

平成27年 3月31日

プログラム名：進化を超える極微量物質の超迅速多項目センシングシステム  
PM名：宮田令子

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 ( 成 果 )

平成26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

## 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

生活環境における多様な有害・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、有害細菌・ウイルス、有害低分子およびPM2.5に含まれる金属粒子を検出対象として、ペプチドを用いた分子認識プローブを開発し、センシングシステムにおける対象分子の捕捉・濃縮および検出に用いることを目標とする。当該年度は、次年度終了時にセンシングシステムを開発する共同研究機関に分子標的化ペプチドを1つ提供するという目標の前段階として、各対象に対するスクリーニング系の最適化を図り、候補ペプチドの選定を進める。

#### 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タンパク質および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計画した。具体的には、生体の免疫防御機構に着目し、Toll様受容体などの微生物認識受容体のアミノ酸配列をもとに微生物認識ペプチドを探索する。

#### 課題(2) 有害低分子標的化ペプチド

標的有害低分子に対して親和性を示すタンパク質およびリードペプチドの探索を行う。

#### 課題(3) PM2.5 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

標的金属粒子に対して親和性を示すタンパク質およびリードペプチドの探索を計画した。具体的には、PM2.5には含有されないがナノデバイスなどの電極材料として利用される金(Au)に着目し、金属材料を認識するペプチドの探索を進めることで、金属粒子認識ペプチドの探索法を確立する。

### 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

微生物認識受容体としてToll様受容体に着目し、2種類の受容体のアミノ酸配列を基にペプチドライブラリーを設計し、複数の微生物認識ペプチドを同定した。これらの候補ペプチド配列を基に残基置換などにより配列を改変し、より高親和性のペプチドを探索した。

#### 課題(2) 有害低分子標的化ペプチド

気相に存在する有害低分子に着目し、当該認識抗体の可変領域を解析するため、その抗体産生細胞を段階的に馴化培養を行うことで抗体産生を誘導した後に核酸抽出し、認識領域を解析するプライマー配列を調査・選定した。

#### 課題(3) PM2.5 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

ナノデバイスにおける電極材料として幅広く用いられるAuに着目し、金属材料に結合能を示すペプチドを探索した。ペプチドスポット合成法を利用して、任意のアミノ酸出現頻度でペプチドアレイを合成後、材料親和性評価を行うことで高結合性ペプチドを探索でき、金属粒子認識ペプチドの探索法を確立できた。

## 2-2 成果

### 課題(1) 細菌・ウイルス標的化ペプチドの探索

Toll 様受容体に着目し、そのアミノ酸配列を基に約 700 種類のペプチドライブラリーをアレイ上に合成し大腸菌を用いた結合試験を行った。その結果、図 1 に示すように、非結合ペプチドと比較し大腸菌の結合領域を 3 つ同定した。これらのペプチドの残基置換より、塩基性アミノ酸のアラニン置換で結合性が大きく低下することから、静電的相互作用が細菌との結合において重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、残基置換により結合強度の上昇も確認され、これらを細菌の標的化ペプチドとして利用できると示唆された。

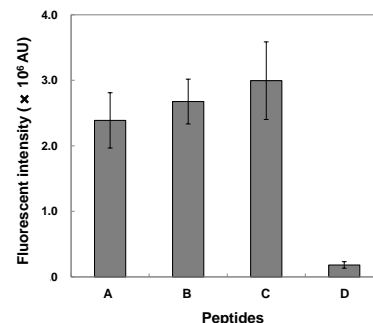


図 1 Toll 様受容体より探索したペプチドの微生物結合評価 (SYTO9 により大腸菌を蛍光染色)  
A-C: 探索ペプチド、D: 非結合ペプチド

### 課題(2) 有害低分子標的化ペプチド

気相に存在する有害低分子に対する抗体の当該物質に対する認識領域を解析するため、抗体産生細胞を馴化培養後に Total RNA 抽出したところ、約 40  $\mu\text{g}$  ( $10^7$  cells) が回収された。その結果、精製度の指標である  $A_{260}/A_{230}$  及び  $A_{260}/A_{280}$  は、2.5 及び 1.6 であった。次に 5'-RACE 法により可変領域部位の増幅を行った結果、重鎖及び軽鎖の増幅が確認された。

### 課題(3) PM2.5 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

ペプチドスポット合成法を利用して、任意のアミノ酸出現頻度で 1800 種類のペプチドをアレイ上に合成し、作成した Au ナノ粒子との結合評価により高結合性ペプチドを探索した。得られたペプチド配列は、既知の Au 認識ペプチドと比較して高い結合活性を示したことから、本探索法は有用であり金属粒子及び金属酸化物粒子の標的化ペプチドの探索法として利用できると示唆された。

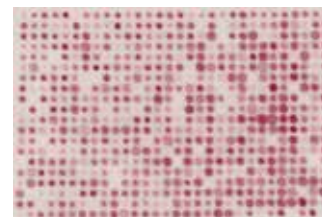


図 2 ペプチドアレイを用いた金ナノ粒子高結合ペプチドの探索

## 2-3 新たな課題など

課題(1)の細菌・ウイルス標的化ペプチド探索については、得られたペプチドの細菌結合特性の評価及びデバイスへの実装化による有効性評価が課題である。課題(2)の有害低分子結合性ペプチドの探索においては、得られた 5'-RACE により得られた増幅断片の遺伝子解析を実施し、得られた配列から有害低分子結合ペプチドを設計する。課題(3)については、本年度に構築したペプチド探索法を用いて実際に PM2.5 に含まれる金属粒子及び金属酸化物粒子の標的化ペプチドを探索する。

## 3. アウトリーチ活動報告

化学工学会男女共同参画委員会主催で開催された女性技術者ネットワークシンポジウムにて講演を行った他、日本生物工学会東日本支部会コロキウム世話人として企画・運営を行った。また、スーパーグローバル大学創成支援の一環として Georgia Institute of Technology, University of California, Berkeley に訪学し、カリキュラム構成、学生派遣並びに大学間の共同研究の活発化について意見交換した。この他、ワシントン大学 Sarikaya 教授の講演会にて、ペプチドによる分子認識に関する意見交換を行った。