

# 遺伝子発現産物を網羅する世界初ペプチドチップ全自動合成機の確立と病態解析

●国松己歳<sup>1) 2)</sup>

1) 名古屋市立大学大学院医学研究科 2) 現所属：名古屋女子大学大学院生活科学研究科

## 〈研究の目的と進め方〉

本研究は2001年度 統合ゲノム 公募研究 ヒト全遺伝子を網羅するペプチドチップの構築と病態解析への応用を継続した内容である。しかし研究内容は同じでも領域が異なるため再度報告致します。

本研究の目的はヒト全たんぱく質のアミノ酸配列を含むペプチドチップを化学合成したタンパク質のアミノ酸配列上に秘められた機能情報（エピトープやタンパク質間結合部位）の解読と、抗原チップや抗体チップを作製し自己免疫疾患の診断や癌免疫への応用である。

- 1) ペプチドチップ、抗原チップ、抗体チップの作製
- 2) 自己免疫疾患の自己抗原B cell エピトープ解析
- 3) 超高密度抗原チップ、抗体チップによる病態解析

## 〈研究開始時の研究計画〉 〈研究期間の成果〉

- 1) 高密度化をめざしたペプチドチップ作製機の改良<sup>9,10)</sup>
- 2) 高密度ペプチドチップ作製機用自動洗浄装置の開発と全自動合成の実現<sup>9,10)</sup>
- 3) 自己免疫疾患患者血清中の自己抗体を用いた自己抗原のクローニングと本ペプチドチップを用いた自己抗原エピトープ領域の解析と分子間認識機構の解析<sup>1,2,4,7,8)</sup>
- 4) 実用化を目指した抗体チップ作製の基本プロトコルの構築
- 5) インクジェット式抗体チップ作製の機種選定
- 6) 高純度蛍光標識抗サイトカイン抗体の作成

## 〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究の高密度ペプチドチップ自動合成機、抗体チップ作製法は国内外で他に例を見ない独創的なポストゲノム解析ツールであった。しかしその後抗体チップなどの市販品が現れた。

## 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1) ヒト全遺伝子を網羅するペプチドチップの構築には活性化アミノ酸溶液をピコリットルレベルで噴霧またはスポットして支持体上で化学反応させ固定化することが必要不可欠である。超高密度インクジェット方式の採用は耐有機溶媒、高濃度活性化アミノ酸の熱安定性と機器制御のための新規プログラム作成などクリアすべき問題点が浮かび上がった。

2) 抗体チップ作製機はピコリットル超高密度化を目指しインクジェット方式の機器でトライアルしたがスポット量の微量化と再現性に問題が残る本研究における改良機器の性能を上回るピコリットル/スポットの超微量化が実現できなかった。しかし従来のマイクロシリジタイプスポット限界を数十ナノリットル単位まで向上させることができ、研究室レベルでは再現性のある基礎データが得られた。

3) 2003年4月より大学を異動し、研究体制の再構築のために1年以上を要したが、今まで以上により研究環境になりつつある。

## 〈今後の課題〉

本研究の目標達成のためには各分野のスペシャリストの知恵が必要である。

- 1) 本研究の目的を達成するインクジェット方式分注機の選定ならびに共同開発
- 2) XYZ稼働ロボットの作動プログラム開発とヒト全遺伝子を網羅するアミノ酸配列をデータベースからペプチド合成にリンクさせるプログラム開発
- 3) 治療に結びつきやすく社会的意義の高い抗原の選定と特異抗体の作製並びに抗体チップの作製

今回開発した全自動ナノリットルペプチドチップ合成機（ナノモル/ペプチド）では1台当たり10アミノ酸からなるペプチドを8000種類作るのに1週間かかった。しかし本合成機が10台あれば8万種類、100台あれば80万種類のペプチドチップの作製が理論的に可能である。そこでヒト全遺伝子を網羅するペプチドチップの実用化にはチップの作製時間の短縮化が急務でありインクジェット方式を採用したピコリットル対応高速超高密度ペプチドチップ作製機の開発と実用化が本研究のブレイクスルーになると思われる。現在は大学の異動に伴い食品となる生物ゲノム情報を予防医学、生活習慣病予防、人工合成抗体の創製に利用するテーマへと内容をシフトさせ本研究を継続している。

## 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

- 1 国松己歳 ペプチドアレイ、ゲノム医学 メディカルレビュー社 P.87-P.89 (2005)
- 2 Ogawa Y, Sugiura K, Watanabe A, Kunimatsu M, Mishima M, Tomita Y, Muro Y. Autoantigenicity of DFS70 is restricted to the conformational epitope of C-terminal alpha-helical domain. *J. Autoimmun.* 23 : 221-231 (2004)
- 3 Kato R, Kunimatsu M, Kobayashi T, and Honda H. Angiotensin II inhibitory peptide found in the receptor sequence using peptide array. *Biochem Biophys Res Commun.* 315:22-29. (2004)
- 4 Fujii T, Kunimatsu M. Interaction of protein-bound polysaccharide (PSK) with smooth muscle myosin regulatory light chain. *Biol Pharm Bull.* 26:771-774. (2003)
- 5 Hasegawa C, Yamada T, Ohara H, Nakazawa T, Sano H, Ando H, Kunimatsu M, Ozaki Y, Takahashi S, Nomura T, Joh T, Itoh M. Taurochenodeoxycholic acid induced biphasic hepatotoxicity in isolated perfused rat liver: roles of Ca<sup>2+</sup> and calpain. *Hepatogastroenterology.* 50:972-978. (2003)
- 6 Teranishi F, Liu ZQ, Kunimatsu M, Imai K, Takeyama H, Manabe T, Sasaki M, Okamoto T. Calpain is involved in the HIV replication from the latently infected OM10.1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 303:940-946. (2003)
- 7 Sasaki, H., M. Kunimatsu., Fujii, Y., Yamakawa, Y., Fukai, I., Kiriyama, M., Nonaka, M., and Sasaki, M. Autoantibody to gravin is expressed more strongly in

younger and nonthymomatous patients with myasthenia gravis. Surg Today. 31 (11) :1036-1037. (2001)

8 Fujiwara, S., Takeo, N., Otani, Y., Parry, D. A.D., Kunimatsu, M., Lu, R., Sasaki, M., Matsuo, N., Epiplakin, a novel member of the plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen: Structure and tissue localization. J Biol Chem.276:13340-13347. (2001)

2) 特許

9 小林 猛、本多裕之、国松己歳、加藤竜司、奥野郁佳子、細胞死誘導のためのペプチドおよび医薬 特許出願 2 0 0 3 - 2 8 7 7 2 7

10 本多裕之、小林 猛、国松己歳、加藤竜司、奥野郁佳子、細胞死誘導のためのペプチド 特許出願 2 0 0 4 - 1 2 4 3 3 8