

## 総説

### バイオセンシング素子としてのコンビナトリアルペプチドの応用

#### – Review – Application of combinatorial peptides for biosensor device

森田 資隆<sup>1)</sup>

Yasutaka MORITA

#### Abstract:

Phage display peptide library is based on a combinatorial library of random peptide fused to a minor coat protein of the filamentous M13 phage. Phage display creates a physical linkage between a displayed selectable function and the DNA encoding that function. This allows rapid identification of peptide ligands for a variety of target molecules by an in vitro selection process. Phage display is an effective technique for isolation of the peptides and proteins, that can bind to a specific molecule. In the selection of a phage, not only purified proteins immobilized on an article surface or intact cells, but also chemical molecules or a surface have been used as the target. This approach makes it possible to use chemicals in physiological condition as the target, so that phage display is suitable for the development of peptides that bind to a molecular antigen. The peptide isolated from a phage display library could conjugate with a particular dye, which makes it applicable to identification and isolation of specific chemicals.

To the best of our knowledge, this report is the first attempt to develop a peptide, that can recognize fullerene (C60). Features of peptide isolation from a phage display library are discussed in the following sessions. Furthermore, the peptide that sense the one of the dioxin, 2,3,7-trichlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7-TCDD), or the peptide from phage display peptide library, one of combinatorial technology, could bind to the undifferentiated P19 cells were isolated and characterized.

キーワード：バイオセンシング素子、バイオセンサー、コンビナトリアルペプチド、フラーレン、ダイオキシン、幹細胞

Keywords : biosensor device, biosensor, combinatorial peptide, fullerene, dioxin, stem cell

#### 1. はじめに

生体を持つ優れた分子認識機構を利用、もしくは模倣した化学センサーであるバイオセンサーは、基本的に分子認識素子と各種トランスデューサーから構成される。DNAチップを例に挙げれば、分子認識材料がターゲット遺伝子と相補配列を有するDNA分子、トランスデューサーとしては、蛍光標識分子を捉えるための蛍光測定器が用いられる。したがって、バイオセンサー機能の進化を行う上で、新たな分子認識材料、およびトランスデューサーの設計、創成がキーテクノロジーになると考えられる。そして、新しい分子認識材料を創成する方法としては、新たな天然酵素の探索、遺伝子工学的改変、

天然材料と人工材料のハイブリット化、人工材料のみによる設計などが挙げられる。

本稿では、こうしたバイオセンサーのための分子認識材料の設計、創成法に関して、最近注目されているペプチドの分子認識能に着目したバイオセンサーとしての試みを中心に解説する。

#### 2. 分子認識材料としてのペプチド

生体中のさまざまな反応には、生体を構成する分子間の特異的親和性によって起こるものが数多く存在する。その中でも、特に生体分子間の特異的親和性を示す相互作用の代表的なものは、レセプターとアクセプター反応

1) 近畿大学産業理工学部准教授 morita@fuk.kindai.ac.jp

や抗原抗体反応である。そのいずれの反応でも重要な要因は、20種類のアミノ酸の組み合わせがもたらす無限な立体構造とアミノ酸による静電的相互作用、水素結合、疎水的相互作用などがあり、それらが多種多様に相互作用し、特異的親和性を作り出している。こうした分子認識能を持つ抗体は、特異的に微量な抗原を認識するために、生体中の微量生理活性物質、環境有害物質などの検出に利用されている。しかし、抗体は一般に大量に作製するには、膨大な費用と労力を必要としている。また、活性の維持が難しく、すぐに失活してしまうという性質もある。この欠点を補うツールとして、現在注目されているのは、抗体の抗原認識部位をモチーフにしたペプチドを用いることである。ペプチドは、抗体と比べて安定性が高く、作製が容易、費用が安いなどの長所がある。また、抗体の代わりにペプチドで反応を行い、分子認識能があったという報告例が多数あり、ポルフィリン<sup>1)</sup>などの化合物や酵素としてのグルコースオキシダーゼ<sup>2)</sup>、単離・精製されたタンパク質<sup>3)</sup>、癌細胞<sup>4)</sup>やグリタ細胞<sup>5)</sup>、ストローマ細胞<sup>6)</sup>などに対する細胞マーカーに対して結合するペプチドも見つかっている。また、生体関連物質以外の物質を認識する研究も行われており、ファージが提示したペプチドが金属であるGa/As表面を特異的に認識したという報告<sup>7)</sup>などもある。このような例からも分かる通り、分子認識材料としてのペプチドは、バイオセンサー素子として用いられる一つ的手段として、地位を確立したと言っても過言ではない。

こうした様々な分子認識材料としてのペプチドが開発されている背景には、コンビナトリアルケミストリーやファージディスプレイ法、SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)法、リボソームディスプレイ法、細胞表面ディスプレイ法などのコンビナトリアル・バイオエンジニアリング<sup>8)</sup>などの技術革新があったことは、言うまでもない。これらは、多数の混合された化合物の集合体(ライブラリー)から有用なものを見つけていくという方法論であり、天然物から有用な物質を見つけるアプローチとも類似しており、ある生体情報や構造と機能の相関などの情報を基に化合物の基本構造をデザインし、実際に合成した大多数の化合物ライブラリーの構造活性を基にして、最適な化合物を選択するという点が優れている。このようにして合成した多数の化合物ライブラリーは、迅速にその有効性を評価する必要があり、如何に早く処理をするかが重要となってくる。したがって、高効率機能評価法、つまり、ハイスループットスクリーニング (High Throughput Screening : HTS) をどのように行うかが問題となる。このように、コンビナトリアルケミストリーとHTSによる最適化合物

の探索は、如何にライブラリーを大きくし、如何に迅速なHTSのシステムを構築するかに掛かっており、そのためには広範囲な技術分野間のネットワークを駆使することが重要となる。こうして、近年、コンビナトリアルに合成されたペプチド、つまり『コンビナトリアルペプチド』を用いたバイオセンシングが、バイオや医療分野などのライフサイエンス分野に大いに利用されつつある。このコンビナトリアルペプチドのライブラリーの作製には、上述したコンビナトリアルケミストリーやファージディスプレイ法、SELEX法、リボソームディスプレイ法、細胞表面ディスプレイ法などがあり、使用する実験系によって研究により選択されている。

### 3. フラーレンの分子認識への応用

炭素同素体であるフラーレン (C60) が発見されて以来、その物理的、化学的性質からさまざまな研究が進められている。最近では生物学的な研究にも広がり、医薬品やバイオセンサーへの応用が期待されている。フラーレンは、光照射により活性酸素を生じる性質があり、DNA配列や塩基選択的にDNAを切断する効果<sup>9)</sup>、神経変性疾患の原因の一つであるヒドロキシルラジカルの生成を抑える効果<sup>10)</sup>、光線力学療法としてのガン細胞やウイルス増殖を抑える効果<sup>11)</sup>などがある。また、フラーレンの特異的な球形、大きさ、疎水性の性質を利用したエイズの治療法の応用として、HIVプロテアーゼの活性部位に結合する効果<sup>12)</sup>、さらには、グルコースオキシダーゼセンサーにおけるメディエーター<sup>13)</sup>としての役割やアンモニア、アルデヒド等の臭気物質センサーにおける電気素子<sup>14)</sup>など、様々な利用の可能性を含んだ化合物である。この特異な性質を持つフラーレンを認識して結合するペプチドが得られれば、フラーレンを容易に可溶化できるだけでなく、さらに機能的な分子をペプチドを介して付加することができ、新たなフラーレンの応用分野の開拓になると考えられる。そこで本研究では、ファージ提示系ペプチドライブラリーを用いて、フラーレンを認識するペプチドのスクリーニングを行なった<sup>15)</sup>。

まず、環状7残基のペプチドを提示するファージライブラリーを用い、フラーレンを認識するファージをスクリーニングするために、シリコン基板に真空抵抗加熱蒸着装置を用いてフラーレン (C60) を蒸着した基板をターゲットとして用いた。フラーレン蒸着基板に対して、ファージ提示系のスクリーニング操作を用い、フラーレンに結合するファージを選抜した。そして、フラーレン蒸着シリコン基板に結合したファージを有機溶媒で溶離し、大腸菌で増殖させた後、ファージを精製した。このパニング操作を5回繰り返した後、ファージ増殖液から

表 1. 選択されたファージが提示している環状ペプチドのアミノ酸配列

- 1: Cys – Ser – Arg – Thr – Pro – Thr – Ser – Gln – Cys
- 2: Cys – Ser – Arg – Pro – Asn – His – Gly – Thr – Cys
- 3: Cys – Ser – His – Met – Gln – Thr – Asn – Leu – Cys
- 4: Cys – Asn – Met – Ser – Thr – Val – Gly – Arg – Cys
- 5: Cys – Ser – Asn – Ala – Ser – Val – Lys – Pro – Cys
- 6: Cys – Leu – Gly – Pro – Asn – Thr – Lys – Leu – Cys
- 7: Cys – Leu – Asn – Pro – Thr – Asn – Ser – Ser – Cys

Phage(4)

ファージに提示されている際には、両端のシステインがジスルフィド結合で結合し、環状ペプチドとなっている。

得た24種類のファージのDNAをDNAシークエンサーで解析した。その結果、ファージが提示している環状7残基のアミノ酸配列は、部分的に同じアミノ酸配列を持つことが確認できた(表1)。この配列の中のNo.4ファージ(ペプチド配列: CNMSTVGR)を用いて、シリコン基板に半分だけフラーレンを蒸着した基板で蛍光イムノアッセイを行ったところ、シリコン部位では蛍光がほとんど観察されず、フラーレンを蒸着している部位では蛍光が強く観察できた。一方、スクリーニング前のライブラリーファージでは、どちらも蛍光は観察されなかった(図1)。このことから、スクリーニングで得られたNo.4ファージは、フラーレンに選択的に結合することが

分かった。また、No.4ファージを粉末フラーレンやグラファイトと混合し、蛍光修飾した抗ファージ抗体を入れ、ファージを蛍光修飾した蛍光イムノアッセイを行った。その結果、No.4ファージの提示しているペプチドは、粉末フラーレンには結合したが、グラファイトには結合しなかった(図2)。これにより、ファージが提示しているペプチドは、シリコン基板上のフラーレンを認識するだけでなく、粉末状態のフラーレンでも特異的に認識することがわかった。

#### 4. ダイオキシン計測への応用

筆者らの研究室では、抗体を固定化したマイクロビーズを微細加工技術によって作製した微小集積型反応チャンバーに配置したアレイ型バイオセンサーを作製し、ダ

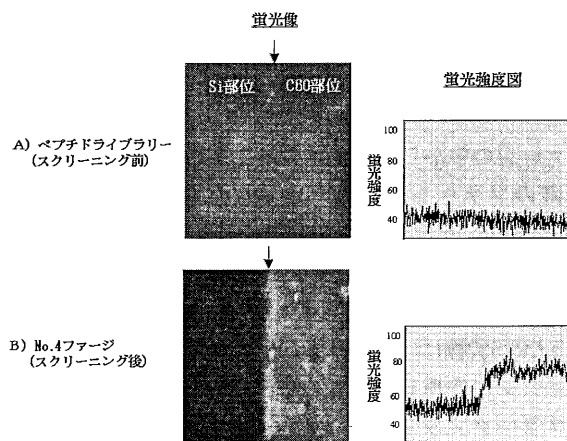


図 1. 選択されたファージの蛍光イムノアッセイ  
矢印部分は、シリコン部位とフラーレン部位の境界を示し、点線は、蛍光強度の測定位置を示す。

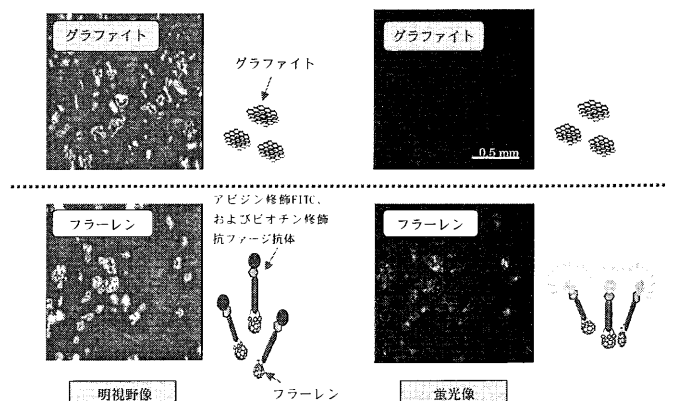


図 2. 選択されたファージの結合特性を示すイメージング

イオキシンの検出に成功している<sup>16), 17)</sup>。この方法は、抗体を用いてダイオキシンを認識させることから、感度や選択性が高い反面、抗体作製の繁雑さやコストに問題があった。そこで、抗体に代わる分子認識素子としてペプチドに着目し、コンビナトリアルケミストリーによって作製したペプチドライブラリーから、ダイオキシ結合性ペプチドを探索し、特性評価を行った。

ダイオキシ結合性ペプチドをスクリーニングするために、ダイオキシとして比較的毒性の低い2,3,7-trichlorodibenzo-p-dioxin (TriCDD) をターゲットとした。まず、ダイオキシやフルオレセイン、モルフィンといった、ベンゼン環を持つような低分子量化合物に対する抗体の超可変部位 (Complementarity Determining Region: CDR) のアミノ酸配列を参考にし、超可変領域に多く出現するアミノ酸7種類 (アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン) を選択した。そして、コンビナトリアルケミストリーを利用して、固相合成により、直径が約100  $\mu$ mのポリスチレンビーズ上に7種類のアミノ酸からなるヘプタペプチドライブラリーを合成した。このライブラリーには、理論上、7の7乗 (約82万) 種類のペプチドが合成されている。このライブラリーに西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase: HRP) が修飾されたTriCDD (HRP-TriCDD) を混合して反応させ、バッファーで洗浄することにより結合していないHRP-TriCDDを洗い流した。そして、マイクロチャンバーアレイ上に移し、酵素反応を行った。もし、ダイオキシ結合性ペプチドがビーズ上に合成されていると、HRP-TriCDDが結合するので、HRPが酵素反応により蛍光性の生成物を産生する。そこで、蛍光顕微鏡で観察するとダイオキシ結合性ペプチドが合成されているビーズが蛍光を発しているのが観察される。蛍光顕微鏡観察により、5種類の蛍光を発するペプチドを選び出し、マイクロマン્યピューレーターを用いて1個ずつ取り出して、プロテインシークエンサーにより、アミノ酸配列を決定した。そして、スクリーニングによって得られたペプチドA (アミノ酸配列: GRGYNRG) に対して、特性評価を行った。競合法により、HRP-TriCDDとTriCDDに似た構造を持つ6種類の阻害剤 (ビフェニル、ジクロロベンゼン、ジフェニレンジオキシド、ジフェニレンオキシド、ナフタレン、トリクロロエチレン) を混合し、阻害効果を調べる実験を行ったところ、ペプチドAはTriCDD以外にも、ジフェニレンオキシドとジフェニレンジオキシドに結合することがわかった。また、TriCDDの濃度依存的な結合を調べる実験では、ペプチドAは、TriCDDに濃度依存して結合し、誤差も少なかった。しかし、センサーとして使用するには結合力

が弱い結果であったことから、複数のダイオキシ結合性ペプチドを結合させたり、環状のペプチドを合成したりするなどの改良が必要と考えられる。だが、ダイオキシンの除去など、濃度依存的な結合が要求されない系では、十分に使用が可能であると考えられた。

## 5. P19胚性腫瘍細胞の細胞認識への応用

P19胚性腫瘍細胞 (P19) は、受精後7日目のマウスの胚を成体のマウスの精巣に移植して生じた奇形癌腫細胞を分離して株化したものであり、1982年にMcBurneyらによって報告された<sup>18)</sup>、いわゆる胚性癌腫細胞 (EC細胞) の一種である。P19は、適当な濃度のレチノイン酸で処理することにより、神経細胞とグリア細胞に効率よく分化することが知られており、低濃度のレチノイン酸やDimethyl sulfoxide (DMSO)で処理すると心筋細胞や繊維芽細胞に分化する性質を持っている<sup>19)</sup>。このような性質は、P19が多分化能と自己複製能を有する細胞株であるということを示している。さらに、未分化状態のP19ではSSEA (stage specific embryonic antigen) <sup>20)</sup>やOct-4<sup>21)</sup>といった幹細胞マーカーを発現しており、P19は幹細胞としての性質を有する細胞として、古くから細胞の分化メカニズムの研究材料として用いられてきた細胞株である。そこで本研究では、幹細胞のモデルとして、P19を標的細胞とした<sup>22)</sup>。

まず、スクリーニングに用いたファージ提示系ペプチドライブラリーとしては、New England Biolabs社のph.D.12™ Phage Display Peptide Library Kitを用いた。このファージライブラリーは、M13ファージの外殻タンパク質であるgIIIタンパクに直鎖12残基のランダムなアミノ酸配列のペプチドを提示させたものである。提示されるペプチドライブラリーの多様性は、 $1.9 \times 10^9$ 種類である。ファージ選別のためのパニングの操作では、培養した細胞を生きている状態でそのまま標的として用いた。そこで本研究では、はじめにファージライブラリーを神経細胞に分化したP19と混合して、これに結合しなかったファージの中から未分化状態のP19に結合するという二段階のファージ選択を行った。次に、回収されたファージを未分化状態のP19と混合して、洗浄の操作を行った後、細胞に結合しているファージをGlycin-HCl溶液(pH 2)で溶離した。溶離したファージは宿主の大腸菌E. coli ER2537株に感染させ、増殖・精製を行った後、次のパニングに使用した。この方法で8回のパニングを行い、プラークアッセイによる結合能の評価を行った。ファージの提示するペプチドのアミノ酸配列は、これをコードするDNAの配列を解析することによって確認することが出来る。そこで、ファージのDNAを抽出し、DNA

表2. 選択されたファージが提示しているペプチドのアミノ酸配列

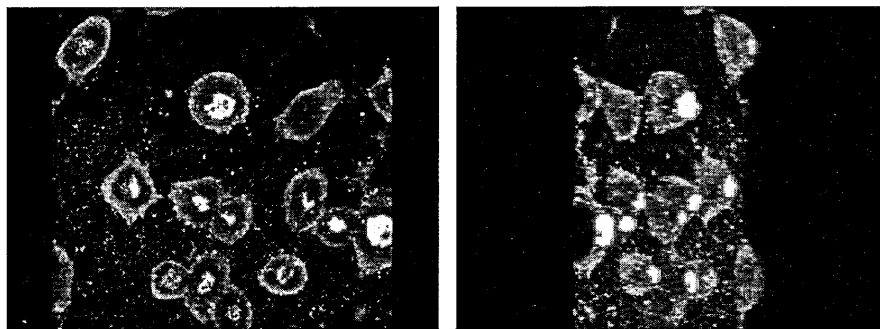
Phage No.	N-terminal	C-terminal
No. 28	A L P S T S S Q M P Q L	
No. 09	A L P S T S S Q M * Q L	
No. 39	A L P S T S S Q M P Q	
No. 25	Y Q S S V S V Q L P T L	
No. 15	T T R Q V P V S Y T S S	
No. 01	* R L G F P P Q T H A L	
No. 33	H Q P I Q I L E Q P Y T	
No. 36	N S Q N I G V G S W * *	
No. 30	H V D Q R Y W F L G A P	
No. 45	T T G P N T R * H H A *	
No. 37	M * G I A E Q L M H * *	

\*印は解読不可のアミノ酸。

シーケンサーで解析することにより、目的のアミノ酸配列を決定した。その結果、No.28ファージが提示するペプチド (No.28ペプチド) のN末-ALPSTSSQMPQL-C末という配列に高い相同性をもつペプチドが、高頻度で出現していた (表2)。このことから、ファージの提示するペプチドのアミノ酸配列はN末-ALPSTSSQMPQL-C末に収束する傾向にあると判断した。これは、標的とした未分化状態のP19とファージの混合を行う前に、神経細胞に分化したP19との混合したことにより、非特異的なファージが十分に除去されたためであると考えられた。

No.28ファージの細胞への結合特性の評価は、蛍光修飾された抗M13ファージ抗体を用いた蛍光イムノアッセ

イを用いて、共焦点顕微鏡により蛍光観察を行った。No.28ファージの結合の選択性を評価するために、神経細胞に分化したP19と、未分化状態のP19を用いて、No.28ファージの結合性の評価を行った。神経細胞に分化したP19については、神経突起にも、その細胞体の部分にもNo.28ファージの結合を示す蛍光の粒子は観察されなかった。一方、未分化状態のP19については、その細胞上にNo.28ファージの結合を示す蛍光の粒子が観察された (図3)。このことから、No.28ファージは未分化状態のP19に選択的に結合することが示された。さらに、共焦点顕微鏡による蛍光像から分かるように、No.28ファージは細胞膜上に提示されている分子に結合し、細胞の頭



A) 真上から見た様子

B) 斜め左から見た様子

図3. 共焦点顕微鏡によるNo. 28ファージの局在の様子

頂部に集合することが分かった。こうした細胞膜上の分子が集合する現象は、抗体のような複数の結合部位を持つ分子が細胞上のマーカーに結合した場合に観察される<sup>23)</sup>。今回の実験でも、複数の結合部位を持つNo.28ファージを用いたことにより、同様の現象が観察されたと考えられた。

No.28ファージに提示されているペプチド (No. 28ペプチド) が、未分化状態のP19に選択的に結合することが分かったが、No. 28ペプチド自体の結合特性を確認する必要がある。そこで、No. 28ペプチドを化学的に合成し、その特性を評価した。ペプチドの合成はFmoc固相合成法により行った。今回のような標的細胞に対するファージの結合が示されている場合、このファージが提示する分子を合成して、ファージと合成した分子を同時に混合し、ファージの結合が阻害されるかを調べることにより、提示される分子の結合能を間接的に証明するという手法が用いられる<sup>24)</sup>。そこで本研究では、No.28ペプチドとの比較のために、No.28ペプチドのアミノ酸配列をランダムに組み換えたランダムペプチド (N末端-SPQSPMLLAQTS-C末端)を化学的に合成して、合成されたペプチドがファージの結合を阻害するかどうかを調べた。そして、蛍光免疫アッセイを行う際に、No.28ファージと2つの合成したペプチドをそれぞれ未分化状態のP19細胞と混合して、No.28ファージの結合が合成ペプチドによって阻害されるかを評価した。その結果、ランダムペプチドを混合した場合には、No.28ファージと

未分化状態のP19を混合した場合に見られる強い蛍光の粒子が観察された (図4 A)。一方、No. 28ペプチドを未分化状態のP19と一緒に混合した場合には、No.28ファージと未分化状態のP19を混合した場合に見られる強い蛍光の粒子は観察されなかった (図4 B)。このことから、No. 28ペプチドは、No.28ファージの結合を阻害することが示された。したがって、No.28ファージは、提示しているNo. 28ペプチドによって未分化状態のP19に結合しているということが示された。さらに、No.28ペプチドは、ペプチド単独でも未分化状態のP19に結合することが間接的に示された。

## 6. おわりに

ヒトゲノムなどの遺伝子シーケンスが次々に明らかにされつつある今日、遺伝子データを基礎とした生命現象の理解が、ますます進むものと思われる。特に、細胞レベルでの分子の理解として、遺伝子からタンパク質、その他の生体分子の時間的、空間的な相互的関連性が明らかにされるであろう。バイオセンサーの研究は、生体機能における分子の理解のための方法論を提供するだけでなく、こうした新たな生体分子のメカニズムを基礎とする新たなバイオセンシングの創案・展開をも可能にすると期待される。

そこで、今回紹介したコンビナトリアルペプチドを用いた細胞マーカー分子の探索方法などは、幹細胞のマーカー分子の単離に非常に有効であると考えられる。また、

6

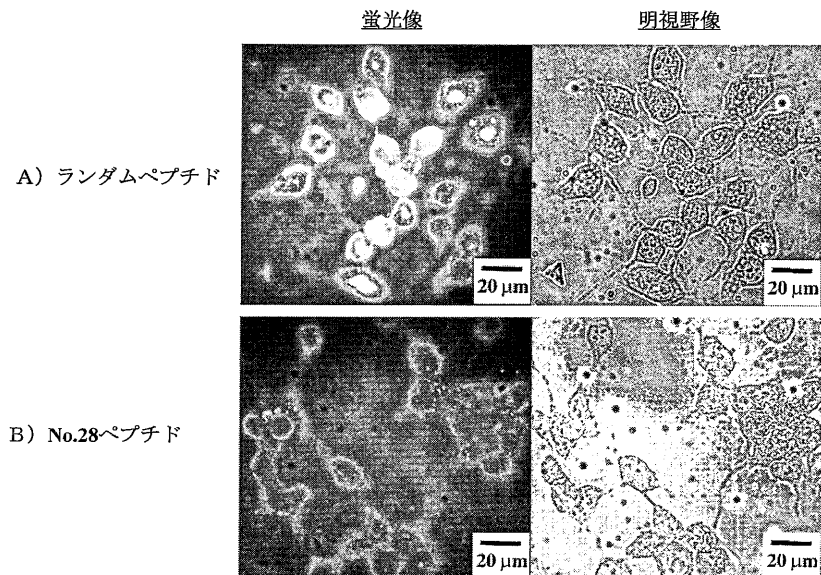


図4. No.28ペプチドの結合の評価

スクリーニングによって得られる認識分子は、幹細胞の局在や分化状態を示す指標となるだけでなく、セルソーター等を用いた体細胞性幹細胞の分離や、薬剤や分化誘導因子などを修飾することによる内在性の幹細胞を活性化させるドラッグデリバリーツールとしての応用も可能であると考えられる。このように、コンビナトリアルペプチドは、タンパク質や合成された化合物などだけでなく、様々な分子の集合体である細胞にも有効な相互作用分子を探索するツールであり、特に今回紹介した幹細胞の分離に威力を発揮するとともに、幹細胞の再生医療への応用を支援する強力なツールとなると考えられる。したがって、こうしたHTSやコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの技術が、様々な研究分野での重要な研究手法の一つとなり、その研究成果は医学、薬学、農業、福祉、健康などの分野でバイオセンサーの形として現れてくるものと思われる。

## 7. 参考文献

- 1) Kawakami, T., et al., Chem. Commun., 1765 (1999)
- 2) 横山憲二, コンビナトリアル・バイオエンジニアリング, p.139, 化学同人 (2003)
- 3) Boldicke, T., et al., Stem Cells, 19, 24 (2001)
- 4) Zhang, J., et al., Cancer Lett., 171, 153 (2001)
- 5) Samoylova, T.I., et al., J. Neuroimmunol., 127, 13 (2002)
- 6) Van Ewijk, W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 3903 (1997)
- 7) Whaley, S.R., et al., Nature, 405, 665 (2000)
- 8) 植田充美, コンビナトリアル・バイオエンジニアリング, p.1, 化学同人 (2003)
- 9) Boutorine, A.S., et al., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 33, 2462 (1994)
- 10) Dugan, L.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 9434 (1997)
- 11) Tabata, Y., et al., Fullerene Sci. Technol., 5, 743 (1997)
- 12) Wlodawer, A., et al., Science, 245, 616 (1989)
- 13) Gavalas, V.G., et al., Anal. Chim. Acta, 409, 131 (2000)
- 14) Szymanska, I., et al., Biosens. Bioelectron., 16, 911 (2001)
- 15) Morita, Y., et al., J. Mol. Catal. B-Enzym., 28, 185 (2004)
- 16) Murakami, Y., et al., Mat. Sci. Eng. C, 12, 37 (2000)
- 17) Murakami, Y., et al., Proc.  $\mu$  TAS 2000 Symp., 191 (2000)
- 18) McBurney, et al., Dev. Biol., 89, 503 (1982)
- 19) McBurney, M.W., et al., Nature, 299, 165 (1982)
- 20) Rudnicki, M.A., et al., J. Cell Physiol., 142, 89 (1990)
- 21) Pesce, M., et al., Bioessays, 20, 722 (1998)
- 22) Morita, Y., et al., Biotech. Progress, 22, 974-978 (2006)
- 23) Hagiwara, H. et al., Biochem. Biophys. Reser. Comm., 260, 516-521 (1999)
- 24) Rasmussen, U.B., et al., Cancer Gene Ther., 9, 606 (2002)