

プロテオミクスのための電気化学デバイスの開発

村田 正 治

1 はじめに

ヒトゲノム解析の完了を発端に、生命科学研究の焦点は遺伝子からタンパク質へと移りつつある。ゲノムは人体の遺伝情報のフルセットだが、その実体はタンパク質を作る設計図にすぎず、細胞の骨組みも活動もタンパク質が支えている。身体には様々な細胞があるが、その違いを生み出しているのもタンパク質である。すべての細胞は基本的に同じゲノムを持っているものの、どの遺伝子が活性化しているかは個々の細胞によって異なり、したがってそこで作られているタンパク質も違ってくるためである。このように、特定の組織や細胞内のタンパク質全体を捉えようとする研究の概念としてプロテオーム (proteome, protein と集団を意味する ome からの造語) が提案され、その具体的な研究や方法論としてのプロテオミクスに注目が集まっている¹⁾²⁾。

遺伝子の機能本体であるタンパク質レベルでの解析は、細胞や組織において発現しているタンパク質の種類と量の総体的な変動を検出する「発現プロテオミクス」と、個々のタンパク質そのものの機能を網羅的に研究する「機能プロテオミクス」に大別することができる。前者は二次元ゲル電気泳動と質量分析法による解析が主であり、現在は分解能と感度の向上が続けられている。しかし、後者には、10万種類に達するといわれるタンパク質を網羅的かつハイスループットに解析できる分析機器はまだまだ開発されておらず、今後の生命科学研究における大きな課題となっている。

2 核内レセプター固定化バイオセンサー

筆者らはプロテオミクスの新しいツールとして、タンパク質を基板上に固定化した電気化学検出型バイオチップの開発を目指している。従来、固相へのタンパク質固定化に際しては、固定化タンパク質そのもののアミノ基を用いていたため、固定化とともに変性、もしくは活性の低下が避けられなかった。そこで筆者らは、遺伝子組み換え技術を駆使することによって、タンパク質を固体表面上に効果的に固定化することに成功している (図1)³⁾⁴⁾。この方法は遺伝子レベルで導入したヒスチジンタグを用いて、ニトリロトリ酢酸 (NTA)-Ni(II) 錯体を介して金基板上に固定化する方法である。タンパク質本体の機能部位を固定化に使用しないため、固定化タンパク質の変性を伴わないばかりでなく、固定化に際してタンパク質の配向を制御することができる点で優れている。また、EDTAなどのキレート剤で処理してNi²⁺を取り除けばタンパク質は脱離するので、再度Ni²⁺と錯化させれば基板の再利用が可能である。

検出系にはイオンチャンネルセンサーの原理を基に⁵⁾、固定化タンパク質の立体構造変化を捉える電気化学検出系を開発した。これは、測定溶液中に添加した電気化学的に活性な分子 (酸化還元マーカー) の、電極表面上に形成されるタンパク質層に対する“透過しやすさ”を指標とすることによって、間接的にタンパク質の性質の変化を捕捉するものである。多くのタンパク質は、その機能発現に際して構造変化を伴うことが知られている。本法はそのコンホメーションの変化を検出原理としており、多くのタンパク質に適用できる汎用性の高い検出法といえる。

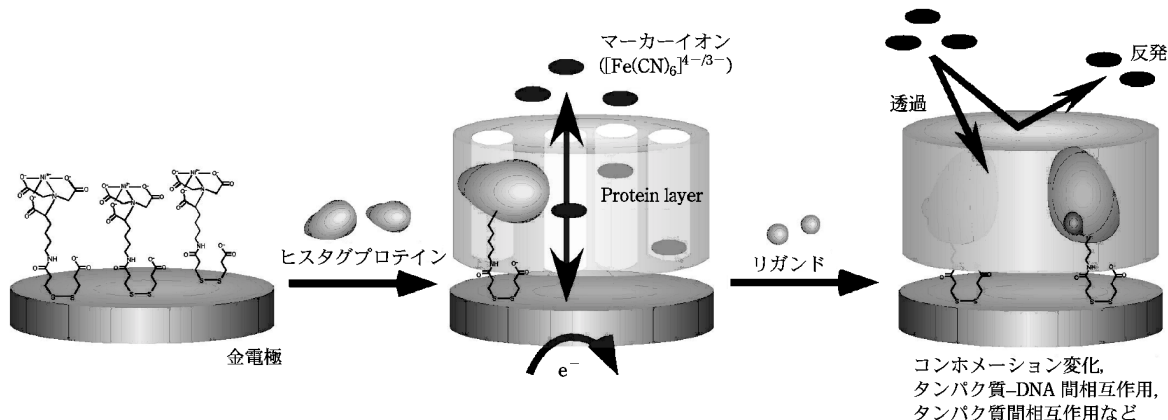


図1 タンパク質固定化センサーによるタンパク質機能解析法

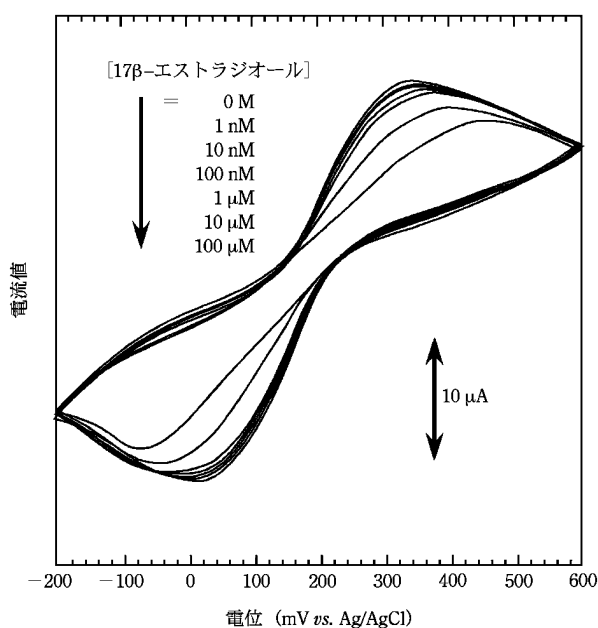


図2 hER-LBD固定化電極による17β-エストラジオールの検出

このバイオセンサーを、高次生命現象の担い手であるタンパク質の機能評価システムとして使用した。筆者らが注目しているのは、恒常性の維持と制御を担うおよそ数千種類といわれるレセプタータンパク質群である。生命の恒常性は環境や状況に応じた精緻な情報伝達によって維持されているが、その担い手がレセプタータンパク質である。レセプターは細胞の内外からもたらされるリガンド分子との結合によって情報を受けとり、コンホメーション変化や、あるいは自身がリン酸化されることによってその情報を伝達している。本研究では、特に遺伝子発現の調節を担う核内レセプターに注目し、これらを固定化したセンサーを開発した。

まず最初に、女性ホルモン受容体であるヒトエストロゲンレセプター (hER) 固定化電極を作製した⁶⁾。エストロゲンは女性ホルモンとして生殖機能に作用するばかりではなく、脳や神経機能にも深くかかわっている重要なホルモンである。そこで筆者らは遺伝子組み換え操作によって、hER リガンド結合ドメイン (hER-LBD) をバクテリアから発現させ、金電極上に固定化することを試みた。NTA 誘導体を用いて金電極上に固定化した結果、8.9 pmol cm⁻²の密度で、およそ5 nm 四方に一分子のhER-LBDが固定化されていると概算された。金電極上に固定化したレセプターがリガンド結合能を保持しているかを確認するため、hER-LBD固定化電極に天然の女性ホルモン17β-エストラジオールを作用させ、その電気化学的応答をサイクリックボルタメトリー (CV) によって観察した。hER-LBD固定化電極に1 nM から100 μMの17β-エストラジオールを作用させたところ、得られたサイクリックボルタモグラムのピーク電流値は添加濃度にしたがって大きく減少した(図2)。対照的に未修飾電極では同濃度の17β-エストラジオールには全く応答しなかったことから、ピーク電流値の減少は電極表面上におけるレセプター-リガンド間の特異的な相互作用によることが示唆された。

hERはエストロゲン様の作用を持つ、いわゆる内分泌攪乱

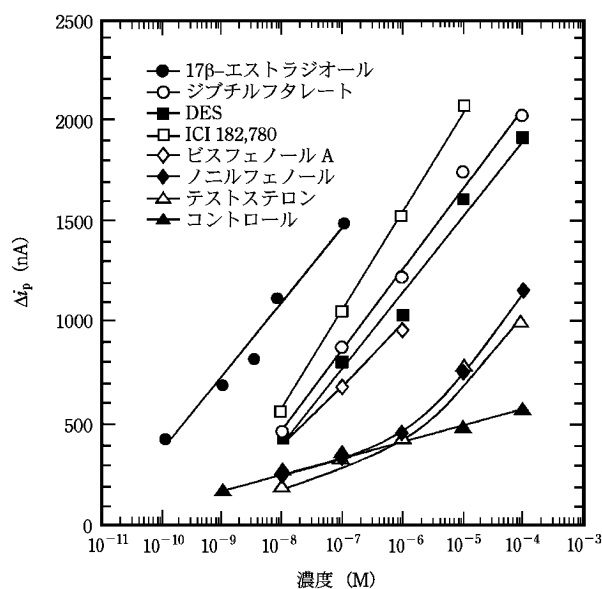


図3 hER-LBD電極による内分泌攪乱物質の検出

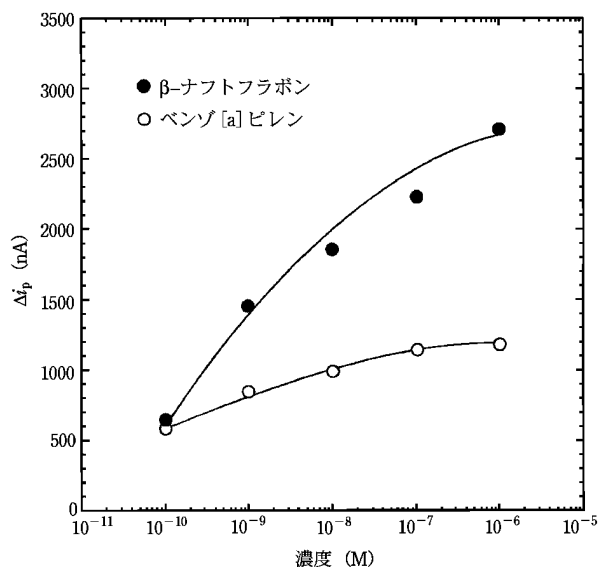


図4 hAhR-LBD電極による多環芳香族炭化水素の検出

物質の標的レセプターとしても知られている。そこで、エストロゲン活性が懸念されている工業化成品等のリスクアセスメントへ応用した。ピーク電流の減少量 (Δi_p) と添加濃度の関係をプロットしたところ、hER-LBD固定化電極は合成エストロゲン (DES) やエストロゲンアンタゴニスト (ICI 182, 780) のほか、内分泌攪乱活性が疑われるビスフェノール A などの工業用化学物質に対しても濃度依存的に応答することが明らかとなった(図3)。

次に、同じく核内レセプターであり、なおかつ薬物や内分泌攪乱物質の標的タンパク質としても知られているヒト甲状腺ホルモンレセプター (hTR) とヒトダイオキシンレセプター (hAhR) を認識素子とするバイオセンサーを作製した。二つのレセプターのリガンド結合ドメインを遺伝子クローニングし、大腸菌によって大量発現した⁷⁾。hERと同様に、各組換え

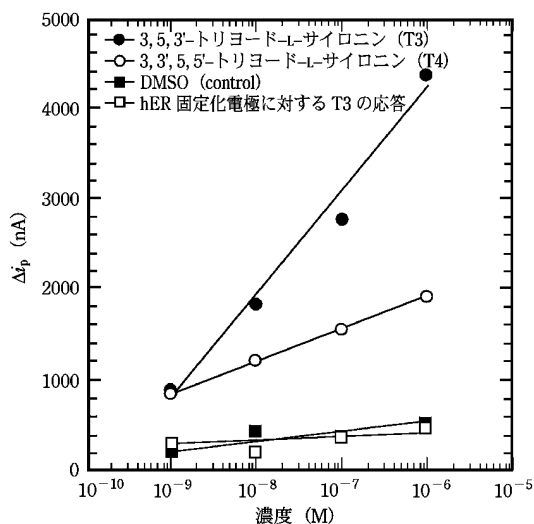


図5 hTR-LBD電極による甲状腺ホルモンの検出

レセプターを電極上に固定化し、その性能評価を行った。HTR-LBD固定化電極に甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン (T3) とテトラヨードサイロニン (T4) を作用させたところ、そのピーク電流値は 1 nM から 1 μM のリガンド分子に対して濃度依存的に減少した (図4)。対照的に、hTR とは結合しないジメチルスホキシド (DMSO) には全く応答しなかった。また T3 は、hER-LBD 固定化電極に対して全く影響を与えなかったことから、これらの現象がレセプター-リガンド間の特異的相互作用であることが示された。

また同様に、hAhR-LBD 固定化電極はその代表的なリガンド分子の一つであり、なおかつ発癌性物質として知られるベンゾ[a]ピレンや、あるいは β-ナフトフラボンといった多環芳香族炭化水素に対して 0.1 nM という低濃度から応答しており、高い性能を有していることが示された (図5)⁸⁾。

3 おわりに

これらの結果に示したとおり、ヒト核内レセプターを用いたリガンド結合実験に関しては、すでに RI 標識リガンドを用いた競合アッセイ法⁹⁾や酵母 two-hybrid 法¹⁰⁾に匹敵する感度を達成している。特に本法の測定時間は、リガンド分子添加後約 5 分で検出可能であり、上記の従来法と比較して大幅な高速化

がなされている。また検出のためのラベル化や、B/F 分離 (結合した物質としていない物質を分離する操作) などの煩雑な操作が一切不要であるため、自動化・ロボット化にも適している。将来的には、これら一つ一つの素子をワンチップ上に集積化したプロテインアレイの開発を目指している。レセプターのみならず様々なタンパク質の機能を網羅的に解析し、生命科学の発展に寄与したい。

文献

- 1) R. W. Nelson, D. Nedelkov, K. A. Tubbs : *Electrophoresis*, **21**, 1155 (2000).
- 2) J. J. Scibek, E. Evergren, S. Zahn, G. A. Canziani, D. V. Ryk, I. M. Chaiken : *Anal. Biochem.*, **307**, 258 (2002).
- 3) M. Murata, M. Nakayama, H. Irie, K. Yakabe, K. Fukuma, Y. Katayama, M. Maeda, T. Suzutani : *Anal. Sci.*, **17**, 1273-1275 (2001).
- 4) M. Murata, M. Nakayama, H. Irie, K. Yakabe, K. Fukuma, Y. Katayama, M. Maeda : *Anal. Sci.*, **17**, 387-390 (2001).
- 5) M. Sugawara, K. Kojima, H. Sazawa, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **59**, 2842 (1987).
- 6) M. Murata, K. Yano, K. Fukuma, M. Maeda, Y. Katayama : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77**, 525 (2004).
- 7) M. Murata, K. Yano, S. Kuroki, T. Suzutani, Y. Katayama : *Anal. Sci.*, **19**, 1569 (2003).
- 8) M. Murata, H. Gonda, K. Yano, S. Kuroki, T. Suzutani, Y. Katayama : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**(1), 137 (2004).
- 9) S. Kwack, O. Kwon, H. Kim, S. Kim, S. Kim, K. Sohn, R. Lee, C. Park, E. Jeung, B.-S. An, K. Park : *J. Toxicol. Environ. Health A*, **65**, 419 (2002).
- 10) J. Nishikawa, K. Sato, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo, T. Nishihara : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 76 (1999).

村田正治 (Masaharu MURATA)



九州大学大学院工学研究院応用化学部門 (分子) (〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1)。九州大学大学院工学研究科合成化学専攻博士課程修了。博士 (工学)。<現在の研究テーマ>タンパク質機能解析デバイスの開発, 機能化タンパク質・核酸の創製。<主な著書>“天然高分子の新展開” (共著) (CMC 出版)。<趣味>アウトドア, 読書, AV。
E-mail : muratatcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

原稿募集

トピックス欄の原稿を募集しています

内容: 読者の関心をひくような新しい分析化学・分析技術の研究を短くまとめたもの。

執筆上の注意: 1) 1000 字以内 (図は 1 枚 500 字に換算) とする。2) 新分析法の説明には簡単な原理図などを積極的に採り入れる。3) 中心となる文献は原則として 2 年以内のものとし、出所を明記する。

なお、執筆者自身の文献を主として紹介する

ことは御遠慮ください。又、二重投稿は避けてください。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付先及び問い合わせは下記へ。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(株)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

〔電話: 03-3490-3537〕