

細胞内リン酸化シグナル網羅的解析のための ペプチド固定化酸化チタン基板の開発

船津 貴洋*・園田 達彦・山本 和弥・松嶋 茂憲・片山 佳樹**・山田 憲二

Development of titanium oxide plate immobilized substrate peptide for detection of protein kinase activity

Takahiro FUNATSU*, Tatsuhiko SONODA, Kazuya YAMAMOTO, Shigenori MATSUSHIMA,
Yoshiki KATAYAMA** and Kenji YAMADA

Abstract

A peptide array using a titanium oxide plate for detection of protein kinase activity has been investigated. First, the titanium oxide plate was prepared by sol-gel method. The plate has relatively flat surface and high hydrophilicity rate of photo-induced surface wettability conversion by UV irradiation. Furthermore, we succeeded that the surface wettability was controlled reversibly using hypobaric drying and UV irradiation. Next, complex with poly(acrylic)acid and protein kinase A (PKA) substrate peptide (PAA/PEP) was synthesized. We confirmed that PAA/PEP was phosphorylated by PKA, by coupled enzyme assay. Finally, fluorescenced poly(acrylic)acid (F-PAA) was immobilized on the titanium oxide plate, and the plate was sonicated in water. After washing, F-PAA still remained on the plate. It suggested that a bonding is formed between F-PAA and titanium oxide plate. From above results, we would establish the basis technique to develop the peptide array using the titanium oxide plate.

Keywords : Peptide array, Protein kinase, Phosphorylation, Titanium oxide, Photo-induced hydrophilic effect

1. 緒言

細胞は外界からの様々な情報を「細胞内シグナル伝達機構」という精密に組み合わされた化学反応によつて的確に処理することで、正常な機能を保っている。特に、Protein Kinase (PK) と呼ばれる酵素によつて触媒されるリン酸化シグナルは細胞の増殖や分化、アポトーシスなどの様々な細胞機能を制御しており、細胞内シグナルにおいて非常に重要である^[1]。それゆえに、リン酸化シグナルを解析することで創薬や疾患の診断などに対して有用な情報を得ることができると考えられる。ただし、ヒトではPKが約200種類同定されており、各々が相互作用しあっているため、個々のキナーゼの働きを調べるだけでは充分と言えず、細胞内の全キナーゼの活性を網羅的に解析する必要がある。

現在、リン酸化シグナルの網羅的解析法としてペプチドアレイを用いた方法が注目されている (Fig. 1)。ペプチドアレイとは、プロテインキナーゼの基質となり得る様々なペプチドを基板上に固定化したものである^[2]。このペプチドアレイを細胞破砕液で処理すると、細胞中のキナーゼがその活性に応じて作用しアレイ上のペプチド

がリン酸化される。そしてこのアレイを、蛍光標識抗アミノ酸抗体、またはリン酸基に結合するビオチンラベル化低分子キレート化合物^[3]と蛍光標識アビジンなどで処理することにより、リン酸化されたペプチド部分を蛍光標識物質が認識し、蛍光イメージ像としてリン酸化パターンを得ることができる。このパターンを様々な条件の細胞にて比較することでプロテインキナーゼの活性化状態を把握することができる。

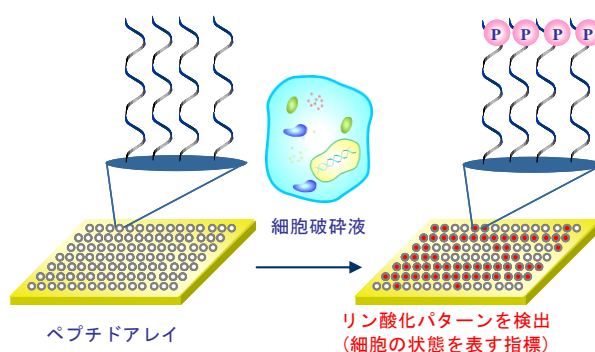


Fig. 1 ペプチドアレイを用いたリン酸化シグナル網羅的解析.

これを応用して、正常細胞のリン酸化パターンと検体細胞のリン酸化パターンとを比較することによって疾患の早期診断に利用できる。また、異常細胞に薬理活性を持つ

*専攻科物質化学工学専攻2年

**九州大学大学院工学研究院応用化学部門

可能性がある化合物や未知遺伝子を作用させた後、ペプチドアレイ解析を行い、得られたリン酸化パターンが正常細胞のものに近づけば、使用した物質は薬物候補になる。すなわち、この技術は創薬における1次スクリーニングへの応用も期待できる。

ところで、ペプチドアレイの基板には主にガラス基板や金基板などが用いられている^[2]。これらを用いると、細胞中の夾雑物が基板に非特異的に吸着してしまい、そのために、リン酸化シグナル検出の際に擬陽性・擬陰性シグナルが発生し、正確にPKの活性化状態を検出できないという問題がある。この問題を解決するために、一般的にはブロッキング剤と呼ばれる高分子が用いられるが、我々は酸化チタンを用いることを考えた。

酸化チタンは紫外線照射によって2つの特徴的な現象を発現するといわれている。紫外線照射により生じる強い酸化力によって表面の有機物を分解する光触媒作用、そして紫外線照射により表面が非常に水となじみやすい状態、すなわち表面が超親水性（水の接触角が0°に近づく）になり、その結果、基板上に吸着した物質が浮き上がり水洗で除去できるようになる光誘起超親水化現象である^[4]。ここであげた2つの現象を用いれば、非特異的吸着物を簡単に除去できると期待される。しかしながら、ペプチドアレイに高強度の紫外線や高エネルギーを持つ短波長の紫外線を照射すると、強すぎる光触媒作用によって固定化したペプチドまでもが分解する可能性が高い。一方、光誘起超親水化現象は比較的強度の弱い紫外線でも発現する。それゆえに、ペプチドアレイに近紫外光を照射し、親水性表面を形成させた後に洗浄することで、非特異的吸着物の除去が可能になると期待される。

本報では、光誘起超親水化現象を発現する酸化チタン基板の作製及び酸化チタン基板への基質ペプチドの固定化や基質としての評価について報告する。

2. 酸化チタン基板の作製と物性評価

2-1 酸化チタン基板の作製

酸化チタン基板は、スライドガラスに酸化チタン薄膜を形成することによって作製する。薄膜形成にはゾルゲル法を採用した^[5]。

チタンテトライソプロポキシド (TPT) 3.67 mL、アセチルアセトン (acac) 1.30 mLを25 mLメスフラスコにとり、

イソプロパノールを標線まで加え酸化チタンの前駆体溶液を調製した（なお、TPT及びacacの濃度はいずれも0.5 Mである）。

調製した前駆体溶液1000 μ Lに対して超純水11.7 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーにて混合した。超純水を添加したのは前駆体の加水分解反応が超純水によって促進されるという報告があったためである^[5]。その後、混合した溶液72 μ Lをスピコーター (K-359 S-1、(株)共和理研)にて4000 rpm、10 秒の条件でスピコートし、電気炉 (Model 1400、サーモライン社)にて723 Kで30 分間焼成を行うことで酸化チタン基板を得た。なお比較の為、超純水を添加せず前駆体溶液のみを塗布して焼成した基板も同様の方法で作製した。

2-2 酸化チタン基板の物性評価^[6]

作製した酸化チタン基板表面の構成元素やその結合状態を評価するために、X線光電子分光 (XPS) 分析装置 (ESCA-3400、島津製作所(株))を用いて、XPS Ti_{2p}及びO_{1s}スペクトルを測定した。その結果、Ti_{2p}スペクトルでは455~465 eV付近に2つのピークが、O_{1s}スペクトルでは530 eV付近にピークがそれぞれ観察された。これらのピークはTi-O結合に起因するものと帰属されることから、基板表面に酸化チタン薄膜が形成されていることが示唆された。

続いて、走査型プローブ顕微鏡 (SPA-300、セイコーインスツル(株))を用いて基板表面の形状を観察した。Fig. 2に酸化チタン基板の表面形状像を示す。基板作製時に超純水を添加していない場合、基板表面は凹凸が大きく均一でないことが分かる。一方、超純水を添加した場合、基板表面は大きな凹凸はほとんどなくなり全体的に平滑になっている事が確認できる。

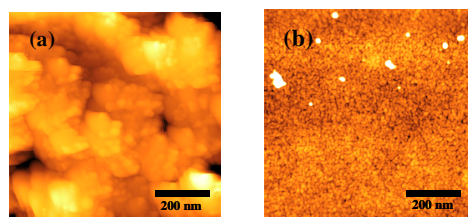


Fig. 2 酸化チタン基板の表面形状像。
(a)超純水未添加, (b)超純水添加.

続いて、Table 1に表面観察にて得られた酸化チタン基板の平均面粗さ及び最大高低差を示す。超純水の添加によって平均面粗さ、最大高低差が大幅に減少したことから、超

純水の添加によって基板表面が平滑になったことが示唆された。基板表面がより平滑なほど夾雑物の非特異的吸着を抑制できると考えられることから、超純水を添加して作製した酸化チタン基板はペプチドアレイの基板として望ましい性質を有しているといえる。

Table 1 酸化チタン基板表面の平均面粗さと最大高低差.

Sample	平均面粗さ / nm	最大高低差 / nm
超純水未添加	28.48	320
超純水添加	0.57	21

2-3 酸化チタン基板表面の濡れ性に関する検討^[6,7,8]

本研究で開発を目指しているペプチドアレイでは、細胞破砕液で処理した後、紫外線照射にてアレイ表面を超親水性にして非特異的吸着物を洗浄除去する。一方で複数のペプチドを単一のアレイへ固定化する場合、スポットしたペプチド溶液同士の混合を防ぐためにある程度の疎水性を保つ必要がある。それゆえ、酸化チタン基板表面の濡れ性をスイッチングする必要がある。

Miyauchiらは、酸化チタン表面に可視光を照射することによって、酸化チタン表面の濡れ性を可逆的に制御できることを見出した^[9]。その原理は光照射に伴う熱の発生による、酸化チタン表面上に吸着したヒドロキシ基の脱離であった。

我々は、より温和な条件である低温での基板表面の濡れ性制御方法として、減圧乾燥と紫外線照射を組み合わせた基板表面の濡れ性制御を試みた。

はじめに、酸化チタン基板での光誘起超親水化現象発現の確認を行った。まず、2-1節に記した方法で作製した酸化チタン基板に真上からブラックライト (SLUV-4、アズワン株)にて紫外線 (波長365 nm、強度 743 μW cm⁻²) を照射した。その後、接触角計 (CA-D型、協和界面科学株)にて基板表面における水の接触角を測定し、予め測定した紫外線照射前の水の接触角と比較した。

Table 2に酸化チタン基板における表面濡れ性の紫外線照射時間依存性を示す。超純水添加の有無に関わらず、照射時間とともに酸化チタン基板表面における水の接触角が減少している。しかしながら作製時に超純水を添加していない基板においては、照射時間 120 分でも超親水化の目安である10°以下にはならなかった。一方、超純水を添

加した基板においては、紫外線照射 60分にて接触角が10°以下となり超親水性表面が形成された。

Table 2 酸化チタン基板表面における濡れ性の紫外線照射時間依存性. (a)超純水未添加, (b)超純水添加.

照射時間 /min	contact angle / deg	
	(a)	(b)
0	42.8	38.0
30	25.4	11.1
60	11.9	<10.0
90	11.9	<10.0
120	11.9	<10.0

続いて、酸化チタン基板表面の親水化速度を評価した。ただし、通常酸化チタン薄膜における水の接触角はロット間で差があることが多く比較が困難である。そこで、Sakaiらは基板表面の親水化速度を次のように定義して評価した^[10]。

$$\text{親水化速度} = \frac{\text{水の接触角の逆数}}{\text{紫外線照射時間}}$$

このように定義することによって、ロット間の差に関係なく親水化速度を評価することが可能となる。

Fig. 5に紫外線照射時における酸化チタン基板表面の親水化速度を示す。Sakaiらの定義に従えば、親水化速度はFig. 5における直線の傾きとなる。超純水を添加して作製した基板では、添加しなかった基板に比べて親水化速度が向上することが明らかとなった。よって、超純水を添加して作製した基板を用いた方がより短時間で超親水化表面を形成できることが示された。

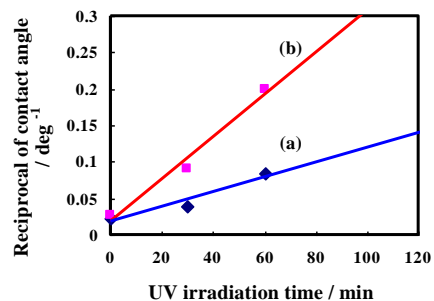


Fig. 5 酸化チタン基板表面の親水化速度. (a) 超純水未添加, (b) 超純水添加.

続いて、超純水添加酸化チタン基板について濡れ性の制御を行った。基板表面における水の接触角が10°以下の酸

化チタン基板を真空乾燥器 (LV-110、エスペック株) にて 313 K、10 kPa以下の条件で、2 時間減圧乾燥した。減圧乾燥後、基板表面の水の接触角を測定し、乾燥前後で表面濡れ性を比較した。さらに、乾燥後の基板に紫外線を照射し (波長365 nm、強度 743 $\mu\text{W cm}^{-2}$)、基板表面の濡れ性を制御できるかどうかを調べた。Table 3に超親水性表面を有する酸化チタン基板の減圧乾燥(a)及び紫外線照射(b)による濡れ性の経時変化を示す。接触角が10°以下の表面を有する酸化チタン基板を減圧乾燥したところ接触角が23°まで上昇した。また、60分の紫外線照射によって、増大した接触角は再び10°以下に減少した。この結果から紫外線照射と減圧乾燥を組み合わせることによって、酸化チタン基板表面の濡れ性を制御できることが示された。

Table 3 減圧乾燥(a)及び紫外線照射(b)による酸化チタン基板の表面濡れ性の経時変化.

(a)	乾燥時間 /min	contact angle / deg
	0	< 10.0
	120	23.0
(b)	照射時間 /min	contact angle / deg
	0	23.0
	30	17.8
	60	< 10.0

3. 酸化チタン基板へのPKA基質ペプチドの固定化

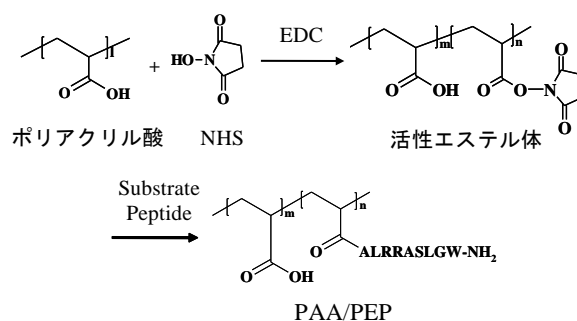
現在、ペプチドアレイにはガラス基板や金基板が用いられている。ガラス基板ではアミノ基を導入した基板が市販されており、この官能基を利用してペプチドを基板へと固定化できる。また金基板では、固定化するペプチドの末端にシステイン残基を導入すれば、金-硫黄結合の形成によりペプチドを基板へと固定化できる。一方、酸化チタン基板に対する基質ペプチドの固定化方法については、現在のところ報告されていない。そこで、本研究では代表的な PK である Protein Kinase A (PKA) の基質ペプチドを酸化チタン基板へ固定化する方法を探索することにした。

酸化チタンはカルボキシ基とエステル結合を形成すると報告されている^[11]。そこで、カルボキシ基を持つ高分子であるポリアクリル酸と基質ペプチドとの複合体 (PAA/PEP) を用いれば、基質ペプチドを酸化チタン基板

へ固定化できるのではないかと考えた。そこで、PAA/PEP を合成し、基質としての評価を行うとともに、蛍光標識ポリアクリル酸 (F-PAA) を用いて酸化チタン基板への結合能を評価した。

3-1 PAA/PEPの合成と基質としての評価^[12,13]

ポリアクリル酸へのPKA基質ペプチドの導入はN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を用いた活性エステル法を用いた。Scheme 1に合成スキームを示す。



Scheme 1 活性エステル法によるPAA/PEPの合成.

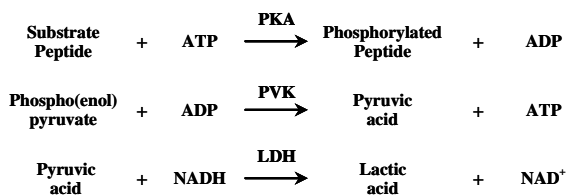
6.7 mg mL⁻¹ ポリアクリル酸 (平均分子量 5,000) / 20 mM NaHCO₃ (pH 8.5) 溶液15 mLに、NHS 46.0 mgと1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 92.0 mgを加え、室温にて一晩攪拌した。その後、溶液を水中で6 時間透析 (分画分子量 3,500) することで精製し、凍結乾燥処理にて活性エステル体を得た。

活性エステル体へのPKA基質ペプチドの導入は、20 mg mL⁻¹活性エステル体 / 20 mM NaHCO₃ (pH 8.5) 溶液に、6.1 mM 基質ペプチド (ALRRASLGW-NH₂, M.W. 1028.2) 溶液をアクリル酸残基に対して1.0 mol %となるように添加し、室温にて一晩攪拌した。反応後、溶液をNaOH水溶液 (pH 11.5) にて1.5時間透析し、未反応の活性エステル体を分解後、水中で6時間透析 (分画分子量 3,500) することで精製した。そして、凍結乾燥処理によって白色綿状固体である複合体を得た。

得られた複合体溶液のUV-Visスペクトルを測定したところ、280 nm付近に特徴的な吸収ピークが観察された。これは基質ペプチド中に含まれるトリプトファン残基による吸収と帰属されるため、複合体の形成を確認した。なお、基質ペプチドの導入率は0.25 mol% であった。

続いて、Cookらが報告したCoupled Enzyme Assayを用いて、PAA/PEPがPKAの基質となり得るかを調べた^[14]。

Scheme 2 にCoupled Enzyme Assayの概要を示す。この手法ではPKA、ピルビン酸キナーゼ (PVK)、乳酸脱水素酵素 (LDH) の3つの酵素による反応によって、最終的にニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の酸化が起こる。この際340 nmの吸光度が減少するため、この吸光度の減少をモニタすることで、リン酸化の進行を間接的に観察することができる。



Scheme 2 Coupled Enzyme Assay の概要.

測定は次のようにして行った。0.25 mM ATP、1 mM phospho(enol)pyruvate、0.3 mM NADH、125 units mL⁻¹ PKA C-subunit、4 units mL⁻¹ PVK、10 units mL⁻¹ LDH、10 mM MgCl₂を含む50 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonate buffer (pH 7.0)を調製し、25 °Cでプラスチックセルに入れた。その後、PAA/PEPもしくはPKA基質ペプチドをそれぞれ0.67 mg mL⁻¹、40 μMとなるように添加し、直後に波長340 nmにおける吸光度測定を開始して、その経時変化を追跡した。

Fig. 6に各溶液のPKA添加後の吸光度変化を示す。基質を添加しなかった場合、吸光度の減少は観測されなかった。これに対して、基質ペプチド溶液及びPAA/PEP溶液においては、吸光度の減少が観測された。これよりPAA/PEPのリン酸化、すなわちPAA/PEPがPKAの基質となり得ることが示された。ただし、PAA/PEP溶液における吸光度の減少は基質ペプチドに比べて緩やかであることから、PAA/PEPでは高分子鎖の立体障害が影響しているものと考えられる。

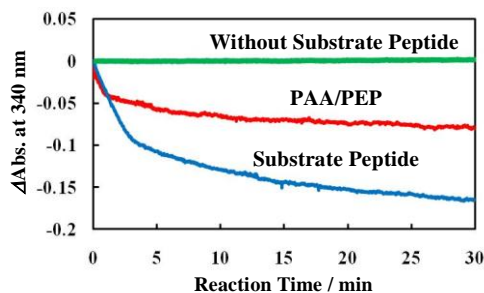


Fig. 6 各溶液のPKA添加後の吸光度変化.

3-2 F-PAAの合成と酸化チタン基板との結合能の評価^[15]

F-PAAの合成は、アクリル酸と蛍光基導入試薬であるMethacryloxyethyl thiocarbonyl rhodamine Bとのラジカル共重合にて行った。まず、モノマーの仕込み比がアクリル酸 99.9 mol%、蛍光基導入試薬 0.1 mol%となるように混合したモノマー溶液 (全モノマー濃度0.1 M) にN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンを3 mMとなるように加えた後、2分間窒素バブリングを行った。そして、過硫酸アンモニウムを6 mMとなるように加え、ラジカル共重合を開始した。90分後、反応溶液を透析膜 (分画分子量 25,000) に入れ、一晚超純水に対して透析した後、透析後の溶液を凍結乾燥することで赤色綿状固体を得た。

生成物を超純水に溶解し、UV-Visスペクトルを測定したところ、550 nm付近に吸収ピークが観測された。このピークはRhodamine Bによるものと帰属されたことから、蛍光修飾されたポリマーを得られたことが示された。ただし、収量が非常に少なく導入率を求めることはできなかった。

次に、F-PAAの酸化チタン基板への結合能を評価した。F-PAA溶液 0.1 μLを酸化チタン基板にスポットした後、湿潤雰囲気中で1時間静置することによって F-PAAの固定化を行った。次に、基板を水中にて5分間超音波洗浄した。そして、洗浄前後において蛍光顕微鏡観察を行い、F-PAAの残存量を比較した。また、ガラス基板においても同様の操作を行った。

Fig. 7 及び Fig. 8にF-PAAを固定化したガラス基板及び酸化チタン基板の蛍光顕微鏡観察像、Fig. 9に蛍光色素 (Methacryloxyethyl thiocarbonyl rhodamine B) 固定化酸化チタン基板の蛍光顕微鏡画像をそれぞれ示す。ガラス基板に固定化したF-PAAは、洗浄によってほとんど脱落した。よって、F-PAAはガラス基板には物理的に吸着しているだけで、結合を形成していないことが示唆された。一方、酸化チタン基板においては洗浄後でもF-PAAが残存していた。このことから、F-PAAは酸化チタン基板と結合を形成していることが示唆された。さらに、蛍光色素単独では酸化チタン基板に結合しなかったことから、F-PAAと酸化チタン基板との結合は、酸化チタン基板表面の水酸基とポリアクリル酸に含まれるカルボキシ基とのエステル結合によるものと推測される。以上のことから、ポリアクリル酸を用いた手法は基質ペプチドの固定化に有効であることが示された。

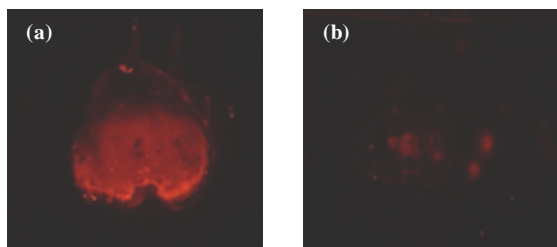


Fig. 7 F-PAA 固定化ガラス基板の蛍光顕微鏡観察像。
(a): 洗浄前, (b): 洗浄後.

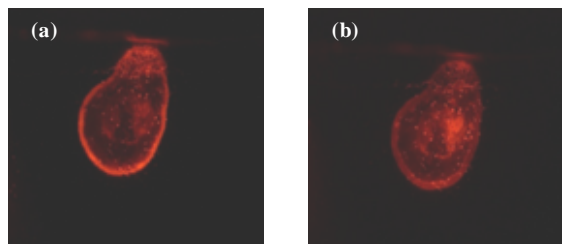


Fig. 8 F-PAA固定化酸化チタン基板の蛍光顕微鏡観察像。
(a): 洗浄前, (b): 洗浄後.

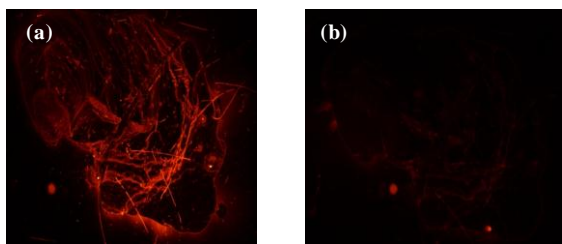


Fig. 9 蛍光色素固定化酸化チタン基板の蛍光顕微鏡観察像。
(a): 洗浄前, (b): 洗浄後.

4. 結言

本報では、細胞内リン酸化シグナル網羅的解析における擬陽性・擬陰性シグナルの抑制を目的として、酸化チタン基板を用いたペプチドアレイの開発を試みた。

はじめに、ゾルゲル法を用いて酸化チタン基板を作製したところ、非常に平滑な表面を持ち、紫外線照射時の親水化速度の大きい基板を作製することができた。また、減圧乾燥と紫外線照射を組み合わせることで、酸化チタン基板の表面濡れ性が制御可能であることを見出した。

次に、ポリアクリル酸と基質ペプチドの複合体 (PAA/PEP) を合成した。Coupled Enzyme Assayによる評価からPAA/PEPがPKAの基質となり得ることが示された。

続いて、蛍光標識ポリアクリル酸を合成し、酸化チタン基板との結合能を評価したところ、ガラス基板に対する吸着能に比べて、有意な差が見られた。このことから、ポリアクリル酸と酸化チタン基板との間に結合が形成してい

ることが示唆された。

今後は酸化チタン基板を用いることによって、どの程度非特異的吸着物を洗浄できるかを検討する必要がある。また、On-Chipリン酸化検出やリン酸化速度の検討を行うことで、本手法の有効性が示されるものと期待される。

謝辞

本報に記載した研究成果は、文部科学省科学研究費若手研究 (B) (21710121) の助成を受けた。ここに謝意を表す。

参考文献

- [1] 東京大学生命科学教科書編集委員会, “理系総合のための生命科学”, 羊土社, **2007**.
- [2] 片山佳樹, *DOJIN NEWS*, **2004**, 109, 8-12.
- [3] E.Kinoshita *et al.*, *Dalton Trans.*, **2004**, 1189-1193.
- [4] 安保重一他, “最新光触媒技術”, NTS, **2002**.
- [5] 橋本和仁他, “酸化チタン光触媒のすべて—抗菌・防汚・空気浄化のために”, シーエムシー出版, **1998**.
- [6] 船津貴洋他, 第46回化学関連支部合同九州大会講演予稿集, **2009**, 89.
- [7] 船津貴洋他, 第19回九州沖縄地区高専フォーラム講演要旨集, **2009**, 48.
- [8] 船津貴洋他, 第12回化学工学会学生発表会 (福岡大会) 研究発表講演要旨集, **2010**, 102.
- [9] M.Miyauchi *et al.*, *SURFACE SCIENCE*, **2002**, 511, 401-407.
- [10] N.Sakai *et al.*, *J.Phys.Chem.B*, **2003**, 107, 1028-1035.
- [11] 荒川裕則, *表面技術*, **2008**, 59, 167-172.
- [12] 船津貴洋他, 第47回化学関連支部合同九州大会講演要旨集, **2010**, 233.
- [13] 船津貴洋他, 第28回九州分析化学若手の会夏季セミナー講演要旨集, **2010**, 38.
- [14] Paul F.Cook *et al.*, *Biochemistry*, **1982**, 21, 5794-5799.
- [15] 船津貴洋他, 日本化学会西日本大会講演要旨集, **2009**, 153.

(2010年10月15日 受理)