

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

プロジェクト名：

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成29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

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、平成29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親和性及び選択性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

有害細菌やインフルエンザ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) 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

PM2.5 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、PM2.5 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、PM2.5 に含まれる金属成分の選択的な濃縮や検出に向け、PM2.5 結合性ペプチドに結合する PM2.5 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

これ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) 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

ファージディスプレイ法を利用することで PM2.5 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 PM2.5 の金属成分分析を ICP-MS を用いて実施した。また、候補ペプチドがもつアミノ酸の出現頻度を参考に配列の最適化を図ることで、PM2.5 に高親和性の配列を取得するとともに、金属成分を多く含む PM2.5 に高親和性を示す配列を取得した。

## 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 から取得した細菌及びリポ多糖結合性ペプチド(GRHIFWRR)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 Toll 様受容体 5 から取得した細菌の鞭毛結合性ペプチド(FLLRVPHL)をセンサデバイスに修飾することにより、鞭毛をもつ細菌に対して特徴的なシグナルを取得し、1 細菌から検出できることが示された。

### 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 分子に対して高い親和性をもつ配列の取得に成功した。

### 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

ファージディスプレイ法を利用することで、PM2.5 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 PM2.5 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 PM2.5 結合性ペプチド(HHLHWPHHHSYT、NHVNTNY YPTLH など)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、PM2.5 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、適切な結合親和性を発現させるために、リンカーの選択やペプチドの修飾密度や構造制御などを検討する必要性が明らかになりつつある。最終年度は、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

糧食研究会における研究報告会、東京工業大学で開催したオープンキャンパスにおいて、第 3 類で実施した模擬講義において高校生に研究紹介を行った他、研究室公開にて一部、本プログラムの紹介及び研究成果について紹介した。