

タンパク質測定のための電気化学的ペプチド修飾 バイオセンシングシステムの開発†

菅原一晴*, 門屋利彦**, 中村建介***

1 はじめに

タンパク質のセンシングは、生命科学、臨床学、食品科学などの分野で重要視されており、多様な測定手法が提案されている。一般的な測定方法としては電気泳動法、質量分析法、磁気共鳴法などがある¹⁾。タンパク質を測定する場合、ターゲットタンパク質に対する分子間相互作用をもつ分子を用いることは有用でありそのタンパク質に選択的に結合するアプタマーやターゲットタンパク質-プローブタンパク質間の結合に基づいた手法も広く利用されている。一方で、ターゲットタンパク質と相互作用をもつペプチドをタンパク質検出プローブとしてタンパク質をセンシングするコンセプトは注目されている²⁾。ペプチドを用いる利点としては、①ターゲット分子に選択的に結合するアミノ酸残基の配列の制御がある程度できる、②多量の合成が容易でコストが抑制される、③アミノ酸残基への化学修飾が可能となる、④タンパク質に比較して化学的安定性が高いなどがあげられる³⁾。

具体的な測定方法としては、蛍光物質をペプチドと組み合わせたプローブが使われている⁴⁾。それらのプローブは、抗体、酵素、バイオマーカーの検出に応用されており、効果的な測定システムとなっている。一方で、電気化学的ペプチド修飾バイオセンシングシステムによるタンパク質の測定も進められている。例えば、電気化学的測定において用いられるフェロセンでラベル化されたペプチドによりプロテアーゼやパピイン、カスパーゼ⁵⁾などの検出がサイクリックボルタメトリーにより行われている⁶⁾。それらの検出感度も nM レベルであり迅速な測定法である。それに対してラベル自体をアミノ酸残基に置き換えることは新たな試みであり、生体に適合性の高いプローブを作製することができる。電極応答を示すアミノ酸は、チロシン、トリプトファン、システインでありこれらのアミノ酸をペプチドプローブに組み込むことでタンパク質のモニタリングを達成することが予期される⁶⁾。本論文では、チロシン残基に注目した酵素活性測定、食物アレルギーとして知られるオボアルブミンの検出法を紹介する。また、擬似糖質ペプチドを修飾した磁性ビーズを用いたガラクトース認識タンパク質の電気化学的測定について述べる。また、ターゲットタンパク質と結合するペプチドプローブを電極に固定化し金ナ

ノ粒子との競争反応に基づきそのタンパク質を測定する手法についても取り上げる。

2 ペプチドプローブを用いた電気化学的タンパク質測定に関する研究

2・1 O-GlcNAc トランスフェラーゼ活性のラベルフリー測定

O-linked N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc) 転移酵素 (OGT) は、多くの細胞プロセスやアルツハイマーや2型糖尿病のような疾病においてタンパク質機能の調節に関係しており重要な役割を果たしている。OGTの特異的抑制剤は O-GlcNAcylation の生物学的機能を調査するための有力なツールとなる。Yang らの研究グループはプロテアーゼ-保護法とシグナルレポーターであるオスミウムビビリジンによって媒介されたチロシンの電極触媒酸化を使ってペプチド O-GlcNAcylation 測定のためのラベルフリー電気化学的バイオセンサを考案している⁷⁾。測定原理は、プロテアーゼによるグリコシル化されたペプチドとグリコシル化されていないペプチドのタンパク質分解の能力から生じる電流値の差異から OGT 活性の検出が行われた。O-GlcNAcylation がなされる時、グリコシル化されたペプチドはプロテアーゼによって切断されることはなく、酸化インジウムスズ (ITO) 表面上で電極応答が観察される。一方、O-GlcNAcylation が阻害される場合には、グリコシル化されないペプチドは容易に切断されるためにそのシグナルは減少する。また、ペプチド O-GlcNAcylation 反応を OGT 阻害剤の存在下で行うことで、OGT 抑制剤をスクリーニングできることを明らかにした。

2・2 ターゲットタンパク質と選択的に結合するペプチドプローブと金ナノ粒子を利用したタンパク質センシング

Xia らは、ターゲットレセプターを測定するために電極表面に固定したペプチドプローブと金ナノ粒子 (AuNPs) とを組み合わせた電気化学的バイオセンサを設計した⁸⁾。具体的には、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) をセンシングするために hCG 結合性ペプチドが修飾され AuNPs をペプチドとの相互作用によって電極上に集積した。[Fe(CN)₆]^{3-/4-}のインピーダンス測定を実

† 原稿受理 平成30年2月28日 Received February 28, 2018

* 教職センター(Teaching Profession Center)

** 生物工学科 (Department of Biotechnology)

*** 生命情報学科(Department of Life science and Informatics)

施したところ AuNPs によって電極との電子移動が促進されることが見出された。hCG を加えると AuNPs が電極表面から取り除かれるため電荷移動抵抗が増加した。その測定結果は電極表面で hCG と hCG 結合性ペプチドを反応させ複合体を形成させた際のものとはほぼ一致していた。従って、hCG は hCG 結合性と相互作用している AuNPs を置換していることがわかる。hCG アッセイは hCG の存在あるいは非存在における電極の電子移動抵抗の変化に基づいていた。その変化量は 0.001 から 0.2 IU/mL の間で比例しており、検出限界は 0.6mIU/mL であった。

2・3 オボアルブミンの電気化学的測定のための分子認識/電子伝達性ペプチド固定化磁性ビーズ

食物アレルギーであるオボアルブミン (ovalbumin: OVA) を OVA 分子認識 (RNRCKGTDVQAW) / 電子伝達性 (YYYYC) ペプチドを固定化した磁性ビーズにより電気化学的に測定した⁹⁾。この研究の目的は、RNRCKGTDVQAWYYYYC (peptide-1) との相互作用に基づいて OVA 高選択的に磁性ビーズに濃縮し高感度な検出法を開発することであった。加えて、再生可能 OVA 測定磁気ビーズを作製し機能性を高めることであった。Peptide-1 は長さの異なる4つの架橋剤を用い磁性ビーズに導入された。N-(6-maleimidocaproyloxy)sulfosuccinimide を用いた場合、チロシン残基のキノンへの酸化反応に起因する大きな電子伝達性ペプチドの電極応答が観察された。磁性ビーズの粒径についても評価され粒径が 6.0-6.9 μm のビーズに固定化された際にその機能性を高めることができた。OVA の検出感度は 8.0×10^{-13} M であり抗体を使用しない手法として非常に優れた感度を有している。さらに、磁性ビーズの再生がタンパク質変性剤で処理することで容易に達成できる利点がある。

2.4 ガラクトース認識タンパク質センシングのための電子伝達性擬似糖質ペプチド修飾磁性ビーズの開発

我々の研究グループでは、架橋剤を介して電子伝達性擬似糖質ペプチドを修飾した磁気ビーズを構築した¹⁰⁾。幾つかのペンタ-あるいはヘキサペプチドが合成され、チロシン残基-アミノ酸残基-チロシン残基のアミノ酸配列を含んでいた。そのアミノ酸残基はアラニン、セリン、チロシンであった。このようなペプチドはチロシン残基に起因する酸化応答とガラクトース認識タンパク質認識機能を有しているためラベルを必要としないタンパク質測定電気化学的システムとなる。すなわち、ガラクトース認識タンパク質は電子伝達性擬似糖質と結合する際に、電極応答が変化し検出される。ここではモデルとしてガラクトース認識タンパク質であるダイズ由来レクチン (Soybean agglutinin: SBA) と電子伝達性擬似糖質間相互作用の結合力についてスクリーニングを行った。その結果、4つのチロシン残基と C-末端にシステイン残基から構成されるペプチドが優れた機能を示した。SBA に対する検量線は 2.5×10^{-12} から 1.0×10^{-10} M の範囲で比例関係が得られた。ピーナッツやエンドウ豆由来レクチンと比較すると糖質結合サイトの構造により SBA が選択

的に電子伝達性擬似糖質を取り込むことが分かった。ヒト血清中の SBA の回収率を測定したところ、SBA の回収率はおよそ 100% であった。したがって、提案したタンパク質測定システムは生体試料中の SBA の検出に適用できる。

3. まとめ

タンパク質検出のためのペプチドプローブは、ターゲットタンパク質に適したアミノ酸配列を考案することで選択性を高めることができる。また、磁性ビーズにペプチドを固定化するならばターゲットタンパク質のビーズ表面への濃縮が可能となり高感度なセンシング法となりうる。さらに、タンパク質変性剤により再生可能なペプチド修飾磁性ビーズも構築することができるため、生体試料や食品中のタンパク質の測定における有用なツールとなる。

参考文献

- 1) J. Hahm, Functional Polymers in Protein Detection Platforms: Optical, Electrochemical, Electrical, Mass-Sensitive, and Magnetic Biosensors, *Sensors*, **11**(3), 3327-3355 (2011).
- 2) R. Kubota et al., Protein recognition using synthetic small-molecular binders toward optical protein sensing in vitro and in live cells, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 4454-4471 (2015).
- 3) V. Mäde, et al., Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides, *Beilstein J. Org. Chem.*, **10**, 1197-1212 (2014).
- 4) Z. Wang, et al., Engineered fluorescence tags for in vivo protein labelling, *RSC Adv.*, **4**(14), 7235-7245 (2014).
- 5) S. Pavan et al., Short peptides as biosensor transducers, *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 3055-3070 (2012).
- 6) X. Tang, et al., Electrochemical determination of L-tryptophan, L-tyrosine and L-cysteine using electrospun carbon nanofibers modified electrode, *Talanta*, **80**(5), 2182-2186 (2010).
- 7) Y. Yang, et al., Label-free electrochemical biosensing of small-molecule inhibition on OGlcNAc glycosylation, *Biosens. Bioelectron.*, **95**, 94-99 (2017).
- 8) N. Xia, et al., Design of electrochemical biosensors with peptide probes as the receptors of targets and the inducers of gold nanoparticles assembly on electrode surface, *Sens. Actuators B*, **239**, 834-840 (2017).
- 9) K. Sugawara, et al., Fabrication of micromagnetic beads with molecular recognition/electron-transfer peptides for the sensing of ovalbumin, *Anal. Chim. Acta*, **958**, 30-37 (2017).
- 10) K. Sugawara, et al., Magnetic beads modified with an electron-transfer carbohydrate-mimetic peptide for sensing of a galactose-dependent protein, *Anal. Chim. Acta*, **1001**, 158-167 (2018).