

交差反応型センサアレイを用いる クルードなタンパク質溶液の評価

富田 峻介^{1*}・吉本敬太郎²

はじめに

血清や尿をはじめとする生体液や細胞溶解液などは、種々のタンパク質が混在した複雑な組成をもつ。こうした“クルード”な溶液の性質を検査することは、毒性評価や薬効評価、細胞育種、医療診断などにおける、特に初期スクリーニングの段階において重要である。クルードなタンパク質溶液を評価する場合、抗原/抗体反応により特定のタンパク質を検出する方法、あるいはクロマトグラフィーや質量分析により含有タンパク質を網羅的に検出する方法のいずれかが選択されることが多い。これらの方法は、目的とする生体の状態を定義するマーカータンパク質が明らかとなっている場合には有効である。もし生体の状態と特定のタンパク質の関係が明らかではない場合でも、クルードなタンパク質溶液の素性を簡易に決定できる汎用性の高い技術が開発されれば、より効率的な生体サンプルのスクリーニングが可能になると期待できる。

犯罪捜査や親子鑑定などで使用されるフィンガープリント法は、マーカータンパク質に頼らないクルード液評価法を開発するためのヒントを与えてくれる。たとえば、1984年に発案されたDNAフィンガープリント法は、個人に固有のDNA配列（DNA多型）を検査することで個人を識別する鑑定法である（図1A）。DNA多型が存在するため、制限酵素によってDNAから切り出した断片の組成は個人によって異なる。そのため、DNA断片の混合物を電気泳動にかけると、個人に固有のバンドパターンが生じる。バンドパターンを統計的に解析することで、個人の識別を行うことができる。この方法の特長は、DNA中の各多型の詳細は無視して、バンドパターンの形状だけを考慮して識別するという点である。こうした考え方は、内容物が不明なクルードなタンパク質溶液に対しても適用できるかもしれない。

2005年頃から、フィンガープリント法と同様の考え方に基づくタンパク質分析法として、交差反応型センサアレイ（cross-reactive sensor array）【化学鼻/舌（chemical nose/tongue）、光学センサアレイ（optical sensor array）などと呼ばれることもある】が報告されるようになってきた¹⁾。交差反応型センサアレイは、サンプル群に対して交差反応性を持つ分子のライブラリを利用することで得られる“固有の応答パターン”に基づいてサンプル

を識別する。初期の頃は、主に単一のタンパク質をターゲットとして原理実証が行われていたが、最近になって、細胞溶解液や血清といったクルードなタンパク質溶液にも適用されるようになってきた。本稿では、交差反応型センサアレイの原理やライブラリの構築法、そしてクルードなタンパク質溶液を対象とした最近の応用例を紹介する。交差反応型センサアレイは、タンパク質以外のさまざまな物質の識別にも利用されており、それらを紹介した総説も出版されているので、そちらも参考にされたい^{2,3)}。

交差反応型センサアレイ

図1Bに交差反応型センサアレイの概念図を示す。交差反応型センサアレイは二つの要素を必要とする。一つ目は、サンプル群に対して交差反応性を示す認識部位をもつ分子のライブラリ、もう一つは、分子ライブラリと

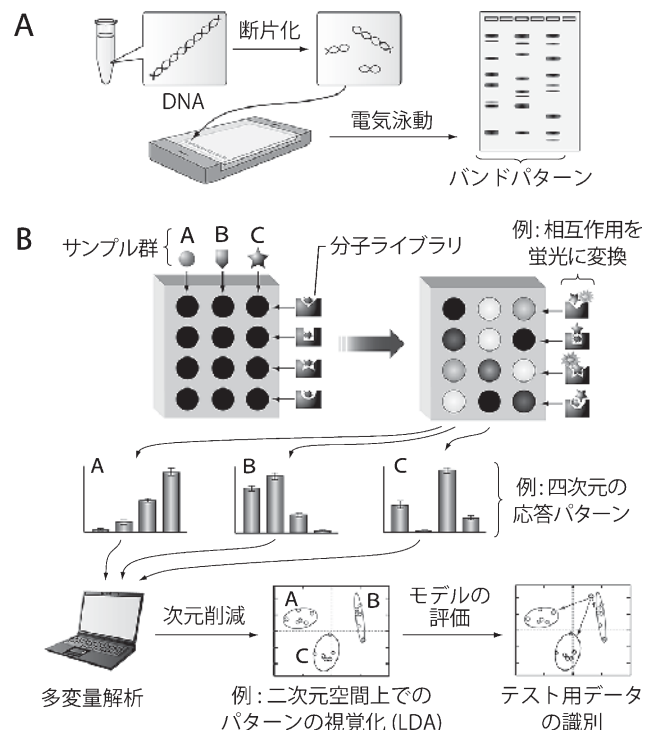


図1. (A) DNAフィンガープリント法、(B) 交差反応型センサアレイの概念図。視覚化されたデータの各点は1回ごとの測定パターンに対応する（下段中図）。図は $n=6$ の例。

*著者紹介 ¹国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門（研究員） E-mail: s.tomita@aist.go.jp
²東京大学大学院総合文化研究科（准教授） E-mail: ckeitaro@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

サンプルの間の相互作用を、検出可能な応答に変換する機能である。代表的な交差反応型センサアレイは、図1B上段に示すような、マイクロプレートに分子ライブラリの溶液を加えた形である。マイクロプレート内で分子ライブラリとサンプルを混合すると、各分子はサンプルとさまざまな親和性で相互作用し、その結果、相互作用の強弱に応じた応答パターンが出力される(図1B中段)。多変量(または多次元ともいう)で表現された応答パターンは、主成分分析(PCA)や線形判別分析(LDA)、階層的クラスター分析(HCA)などの多変量解析法によって次元削減され、パターン間の差異が2次元や3次元空間上で“視覚化”される(図1B下段)。図中で示したLDAの例では、各サンプルの分布が、空間上で重なることなくクラスター化するかどうかでセンサアレイの性能を評価できる。十分な性能が達成されたら、新たに得たテスト用サンプルのデータを、パターンに基づいて正しく識別できるかどうかを確認する(図1B下段)。

センサアレイによるタンパク質の分析

それでは、どのような指針で分子ライブラリをデザインすればよいだらうか。タンパク質センシングのための分子ライブラリ構築法の一つとして、タンパク質全般に結合しやすい分子を骨格にするアプローチがあげられる。たとえば、タンパク質は反対の電荷をもつ分子や疎水性な分子と結合しやすい。この性質に着目して、さまざまな疎水性官能基を修飾したカチオン性金ナノ粒子(AuNP)のライブラリを用いる方法が考案された(図2A)⁴⁾。金ナノ粒子とタンパク質の間の相互作用を出力するために、金ナノ粒子は前もってアニオン性の蛍光高分子(PPE-CO₂, 図2A上段)と複合体化させておく。複合体を形成すると、金ナノ粒子へのエネルギー移動のために高分子は消光する。ここにタンパク質を加えると、タンパク質と高分子の間で交換反応が起き、放出された高分子の量に応じて蛍光強度が回復する(図2A中段)。蛍光強度の変化を応答パターンとして利用することで、ウシ血清アルブミン(BSA)など7種類のタンパク質が識別された(図2A下段)。この方法はタンパク質に限らず、多糖⁵⁾やバクテリア⁶⁾といったさまざまな生体サンプルの識別にも利用されていることから、高い汎用性をもつアプローチと言えるだろう。

筆者らは、対の電荷を持つ酵素とイオン性ブロック共重合体間のポリイオン複合体(PIC)形成に伴う「酵素活性スイッチ現象」^{7,8)}を応用することで、酵素触媒反応によって検出するタイプの交差反応型センサアレイの開発を行ってきた(図2B)^{9,10)}。アニオン性酵素は、ポリエチレングリコールとポリアミンのブロック共重合体(PEG-*b*-PAMA, 図2B上段)と複合体を形成すると、変成することなく活性が失われる。酵素あるいはブロック共重合体のいずれかと親和性のあるタンパク質をさら

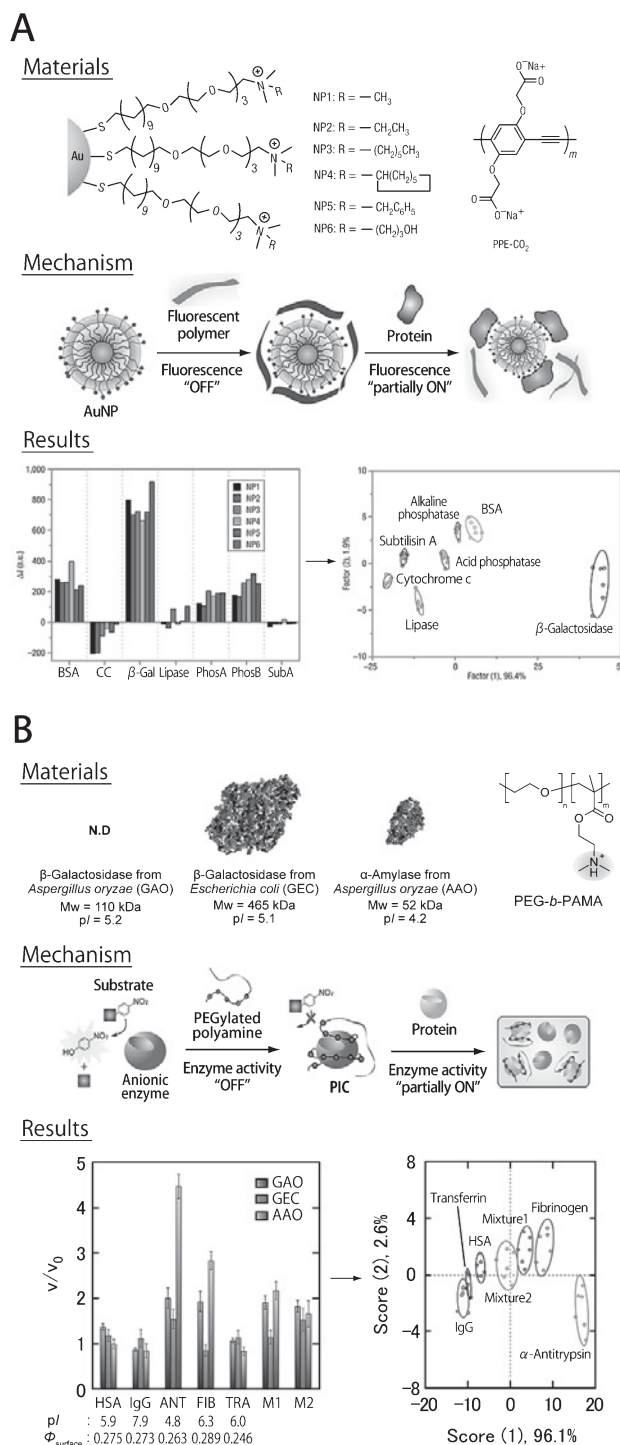


図2. タンパク質分析のための交差反応型センサアレイ例。(A) 異なる官能基を持つカチオン性金ナノ粒子とアニオン性蛍光高分子の複合体ライブラリ⁴⁾。得られた蛍光強度変化のパターン(下段左)をLDAで解析することで、パターン間の差異が2次元空間上で視覚化される(下段右)。(B) イオン性ブロック共重合体とアニオン性酵素のPICライブラリ⁹⁾。下段左図の数字は、血漿タンパク質の等電点(pI)と表面疎水度(Φ_{surface})を示す。(A)および(B)は出版社の許諾を得て、改変したうえで転載した。

に加えると、競合的な相互作用の結果、PICから酵素が遊離して酵素活性が回復する(図2B中段)。この酵素活性の変化量を応答パターンとして利用する。酵素は種類によって静電的・疎水的な官能基の表面分布や形状・サイズが大きく異なるため、複数種のアニオン性酵素を用いればPICライブラリに多様な交差反応性を付与できる。構築したセンサアレイを用いることで、性質が類似した血漿タンパク質に固有の応答パターンが得られた(図2B下段)。さらにパターンに基づいて作製した評価モデルによって、テスト用サンプルを95%の精度で識別することにも成功した⁹⁾。

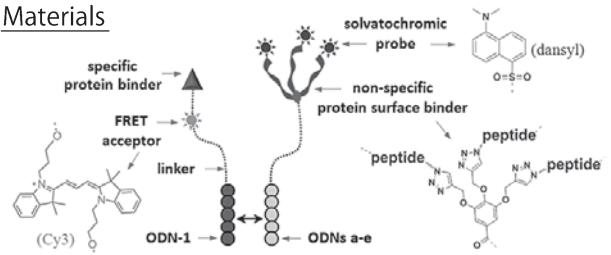
また、カチオン性ブロック共重合体側に多様な官能基を修飾することでも交差反応性を生み出すことが可能である。このアプローチによって構築したPICライブラリを用いることで、配列の70%以上が同一のアルブミンホモログでも識別可能なことを示した¹⁰⁾。現在では、基質や酵素を工夫することで、サブナノモル濃度の希薄なタンパク質溶液の識別も可能になってきている。

タンパク質全般との親和性を軸に作った上述の分子ライブラリは、サンプル中のあらゆるタンパク質と相互作用しうる。一方、サンプル中のターゲットタンパク質が明らかであり、その変化だけに基いてサンプルを識別したいという場合に有効と考えられるアプローチとして、タンパク質に対して特異的に結合する分子を骨格にする方法が報告されている。たとえば、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)のアイソザイム群に対して親和性を有するペプチドを利用する方法がある(図3)¹¹⁾。この方法では、GSTに対して特異性を示すペプチドと非特異的に相互作用するペプチドの2種類を二重鎖DNA(ODNs)によってつなぎ合わせた会合体がライブラリとして用いられている(図3上段)。各ペプチドがGSTに結合すると、双方の鎖に修飾した蛍光分子の間で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こり、蛍光スペクトルが変化する(図3中段)。このような特異性を導入した材料設計のために、得られるアイソザイムの応答パターンは、他のタンパク質を混在させてもほとんど影響を受けない。つまり、他成分の影響を受けずにGSTのアイソザイムを識別できる(図3下段)。別のグループにより、特異性を持つペプチドを利用することで、キナーゼのアイソザイムの判別も可能なことが示されている¹²⁾。

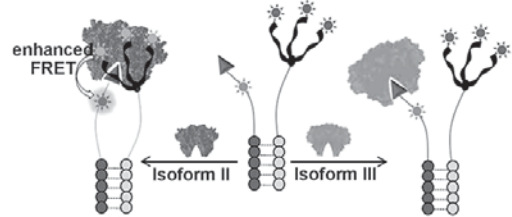
センサアレイによるクルードなタンパク質溶液の分析

これまでに紹介した例は、一定濃度のタンパク質を緩衝液に加えたサンプルを分析対象としていた。交差反応型センサアレイを用いれば、素性の明らかでないタンパク質が混在しているようなサンプルであっても、分子ライブラリと溶液成分間の相互作用の総和としての応答を得ることができる。したがって、交差反応型センサアレイは、クルードなタンパク質溶液でも識別できる可能性

Materials



Mechanism



Results

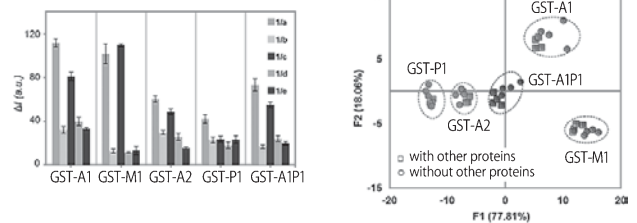


図3. GST特異的ペプチドを認識部位として持つ分子ライブラリ¹¹⁾。アイソザイムに対する特異性のために、他のタンパク質が混在していても同じ場所にクラスターができる(下段右図)。出版社の許諾を得て、改変したうえで転載した。

がある。このコンセプトを確かめるために、まず一定濃度の異なるタンパク質を加えた血清や尿の識別が試みられた(図4A)^{13,14)}。2012年頃になると、状態の異なる生体から採取した、完全に天然のクルード溶液の識別にも、交差反応型センサアレイが応用されるようになってきた。

たとえば、金ナノ粒子を用いる手法を開発した前述のグループは、蛍光高分子の代わりにGFPを金ナノ粒子と複合体化したライブラリにより、細胞溶解液の識別を実現している(図4B)¹⁵⁾。はじめに、マウスから採取した健常組織やがん組織を溶解し、一定タンパク質濃度になるように希釈したサンプルを金ナノ粒子/GFPライブラリと混合した。得られた蛍光強度変化のパターンを利用することで、由来する組織の特定だけでなく、それらが腫瘍化しているかどうかまで明らかにすることに成功した。その他にも、タンパク質を取り込んだ金ナノクラスターのライブラリでヒト血清を分析することにより、肝臓がんと貧血症の患者の診断が可能なることも報告されている(図4C)¹⁶⁾。

最近、筆者らも、前述したPICライブラリを用いるアプローチによって細胞培養液を分析することで、非侵襲的かつマーカー分子を必要としない幹細胞の分化評価法の開発を行った(投稿中)。培養中の細胞はさまざまな

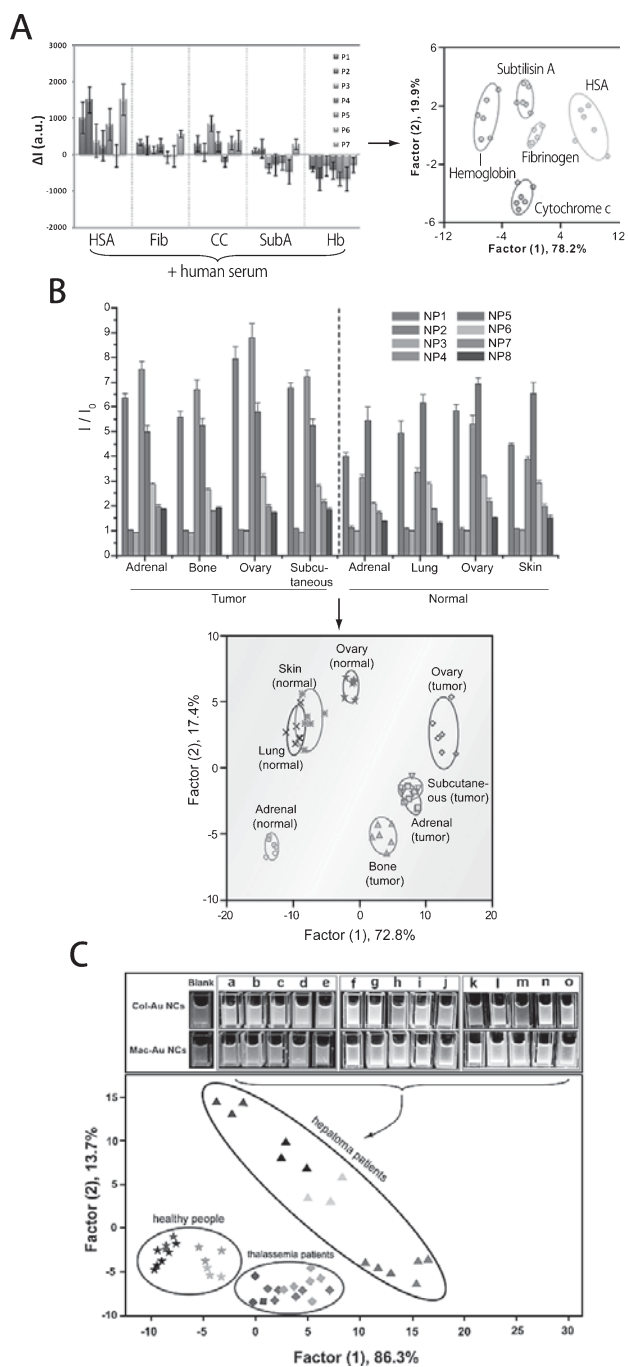


図4. クルードなタンパク質溶液の分析例。(A) 蛍光ラベル化DNA/酸化グラフェン複合体ライブラリによる血清の識別¹⁴⁾。5 μ Mタンパク質を加えた血清をサンプルとしている。(B) 金ナノ粒子/GFP複合体ライブラリによる細胞溶解液の識別¹⁵⁾。空間上の対角線を境に腫瘍化組織と健常組織が分かれている(下段)。(C) タンパク質を取り込んだ金ナノクラスターライブラリによる血清の識別¹⁶⁾。得られた蛍光強度のパターン(上段)から、血清を採取した患者の病態を同定できる(下段)。(A)–(C)は出版社の許諾を得て、改変したうえで転載した。

生体分子(特にタンパク質)を分泌するが、その組成は細胞の種類や状態に固有であることが知られている。そのため、交差反応型センサアレイによって培養液の組成

の違いを認識できれば、染色や細胞の溶解が必要な従来法では不可能な、非侵襲的な細胞評価を行うことが可能になる。このような仮説に基づいて、筆者らはヒト間葉系幹細胞の分化系譜を、マーカー分子に関する情報に頼ることなく同定することに成功している。

おわりに

交差反応性を持つ分子ライブラリで構成される交差反応型センサアレイを用いることで、クルードなタンパク質溶液の識別ができることを紹介した。交差反応型センサアレイの特長は、マーカー分子に関する情報がなくてもよい点に加え、特異的な抗体や特別な装置を使うことなく、クルードの状態のままで生体の状態やサンプルの種類を簡易に調べることができるという点があげられる。今回、紹介した例は、サンプルを“識別する”という定性的な評価法に限ったが、最近になってサポートベクターマシンなどのパターン認識法を利用することで、定量的なタンパク質の評価も実現されてきている¹⁷⁾。研究を進めるなかで十分な特異性が得られずにお蔵入りしている分子でも、それらを組み合わせる、あるいは骨組にしたライブラリを作れば、交差反応型センサアレイとして再利用できるかもしれない。交差反応型センサアレイを用いたタンパク質分析の分野は、まだ少数の研究グループが応用の可能性を模索している段階である。今後、生物工学者を含む幅広い分野の研究者の参入によって、さまざまな角度から材料・応用例が提案されるようになれば幸いである。

文 献

- 1) Wright, A. T. and Anslyn, E. V.: *Chem. Soc. Rev.*, **35**, 14 (2006).
- 2) Anzenbacher, Jr., P. et al.: *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 3954 (2010).
- 3) Askim, J. R. et al.: *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 8649 (2013).
- 4) You, C. C. et al.: *Nat. Nanotechnol.*, **2**, 318 (2007).
- 5) Elci, S. G. et al.: *Chem. Sci.*, **4**, 2076 (2013).
- 6) Phillips, R. L. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 2590 (2008).
- 7) Tomita, S. et al.: *Soft Matter*, **6**, 5320 (2010).
- 8) Kurinomaru, T. et al.: *Langmuir*, **28**, 4334 (2012).
- 9) Tomita, S. and Yoshimoto, K.: *Chem. Commun.*, **49**, 10430 (2013).
- 10) Tomita, S. et al.: *Analyst*, **139**, 6100 (2014).
- 11) Motiei, L. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 9289 (2014).
- 12) Zamora-Olivares, D. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14814 (2013).
- 13) De, M. et al.: *Nat. Chem.*, **1**, 461 (2009).
- 14) Pei, H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13843 (2012).
- 15) Rana, S. et al.: *ACS Nano*, **6**, 8233 (2012).
- 16) Xu, S. et al.: *Anal. Chem.*, **86**, 11634 (2014).
- 17) Zamora-Olivares, D. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 14064 (2014).