

# 非特異的吸着物除去能を有するペプチド固定化酸化チタン基板の開発

園田 達彦・妹尾 紘介\*・大原 遥\*\*・片山 佳樹\*\*\*

## Development of peptide-immobilized titanium oxide plate with self-cleaning function

Tatsuhiko SONODA, Kousuke SEO, Haruka OHARA and Yoshiki KATAYAMA

### Abstract

Protein phosphorylation is one of crucial and versatile reactions in intracellular signal transduction systems in a cell, which is catalyzed by protein kinases. If we simultaneously analyzed activities of c.a. 500 protein kinases, diagnosis of intractable diseases could be realized. As one of such techniques, we have developed a peptide array using titanium oxide (TiO<sub>2</sub>), which has UV light-induced self-cleaning function. In this study, we tried to optimize conditions of LPD method for a reproducible preparation of the TiO<sub>2</sub> plate. As a result, the following conditions were suitable; three times concentration of the traditional LPD solutions and 60 °C. We also tried to add sol-gel method as a pretreatment of the LPD method to the plate preparation process for further improvement of the physical property of the TiO<sub>2</sub> plate. The plate had non-specific adsorbate removal capability comparable to the conventional products. On the other hand, we examined whether it was possible to detect the on-chip phosphorylation of immobilized substrate peptides of protein kinase A on the TiO<sub>2</sub> plate. In this case, large amount of non-specific adsorbates were observed on the plate surface. If the problem can be solved, our proposed method could be applied to primary drug screening.

Keywords: titanium oxide, peptide array, protein phosphorylation, non-specific adsorbate removal, on-chip phosphorylation

### 1. 諸言

生命の最小単位である細胞は外界からの様々な刺激に対して的確に応答することで生命活動を維持している。これを可能にしているのが「細胞内情報伝達系」と呼ばれる情報伝達ネットワーク<sup>1)~3)</sup>であるが、裏を返せば、この細胞内情報伝達系に何らかの異常が発生した場合、細胞は外界からの刺激にうまく応答できなくなることになる。例えば、膵臓がんでは90%以上の確率でRasと呼ばれるGTP結合タンパク質が変異しており、外界の環境に関わらず恒常的に活性化してしまうことが知られている<sup>4)</sup>。

このように細胞内情報伝達系は種々の疾病と密接に関わるので、その診断法や治療法を確立するためには、何らかの方法で疾病の原因となっている物質を同定し、これが細胞内情報伝達系の中でどのような機能を有しているのかを知る必要がある。しかしながら、細胞内情報伝達系の全貌はまだまだ明らかになっていないため、この機能解明は容易な作業ではない。

そこで我々のグループでは、原因物質の機能が不明でも新薬開発につながる情報を得ることができる手法として、細胞内情報伝達系の中でも主要な情報伝達手段として知られるタンパク質リン酸化シグナルに着目し、これを網羅的に解析可能なFig.

1に示すペプチドアレイの開発を進めている。タンパク質リン酸化シグナルとは、プロテインキナーゼ(PK)と呼ばれる一群の酵素が触媒となって、基質タンパク質中の特定のSer、Thr、Tyr残基にATPのγ位のリン酸基が転移するもので、これにより基質タンパク質の活性調節が行われるというものである<sup>1),5)</sup>。この反応に関与するPKはヒトにおいて500種類以上も存在し、全タンパク質の約3分の1がいずれかのPKの基質になると言われている<sup>7)</sup>ことから、網羅的に調べることができれば、新薬開発に必要な情報は十分に得られると期待できる。我々はこれまでにいくつかのプロトタイプを作製しており、正常細胞とがん細胞のリン酸化パターンの比較で、特定のPK活性の違いを検出することに成功している<sup>8-10)</sup>。

一方、ペプチドアレイの開発においては、細胞内夾雑物のアレイ上への非特異的吸着をいかに抑制するかが重要な要素となる。非特異的吸着物の存在は偽陽性、偽陰性発生の原因となり、不正確な解析結果を誘起することにつながってしまう。一般的な抑制方法としては、ブロッキング剤と呼ばれる非特異的吸着抑制剤の利用、あるいは特殊な洗浄液の利用などが知られているが、私たちは酸化チタンTiO<sub>2</sub>を基板に用いることで、基板自身に非特異的吸着物除去能力を持たせるという新しい手法を提案してきた。これは酸化チタンの光誘起超親水化現象に着目した手法で、基板表面を超親水化することで非特異的吸着物を水洗浄だけで簡単に除去できるというものである<sup>11),12)</sup>。これまでの研究でその可能性を明らかにし、酸化チタン基板上に固定化したリン酸化ペプチドの検出にも成功したが、一方で再現性という点で課題が残った。酸化チタン基板は液相堆積法(LP法)にて調製しているが、堆積状態の不均一性が一つの原因として考えられた。

そこで今回は、酸化チタン基板の作製方法について詳細な検討を行い、再現性のよい基板の調製を目指した。一方、リン酸化ペプチドの検出には成功しているため、実際の操作により近い形で検出、すなわち基板上に固定化された基質ペプチドのプロテインキナーゼによるリン酸化反応を行い、その蛍光検出を試みたので報告する。

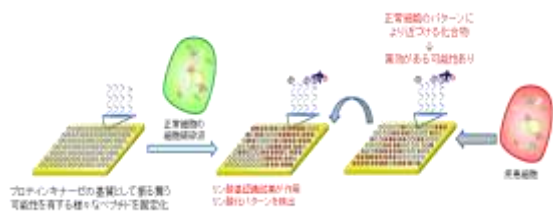


Fig. 1 ペプチドアレイを用いた細胞内リン酸化シグナル網羅的解析の概念図

\* 九州大学大学院システム生命科学府

\*\* 鹿児島大学工学部

\*\*\* 九州大学大学院応用化学部門

## 2. 実験方法

### 2-1. LPD 法による酸化チタン基板作製方法の条件検討

酸化チタン基板の作製には LPD 法を用いた。従来の作製方法について簡単に説明すると、15×25 mm に裁断した無蛍光ガラス基板 (MICRO SLIDE GLASS 白切放 No.1、松浪硝子工業株式会社) 3 枚を、0.04 M チタンフッ化アンモニウム水溶液、0.12 M ホウ酸水溶液を体積比 1:1 で混合した水溶液 50 cm<sup>3</sup> 中に垂直に立て、80 °C のオイルバス中で 3 時間静置することで、TiO<sub>2</sub> 基板が得られる。今回は、LPD 法で使用する 2 つの水溶液の濃度およびオイルバスの温度を変更して基板作製を行った。水溶液濃度に関しては従来法の 1、1.5、2、3、4 倍、温度に関しては 50、60、65、70、75、80 °C を選択し、これらの条件を組み合わせ実施した。

一方、得られた基板の物性評価は、これまで目視と紫外線照射前後における水の接触角測定が中心であった。今回は、目視に代わる方法として、LPD 法前後において基板の重量を測定し、重量増加率から TiO<sub>2</sub> の堆積量を評価することとした。重量測定は、基板を 110 °C の乾燥機 (タバイエスベック株式会社製 LV-110) にセットして 1~3 時間乾燥し、デシケータ内で冷却してから実施した。重量増加率は (酸化チタン堆積による重量増加量 [mg] / LPD 法前のガラス基板重量 [g]) で算出した。

紫外線照射前後における水の接触角測定は、ぬれ性評価装置 (大興製作所製 LSE-ME1) を用いて行った。紫外線は強度 100 mW/cm<sup>2</sup> で 15 分間照射した。また、1 つの基板について 3 点測定し、その平均値を接触角とした。

### 2-2. ゼルゲル法と組み合わせた酸化チタン基板作製方法の検討

ゼルゲル法はチタンテトライソプロポキシドを用い、基板上に酸化チタン薄膜を形成するのに適した手法である。ゼルゲル法単独で作製した基板でも非特異的吸着物除去能を発揮することは確認されている<sup>11), 12)</sup>が、ここでは LPD 法で堆積する TiO<sub>2</sub> とガラス基板のバインダーとしての役割を期待した。

チタンテトライソプロポキシドとアセチルアセトンそれぞれ 0.5 M で含むイソプロパノール溶液 500 μL と超純水 5.8 μL を混合した溶液を調製し、ここから 100 μL 取ってスピネーティング法で洗浄済みのガラス基板に塗布した。その後、450 °C で 30 分間熱処理した。得られた基板を 2-1 で述べた LPD 法に従って処理し、酸化チタン基板を得た。なお、LPD 法の条件は濃度 3 倍、温度 60 °C を採用した。その後の物性評価は 2-1 で述べた方法と同様の評価を行った。

### 2-3. ゼルゲル法と組み合わせた酸化チタン基板の非特異的吸着物除去能の評価

2-2 で作製した酸化チタン基板に 1 mM 3-アミノプロピルトリエトキシシラン/DMSO 溶液と 1 M テトラエトキシシラン/DMSO 溶液を 1:9 で混合した溶液を 4 点スタンプし、酢酸条件下で 1 晩静置した。スタンパーには Micro CASTer™ 8-Pin System (Schleicher & Schuell 社) を使用した。エタノールで洗浄した後、10 mM HBTU、10 mM HOBt・H<sub>2</sub>O、20 mM ジイソプロピルエチルアミンを含む 10 mM BNPA/DMF 溶液 50 μL を展開して 1 時間静置し、アセトン

で洗浄した。その後、先にスタンプした 4 点の上に、1 mM リン酸化ペプチド (Ac-CGGALRRApSLGW-NH<sub>2</sub>) 水溶液をスタンプし、1 時間静置したのち超純水で洗浄した。

作製したペプチド固定化基板上にリン酸基認識試薬である 8 μg/mL Phos-Tag/Dylight649 標識ストレプトアビジン複合体水溶液 30 μL を展開し、湿潤・遮光条件下で 1 時間静置した後、TBS-T 及び超純水にて各 2 分ずつ超音波洗浄し、アレイスキャナで測定した。その後、100 mW/cm<sup>2</sup> の紫外線を計 15 分間照射し、5 分おきに上述の TBS-T/超純水洗浄、アレイスキャナ測定を繰り返した。

### 2-4. On-chip リン酸化反応の蛍光検出

従来の方法で作製した酸化チタン基板上に、Fig. 2 に示すように基質ペプチド (S) 単独およびリン酸化ペプチド (pS)、非リン酸化ペプチド (A) 混合物を 2-3. で示した方法に従って固定化し、18 mM ATP 溶液 1.0 μL、Mg<sup>2+</sup> を含む 71 mM MOPS buffer (pH=7.2) 50 μL、1.4 units/μL PKA/リン酸 buffer (pH=6.8) 3.9 μL、超純水 45 μL を混合したリン酸化反応溶液から 50 μL を基板上に展開し、1 時間室温遮光下で静置した。その後、再び 2-3. で示した方法に従って、アレイスキャナで測定した。なお、スタンパーの構造的な問題で 2 列目と 3 列目の間に空きが生じている。

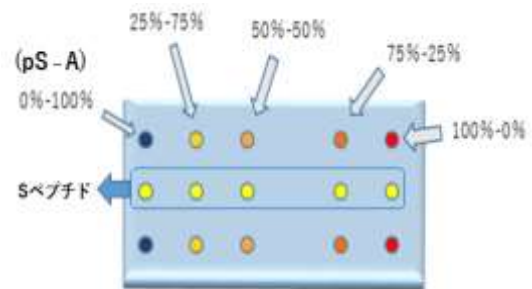


Fig. 2 各種ペプチドスタンプ位置

## 3. 実験結果および考察

### 3-1. LPD 法の条件変更に伴う酸化チタン基板の物性変化

種々の条件で作製した酸化チタン基板について水の接触角測定および重量測定を行った結果を Tab. 1、Tab. 2 に示す。Tab. 2 の棄却枚数は、重量増加が 0 またはマイナスとなった基板の枚数である。まず、水の接触角測定を行い、そこから条件を絞って重量測定を行った。Tab. 1 より基板が超親水化する条件 (接触角 < 10°) は、濃度 1 倍・温度 80 °C、2 倍・80 °C、3 倍・60 °C、4 倍・60 °C の 4 つであることが分かった。一方で、濃度 4 倍・温度 60 °C の条件で作製した基板は、堆積した TiO<sub>2</sub> がおそらく自重に耐え切れず簡単に剥離してしまうため、重量測定を行うことが出来なかった (Tab. 2)。また、従来条件である濃度 1 倍・温度 80 °C は、他の 2 つの条件と比較して TiO<sub>2</sub> 堆積による重量増加率が低く、あまり堆積していないことが示された。今回の基板はきちんと超親水化現象が発現したが、堆積量が少ないと堆積状態の不均一化を招きやすいことが予想され、このことが再現性の低さに繋がったのではないかと推測される。他の 2 つについては、十分な堆積増加が認められた。特

Tab. 1 紫外線照射前後の TiO<sub>2</sub> 基板表面の水の接触角

LPD 法条件		接触角±標準偏差/°	
濃度	温度/°C	照射前	照射後
1 倍	80	89.6±7.8	~0
1.5 倍	80	101.6±9.8	82.8±16.8
2 倍	80	64.1±1.4	9.4±0.9
1 倍	65	103.2±4.6	54.1±7.8
1 倍	60	63.6±8.8	41.0±2.3
2 倍	60	78.5±6.4	48.9±6.4
3 倍	60	7.3±0.3	~0
4 倍	60	14.1±2.0	~0
1 倍	50	75.2±3.7	70.1±2.2

Tab. 2 TiO<sub>2</sub> の重量測定結果

LPD 法条件		重量増加率±	測定	棄却*
濃度	温度/°C	標準偏差/ mg/g	枚数	枚数
1 倍	80	0.20±0.1	9	1
2 倍	80	1.53±0.4	8	2
2 倍	60	0.41±0.7	6	3
3 倍	60	1.17±0.3	6	0
4 倍	60	—	3	3

\*重量増加が 0 またはマイナスとなった基板の枚数

に棄却枚数が 0 であった 3 倍・60°C を LPD 法の最適条件として、以降の実験で用いることとした。

### 3-2. ゼルゲル法と組み合わせた酸化チタン基板の物性評価

Tab. 3 に紫外線照射後の水の接触角測定および LPD 法前後の重量測定の結果を示す。LPD 法の条件は濃度 3 倍・温度 60°C としたが、3-1 で述べた同条件の基板とほぼ同じ結果が得られた。一方、目視で観察すると基板表面の性状に違いがみられ、ゼルゲル法と組み合わせた基板は少し赤みを帯びた色をしていた。この原因は今のところ不明であるため、走査型電子顕微鏡観察や X 線回折測定を行い、TiO<sub>2</sub> の堆積状態について詳細な検討を行う予定である。

### 3-3. ゼルゲル法と組み合わせた酸化チタン基板の非特異的吸着物除去能の評価

ゼルゲル法と組み合わせて作製した基板を用いて、基板上に固定化したリン酸化ペプチドの蛍光検出を試みた。結

Tab. 3 ゼルゲル法と組み合わせた TiO<sub>2</sub> 基板の物性評価結果

接触角/°		重量増加率±	測定	棄却*
照射前	照射後	標準偏差/ mg/g	枚数	枚数
~0	~0	1.02±0.4	6	0

\*重量増加が 0 またはマイナスとなった基板の枚数

果を Fig. 3 に示す。紫外線照射前の蛍光検出画像では、リン酸基認識蛍光試薬が非特異的吸着により基板周囲に結合し、そこから生じる蛍光のため、4 点のスポットがはっきり見えない (Fig. 3(a))。しかしながら、紫外線照射と洗浄を繰り返すと周囲のバックグラウンド蛍光は減少し、4 点のスポットがはっきりと観察できるようになった (Fig. 3(d))。このことから、今回の基板も非特異的吸着物除去能を有していることが確認できた。

バックグラウンド蛍光が低下するのは、酸化チタンの光誘起超親水化現象による非特異的吸着物の洗浄除去効果、および光触媒作用による蛍光検出試薬の分解、2つの効果によるものと推察される。後者の効果は紫外線の強度によっては発現しないが、今回の条件であれば十分に発現する。一方、この手法は、照射する紫外線そのものによって蛍光検出試薬の分解が起こる可能性もあり、長時間の紫外線照射は、リン酸化ペプチドをスタンプした個所からの蛍光強度低下を招く危険がある。そのため、紫外線照射時間の短縮が今後の課題となるが、この点に関してはいくつかアイデアがあり、さらなる研究を進めている。

### 3-4. On-chip リン酸化反応の蛍光検出

市販酵素素を用いて酸化チタン基板上でリン酸化反応を行い、その後、リン酸基検出試薬を用いて、蛍光検出を試みた結果を Fig. 4 に示す。上下には、画像からリン酸化の割合を求めるために、ポジティブコントロールである pS ペプチドとネガティブコントロールである A ペプチドを一定のモル比で混合した水溶液を 5 点スタンプしている。上側で 3 点、下側で 4 点確認できた。A ペプチド 100% は検出できないので、8 点中 7 点から蛍光が観察できたが、その強度については混合比率が同じケースでもばらつきが見られた。これはスタンプの際に、スタンプ針についた液が基板上にうまく移動していないためではないかと推測されるので、今後はスタンプの条件を検討する必要がある。

一方、基質ペプチドは真ん中に 5 点スタンプした。一部からリン酸化されたと思われる蛍光が観測されたが、中央付近で観測された非特異的吸着による蛍光と重なってしまい、はっきり確認することが出来なかった。

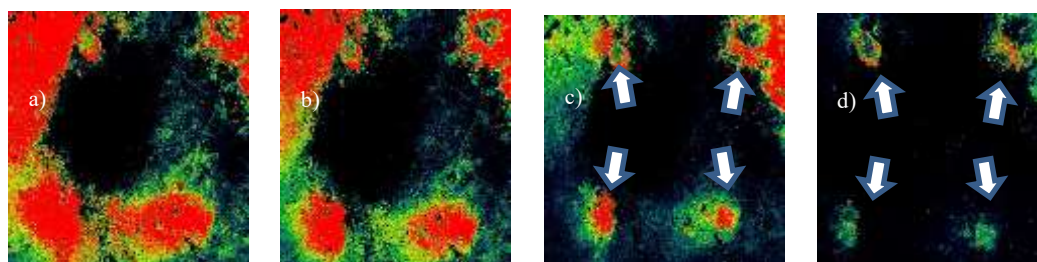


Fig. 3 ゼルゲル法を組み合わせた酸化チタン基板に固定化したリン酸化ペプチドの蛍光検出画像  
a) 紫外線照射前 b) 5 分照射後 c) 10 分照射後 d) 15 分照射後 矢印はリン酸化ペプチドスタンプ箇所

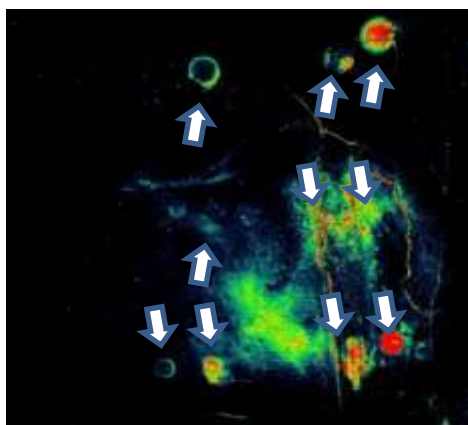


Fig. 4 On-chip リン酸化反応後の蛍光検出画像

同じ実験を別途作製した酸化チタン基板を用いて繰り返し行ったが、On-chip リン酸化反応を実行すると、リン酸基認識蛍光試薬の非特異的な吸着が明らかに増大することが明らかとなった (data not shown)。ATP などリン酸化反応試薬に含まれる物質が影響している可能性が高いと考えられるので、今後の検討が必要である。

#### 4. 総括

本報告では、酸化チタンのユニークな性質を利用したペプチドアレイの作製方法最適化と On-chip リン酸化反応検出について述べた。最適化に関しては、LPD 法において従来よりも濃度を3倍に増やし、温度は 80°C から 60°C に下げると、比較的安定した堆積量となり、光誘起超親水化現象も再現性良く発現することが明らかとなった。温度が下がることにより TiO<sub>2</sub> の析出スピードが下がる一方で、濃度が増えることで上がるので、そのバランスが最もよかったものと思われる。

また、ゾルゲル法を利用して酸化チタン薄膜を形成する方法も検討した。酸化チタンとガラス基板のバインダーの役割を期待したが、物性値は従来法とさほど差はなかった。しかしながら目視では違いが見られたことから、堆積状態に違いがある可能性があり、それが非特異的吸着物除去能に影響するかもしれないので、今後詳細を検討していく必要があると考えられる。

一方、On-chip リン酸化反応検出に関しては、予想以上に難しいことが判明した。スタンプのばらつきは、基板の表面状態、各ペプチド水溶液の物性に影響を受けている可能性がある。また、On-chip リン酸化反応を行うと非特異的蛍光が増大した点は、今後、細胞破砕液などの実サンプルを利用することを考えると、大きな課題となることが予想される。

ただし、紫外線照射条件や基板の洗浄条件、スタンプ条

件など、まだ改善できる点がかなり残っているので、課題を克服できる可能性は十分にある。これらを克服できれば、本手法は薬物の一次スクリーニングなどへの応用が期待される。

#### 5. 謝辞

本報に記載した研究成果は、本校の平成 30 年度教育・研究プロジェクト経費の助成を受けた。また、スタンプの部品は本校教育研究支援室にて作製頂いた。ここに謝意を表する。

#### 6. 参考文献

- Higashi, H., Sato, K., Ohtake, A., Omori, A., Yoshida, S., Kudo, Y., *FEBS Lett.*, **1997**, *414*, 55
- 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**.
- 西田栄介, 現代化学 (増刊) “シグナル伝達ネットワーク”, 東京化学同人, **2000**.
- Kalo, M. S., Pasquale, E. B., *Biochemistry*, **1999**, *38*, 14396
- Gamboni, S., Chaperon, C., Friedrich, K. Baehler, P. J., Reymond, C. D., *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12189
- Macala, L. J., Hayslett, J. P., Smallwood, J. I., *Kidney Int.*, **1998**, *54*, 1746
- Park, Y. W., Cummings, R. T., Wu, L., Zheng, S., Cameron, P. M., Woods, A., Zaller, D. M., Marcy, A. I., Hermes, J. D., *Anal. Biochem.*, **1999**, *269*, 94
- S. Shigaki, T. Yamaji, X. Han, G. Yamanouchi, T. Sonoda, O. Okitsu, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, *Anal. Sci.*, **2007**, *23*, 271-275.
- K. Inamori, M. Kyo, K. Matsukawa, Y. Inoue, T. Sonoda, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, *BioSystems*, **2009**, *97*, 179-185.
- X. Han, T. Sonoda, T. Mori, G. Yamanouchi, T. Yamaji, S. Shigaki, T. Niidome, Y. Katayama, *Comb. Chem. High T. Scr.*, **2010**, *13*, 777-789.
- 船津 貴洋, 園田 達彦, 山本 和弥, 松嶋 茂憲, 片山 佳樹, 山田 憲二, 北九州工業高等専門学校研究報告, **2011**, *44*, 99-104.
- 柿原晃太郎, 片山佳樹, 園田達彦, 北九州工業高等専門学校研究報告, **2014**, *48*, 95-99.

(2019 年 11 月 5 日 受理)