよぶ化学物質の健康リスクを網羅的に評価するためには、レセプター固定化素子の集積化が必要不可欠である。そこでプロトタイプとして2チャンネル電極システムを構築し、二つのレセプターに対する同時測定を行った。この結果、甲状腺ホルモンT3に対するTRおよびRXR固定化電極のCV応答を示した。この結果、T3はそのレセプターであるTR固定化電極のみで濃度依存的に検知され、一方のRXR固定化電極では全く応答がなかった。これは電極のマルチ化によってもリガンドレセプター間の特異性が維持されることを示唆している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

タンパク質の機能解析をより高速に行う技術は、医薬品開発などの分野で今後ますます重要性が高まるものと期待される。現在は二次元ゲル電気泳動と質量分析を組み合わせた手法が主であるが、解析速度の面で課題が残されておりハイスループット化には不向きである。タンパク質固定化電極による機能解析法は、スポットの切り出しやプロテアーゼによる消化などの前処理が不要であるだけでなく、測定時間自体も5分以内と極めて高速である。電気化学検出法によってタンパク質の構造変化を捉えるシステムは申請者ら独自の技術であり、将来的には電極の集積化によって従来にはない新しいタイプのプロテインチップの開発も可能である。これらの成果は以下の新聞三紙やWebニュース、海外向け技術情報誌などにも掲載された。

- ・ “環境ホルモン5分で検出することに成功” 日経産業新聞2002年9月20日
- ・ “受容体固定化センサによってタンパク質-リガンド間の相互作用を高速検出” 日刊工業新聞2002年10月2日
- ・ “細胞内受容体を使ったダイオキシンセンサ” 日本工業新聞2002年9月24日

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

流れ分析系および抗体修飾電極による臨床応用については、実験機器の不調ならびに高性能な抗体が入手できなかったために期限内に着手できなかった。

〈今後の課題〉

本研究によって開発されたりガンド解析法は小型化・キット化を実現することによってフィールドにおける環境モニタリングシステムとしても応用可能であり、環境中における動態、暴露状況を把握し、化学物質の総合的なリスクコミュニケーションに貢献したい。一方で核内レセプターは癌や心臓疾患、あるいは肥満等との関連から医学・薬学分野でも注目されており、薬物スクリーニングや臨床診断での利用も期待できる。今後は固定化タ

ンパク質の数を充実させ、さらにそれらの素子を集積化した化学物質の網羅的スクリーニングのための電気化学検出型プロテインアレイの実現を目指す。このアレイシステムはレセプターリガンド相互作用のアクセシを含む各種相互作用の研究のみならず、生体内に微量にしか存在しない物質の定量、更にはタンパク質の翻訳後修飾の研究など、医療、創薬分野における有力な手段となるものと期待している。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. M. Murata, M. Nakayama, H. Irie, K. Yakabe, K. Fukuma, Y. Katayama, and M. Maeda, "Novel Biosensor for the Rapid Measurement of Estrogen Based on a Ligand-receptor Interaction", *Analytical Sciences*, 17, 387-390(2001).
2. M. Murata, M. Nakayama, H. Irie, K. Yakabe, K. Fukuma, Y. Katayama, M. Maeda, and T. Suzutani, "Bioaffinity Sensor for Endocrine Disruptor using Receptor-modified Au Electrode", *Analytical Sciences*, 17, 1273-1275(2001).
3. T. Shibata, M. Nakayama, M. Murata, Y. Katayama, M. Maeda, "Sequence-Specific Detection of Double-Strand DNA Using An Electrode Modified with DNA Binding Protein", *Analytical Sciences*, 17, 1371-1373(2001).
4. K. Tsukagoshi, Y. Shikata, R. Nakajima, M. Murata, and M. Maeda, "Analysis of Biopolymer by Capillary Electrophoresis with Chemiluminescence Detector using Polymer Solution as Separation Medium", *Analytical Sciences*, 18, 1195-1198(2002).
5. Nobuaki Soh, Daisuke Umeno, Zhonglan Tang, Masaharu Murata, Mizuo Maeda, "Affinity Precipitation Separation of DNA Binding Protein Using Block Conjugate Composed of Poly(N-isopropylacrylamide) Grafted Double-stranded DNA and Double-stranded DNA Containing a Target Sequence", *Analytical Sciences*, 18, 1295-1299(2002).
6. 040401115 : Masaharu Murata, Chifumi Gouda, Kentaro Yano, Shinichiro Kuroki, Tatsuo Suzutani and Yoshiaki Katayama, "Piezo electric sensor for endocrine-disrupting chemicals using receptor-co-factor interaction", *Analytical Sciences*, 19, 1355-1357(2003).
7. Masaharu Murata, Kentaro Yano, Shinichiro Kuroki, Tatsuo Suzutani and Yoshiaki Katayama, "Protein-immobilized electrode for rapid and convenient sensing of thyroid hormone receptor-ligand interaction", *Analytical Sciences*, 19, 1569-1573(2003).
8. Masaharu Murata, Kentaro Yano, Kaori Fukuma, Mizuo Maeda and Yoshiaki Katayama "A high-throughput screening assay of endocrine-disrupting chemicals using a receptor-modified Au-electrode ", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 77, 525-529(2004).
9. Masaharu Murata, Wataru Kaku, Takahisa Anada, Yoshikuni Sato, Mizuo Maeda, and Yoshiaki Katayama, "Novel DNA/polymer conjugate for intelligent antisense reagent with improved nuclease resistance", *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, 13, 9697-9670(2003).
10. 0404011203 : Masaharu Murata, Hatsumi Gonda, Kentaro Yano, Shinichiro Kuoki, Tatsuo Suzutani and Yoshiaki Katayama, " An electrochemical device for the assay of the interaction between a dioxin receptor and its various ligands ", *Bioorganic Medical Chemistry Letters*,

14(1), 137-141(2004).

11. 0303271222：特願2002-257483「生理活性物質の電気化学的分析用素子およびそれを用いる分析方法」、出願人：科学技術振興事業団、発明者：村田正治、片山佳樹、出願日：平成14年9月3日

12. 0303271230：特願2003-055282「アリーールハイドロカーボン受容体固定化電極、その製造方法」、出願人：九州大学・関西電力株式会社、発明者：村田正治、片山佳樹、権田初美、錫谷達夫、宮坂 均、出願日：平成15年3月3日

13. 特願2004-064170「甲状腺ホルモン受容体固定化電極、その製造方法、及びその用途」、出願人：関西電力株式会社・九州大学、発明者：村田正治、片山佳樹、矢野健太郎、黒木慎一郎、錫谷達夫、俵田 啓、出願日：平成16年3月8日