

プログラム名：革新的研究開発推進プログラム(ImPACT)

PM名：宮田令子

プロジェクト名：InSECT (進化を越える極微量物質の超迅速多項目センシングシステム)

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成28年度

研究開発課題名：

インセクトデバイスにおける分子認識ペプチドプローブ設計

研究開発機関名：

国立大学法人東京工業大学

研究開発責任者

大河内 美奈

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

様々な有害・危険物質に対する小型センシングシステムを開発するため、平成 28 年度では、前年度までに取得した有害細菌・ウイルス、有害低分子を標的とするリード配列の結合性及び選択性を評価し、その向上を図るとともに、センシング・濃縮デバイス界面での機能性の評価を中心に研究開発を進める。また、標的とする対象物質を広げて分子認識ペプチドの設計・探索を進めることにより、センサデバイスの適用拡大を図る。

課題(1) 細菌・ウイルス標的化ペプチドの探索

標的細菌・ウイルスに対して親和性を示すリードペプチドの探索、リードペプチドの改変および定量的な親和性評価による選抜を行った。また、候補ペプチドを利用したセンシング界面を構築し、対象分子の検出に向けた配列最適化に向けた検討を実施した。

課題(2) 有害低分子標的化ペプチド

爆薬の代表的な原料であり爆発物の分子マーカーとして知られるトリニトロトルエン (TNT) に加え、ジニトロトルエン(DNT)、トリメチレントリニトロアミン(RDX)に着目し、各爆発性化合物に対する抗体の抗原認識配列を解析し、リードペプチドの取得を計画した。さらに、TNT 結合ペプチドについては、TNT 誘導体との結合性に加え、TNT 分子との結合性を評価することを計画した。

課題(3) 都市大気粉塵内に含まれる金属粒子、金属酸化物粒子に対する標的化ペプチド探索

都市大気粉塵に対して結合性を示すペプチドの探索を計画した。さらに、都市大気粉塵の成分分析ガイドラインに金属成分の実施が推奨されていることから、都市大気粉塵に含まれる金属成分の選択的な濃縮や検出に向け、都市大気粉塵結合性ペプチドに結合する都市大気粉塵の金属成分分析を各候補ペプチドについて評価することを計画した。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

InSECT デバイスに用いるペプチド分子認識プローブを開発するため、各対象に対するスクリーニング系の最適化を図り、課題(1)～(3)において設定した各対象分子を認識する候補ペプチドプローブを探索・設計を進めた。

課題(1) 細菌・ウイルス標的化ペプチドの探索

前年度までに得られた微生物認識ペプチドを利用し、ポアセンサを利用した微生物センシングに関する検討を進めた。また、ウイルスを特異的に認識する抗体の抗原認識配列をリード配列としたウイルス認識ペプチドの探索を進めた。

課題(2) 有害低分子標的化ペプチド

爆薬 TNT、DNT 及び RDX に着目し、共同研究機関が開発した各爆薬抗体を産生するハイブリドーマ細胞を用いた遺伝子解析により、抗体の認識領域を解析した。また、得られた配列情報に基づいてペプチドアレイを設計し、残基置換などによる配列の改変を行うことで高親和性のペプチドを取得した。特に TNT については、TNT 誘導体を利用して得られた候補ペプチドについて、TNT 分子との結合性を確認した。

課題(3) 都市大気粉塵内に含まれる金属粒子、金属酸化物粒子に対する標的化ペプチド探索

ファージディスプレイ法を利用することで都市大気粉塵結合性ペプチドの探索を実施した。候補ペプチド配列を取得後、各配列が結合する都市大気粉塵の金属成分分析を ICP-MS を用いて実施した。

2-2 成果

課題(1) 細菌・ウイルス標的化ペプチドの探索

細菌表層に局在するリポ多糖を認識する Toll 様受容体 4 から取得した細菌結合性ペプチドをナノ構造体に修飾することで、微生物を濃縮できることが示された。またこれまでに得られている細菌結合性ペプチドをセンサデバイスに修飾することにより、細菌種に応じて検出シグナル変化が見られることを示した。

課題(2) 有害低分子標的化ペプチド

TNTに加えて、DNT、RDX を認識する抗体の可変領域部位のアミノ酸配列を基に各爆薬認識ペプチドの探索を行った。これまで TNT 誘導体を利用した結合アッセイにより、候補ペプチドを選出してきた。そこで、この TNT 結合性候補ペプチドに対して、表面プラズモン共鳴を利用した結合解析を実施することで、TNT 分子との結合性を評価した。

課題(3) 都市大気粉塵内に含まれる金属粒子、金属酸化物粒子に対する標的化ペプチド探索

ファージディスプレイ法を利用することで、都市大気粉塵結合性ペプチドを 4 配列 (FHPRLQQDHWLH, WQDFGAVRSTRS, AGYPLSENFYYP, GLHTSATNLYLH) 取得した。また、これらの配列に結合される都市大気粉塵の金属成分を評価したところ、亜鉛や銅などの含有量が配列によって変化しており、金属成分に対して多様な結合特性を有する都市大気粉塵結合性ペプチドを取得できた。

2-3 新たな課題など

本年度までに取得した様々な微生物・ウイルス、低分子化合物、都市大気粉塵に対する標的化ペプチドをナノ構造体やセンサデバイスに修飾して利用する際に、立体障害の問題や適切な結合親和性を発現させるために、リンカーの選択や修飾密度などを検討する必要性が明らかになりつつある。次年度以降は、標的化ペプチドの親和性、特異性向上に向けた配列の改変とともに、目的に応じた修飾条件の検討や配列の最適化を実施する。

3. アウトリーチ活動報告

日本ペプチド学会主催の「2016 ペプチド夏の勉強会」、日本化学会東海支部主催の「三重地区講演会」、化学工学会主催の「化学工学会中国四国地区コロキウム」、東京工業大学における「物質理工学院第 2 回学院横断物質科学研究会」、バイオチップコンソーシアム主催の「第 97 回ワーキンググループ講演会」、KAIST-Tokyo Tech Bio Joint Workshop, “Frontier of peptide/protein-based science and engineering” において一部、本プログラムの紹介及び研究成果について紹介した。