

# ペプチドを用いたバイointerフェイアの構築

大河内美奈

生体の有する高次機能を分子レベルで計測し、これを応用展開していくため、生体を構成する基本単位である細胞に焦点をあてた単一細胞レベルや分子レベルでの機能解析法の開発が注目されている。微細加工技術を利用した半導体デバイスやmicro electro mechanical systems (MEMS), micro total analysis system ( $\mu$ TAS) を利用したマイクロ・ナノデバイスが開発される一方、培養細胞のマイクロパターンング技術が構築され、制御された細胞微小環境における細胞解析や機能発現などに関する研究が進められている<sup>1-3)</sup>。たとえば、心筋細胞や神経細胞を1細胞レベルでパターンングしてネットワーク形成をさせると、電気的にも共役することが計測され、個々の細胞における電気シグナル形成およびその伝達過程の追跡が可能となっている。また、パターン細胞培養技術を利用した薬剤スクリーニング系やがん細胞の浸潤評価系の構築など、動物代替となるバイオアッセイデバイスの開発も進められており、再生医療分野への展開も含めて重要な研究分野となっている。しかし、デバイス材料は基本的に無機材料から構成されており、特にナノ粒子、ナノワイヤー、ナノシートなど比界面積の大きいナノ構造体を活用したナノバイオデバイスの開発においては、材料の表面物性に合わせた界面形成が重要な検討項目となる。生体や細胞が有する多様な機能を計測するバイオデバイス開発において、細胞や生体分子を認識するバイオ界面の設計は重要であり、ナノ材料や電極との界面の精緻な設計が必須である。

ペプチドは化学合成や化学修飾が容易であり、材料表面への修飾や特定の材料界面への自己組織化が可能である他、保存安定性にも優れることから、標的分子の認識やセンシングにおいて有用な材料である。生体分子のみならず金属材料などに対してもペプチドは、その構成されるアミノ酸の特性により選択特異的に標的物質に対する親和性を発揮することから、これらを連結した融合ペプチドを作製することで、バイオデバイスの無機材料センサ素子と標的細胞や生体分子をつなぐ界面形成分子として利用できる。本稿では、on chip spot 合成によるペプチドアレイを利用して探索したペプチドによるバイオ界面の構築について述べる。

## 材料結合ペプチド

生物がナノレベルで緻密な構造形成を行うバイオミネラルリゼーションは、ペプチドをはじめとする有機材料をテンプレートとした無機材料の構造形態制御に関する研究に応用されている。すでに、さまざまな金属、金属酸化物、半導体、磁性体などの無機材料に結合するペプチドがバイオミネラルリゼーション関連タンパク質の解析やファージディスプレイの表面提示法などを利用して取得されており、これらを利用したナノ材料創製も進められている。しかし、ファージディスプレイ法においては高結合配列が取得できるが、なぜその配列が親和性を発揮するのか、結合モチーフについての情報を得にくい。そこで、セルロース膜上に任意に設計した多数のペプチド配列をアレイ状に合成する on chip spot 合成法に基づいたペプチドアレイを用いた探索法について検討した。

代表的な電極材料である金に結合するペプチドを探索した。既報の金結合性ペプチド<sup>4-8)</sup>のアミノ酸の出現頻度を基にペプチドアレイを作製し、金ナノ粒子との結合試験を行った。高結合性を示すペプチドのアミノ酸出現頻度を解析し、これらを優先的に出現させるランダムライブラリーをペプチドアレイ上に再合成する手法を3回繰り返すことにより、多数の優れた金結合性を示すペプチドが得られた(図1)。高い結合性を示した3配列をペプチドアレイ合成し、金ナノ粒子およびAuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>溶液に浸漬したところ、これらの配列は金結合性と金イオン還元能を示し、ペプチド配列の断片化ライブラリーによる解析により、金結合や金イオン還元モチーフを特定することができた<sup>9)</sup>。

この他、表面プラズモン共鳴効果の高い銀ナノ粒子結合ペプチド<sup>10)</sup>やワイドギャップ半導体であるZnO結合ペプチド<sup>11,12)</sup>などの探索を行っており、これらの材料結合ペプチドと細胞などの標的分子に対する融合ペプチドを作製することで、特定の材料に標的分子を結合できることが示唆されている。

以上、ペプチドアレイを用いた探索は、金属など多様な無機材料に対して適用可能であり、これらのペプチドを用いることで緻密に制御されたナノ粒子の合成・配置

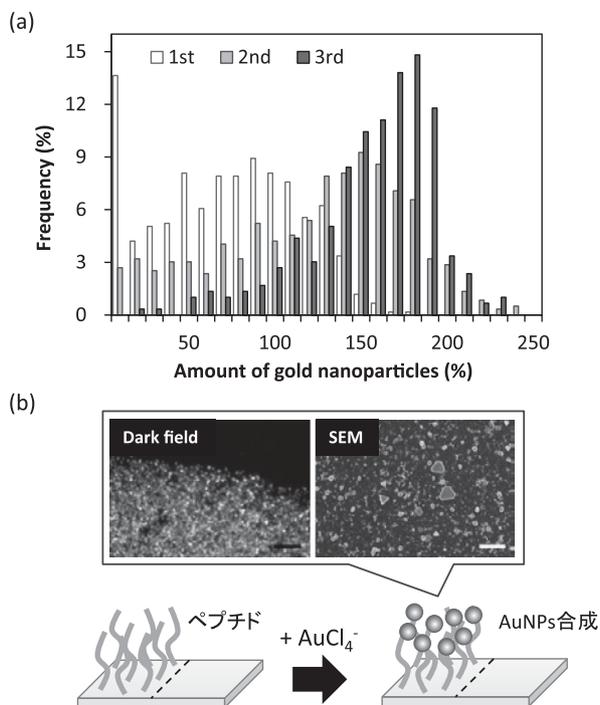


図1. ペプチドアレイを用いた金結合ペプチドの探索. (a) 高結合ペプチドのアミノ酸出現頻度に基づいたアレイ作製と解析 (GBP1<sup>11</sup>の結合強度を100%とした), (b) ペプチド修飾面での金ナノ粒子合成.

および特定の材料表面での分子修飾が可能となると期待される.

### 細胞結合ペプチド

ペプチドアレイ上に微生物や動物細胞を添加し、ペプチドと細胞を直接相互作用させるアッセイ法を構築した. 微生物結合ペプチドについては、動物細胞における微生物認識受容体であるToll様受容体 (TLR) に着目し、そのアミノ酸配列に基づいたペプチドアレイを作製することで、細菌に対して結合性をもつペプチド配列を探索した. TLR2由来8残基ペプチドライブラリーからは、グラム陽性細菌であるプロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GGを用いた探索により、高結合性を示す8残基ペプチドが得られた. また、本ペプチドを合成したガラス基板上では、乳酸菌の固定化培養が可能であることが示された. この他、TLR4およびTLR5由来のペプチド配列からリポ多糖やべん毛に対して高結合性を示すペプチドなどが探索されており、細菌と相互作用するペプチドが得られている.

本アッセイ系を用いて細胞接着ペプチドも多数探索されている<sup>13-15</sup>. 効率よく細胞接着を誘導するマテリアルの構築は、細胞ターゲティングや培養用スキャフォールド

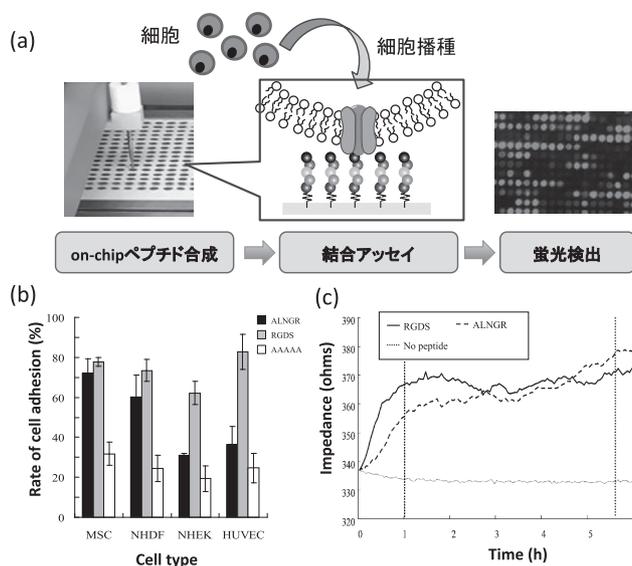


図2. 細胞選択的な接着ペプチドの探索と解析. (a) ペプチドアレイによる細胞接着ペプチドの探索, (b) 各細胞での結合評価, (c) ECIS測定<sup>10</sup>.

として再生医療分野や機能性材料分野で注目されている. 間葉系幹細胞に接着するペプチドを探索し、これらのペプチドを修飾した電極を用いることにより、細胞接着後の伸展などの細胞動態をインピーダンス法 (electrical cell substrate impedance sensing, ECIS) により解析した. 探索されたALNGRペプチドは、ECIS測定での立ち上がりの遅れからわかるように、RGDSペプチドと比較して細胞伸展は遅いものの細胞接着ペプチドとして機能した (図2). この他、探索した接着ペプチドの修飾基板を用いて細胞形態を観察したところ、ペプチドにより細胞形態や分化誘導効果が異なることが示された. 以上のことから、接着ペプチドを利用して細胞動態を制御できる可能性が示唆された.

ペプチドアレイを用いた細胞への刺激誘導として、アレルギー反応を誘導する分岐鎖エピトープペプチドアレイの設計についても検討した. 即時型アレルギー反応においては、高親和性IgE受容体を有するマスト細胞や好塩基球細胞にIgE抗体が結合し、そのIgE抗体が多価抗原を認識することにより、受容体が架橋し脱顆粒反応を惹起する. 個々の患者において脱顆粒を引き起こすエピトープの組合せを検出するため、on chip spot合成法を利用して2種類の保護基が修飾されるリジン残基Fmoc-Lys(ivDde)-OHを用いて2種類のエピトープを合成し、ペプチドアレイ上で好塩基球と直接反応させることで脱顆粒反応を行った. 卵白アルブミン (OVA) ペプチドライブラリーおよびジニトロフェニル基 (DNP) をエ

ピトープとする分岐鎖ペプチドアレイを合成し、抗OVA-IgEおよび抗DNP-IgEモノクローナル抗体を感作させたラット由来好塩基球（RBL-2H3細胞株）の脱顆粒割合を調べた。その結果、OVAエピトープとDNP-グリシンの二つのエピトープを固定化した分岐鎖ペプチドアレイにおいて大きく脱顆粒割合が上昇した。これより、二つのエピトープを有する自然抗原を模倣した系において、脱顆粒を誘導できることが示された<sup>16)</sup>。分岐鎖ペプチドアレイを用いた反応は、個々の患者におけるアレルギー反応を惹起するエピトープの組合せを探索する上で有用であり、このようなアッセイ系を基に細胞膜受容体-リガンドを標的とした界面分子の構築が可能であることが示唆された。

## 文 献

- 1) Okochi, M. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **42**, 300 (2013).
- 2) Yamamoto, S. *et al.*: *PloS One*, **9**, e103502 (2014).
- 3) Okochi, M. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.* DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.013
- 4) Brown, S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **15**, 269 (1997).
- 5) Slocik, J. M. *et al.*: *Small*, **1**, 1048 (2005).
- 6) Hnilova, M. *et al.*: *Langmuir*, **24**, 12440 (2008).
- 7) Kim, J. *et al.*: *Acta Biomater.*, **6**, 2681 (2010).
- 8) Peelle, B. R. *et al.*: *Langmuir*, **21**, 6929 (2005).
- 9) Tanaka, M. *et al.*: *Acta Biomater.*, DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.037
- 10) Kuboyama, M. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **66**, 73 (2012).
- 11) Okochi, M. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **106**, 845 (2010).
- 12) Okochi, M. *et al.*: *Acta Biomater.*, **6**, 2301 (2010).
- 13) Kato, R. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 485 (2006).
- 14) Okochi, M. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 85 (2008).
- 15) Kaga, C. *et al.*: *Biotechniques*, **44**, 393 (2008).
- 16) Sugiura, H. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **87**, 8 (2014).