

リン酸化シグナル解析を可能にするペプチド固定化酸化チタン基板の開発

園田 達彦・原田 美乃里*・吉田 綾香*・片山 佳樹**

Development of peptide-immobilized titanium oxide plate for analysis of phosphorylation signals

Tatsuhiko SONODA, Minori HARADA, Ayaka Yoshida 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 kinase. We could diagnose diseases of a cell if we simultaneously analyzed activities of an estimated 500 protein kinases. As one of such techniques, peptide array has been attracting attention. We have developed a peptide array with a rapid detection system by which phosphorylation can be monitored by mass spectrometry. In this study, we tested the application of titanium oxide (TiO₂) as a substrate material for MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) of our system, which is expected to reduce residual impurity that might cause false-positive. The TiO₂ substrate was prepared by LPD method and characterized by X-ray diffraction (XRD) and SEM analyses, and then a model peptide with a light-cleavable linker was immobilized. The light-cleaved peptide was successfully detected after UV irradiation with a smaller yield than expected.

Keywords: titanium oxide, mass spectrometry analysis, peptide array

1. 緒言

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である^{1),2)}。情報伝達には主にタンパク質が関与しており、酵素反応やアフィニティー相互作用を利用してコンホメーション変化を誘起し、情報を下流へと伝えたり、逆に遮断したりする³⁾が、非常に多くのタンパク質が様々な情報伝達に複雑に関与しており、その全貌はいまだ明らかにはなっていない。

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。一般に難治性疾患と呼ばれる疾病の多くは、細胞内情報伝達系に何らかの異常があることが明らかにされている。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⁴⁾。

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の確立するためには、何らかの方法で疾病の原因となっているタンパク質を同定し、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。ヒトゲノム計画の終了によって膨大な数の遺伝子が明らかとなり、この情報から疾病の原因となるタンパク質の機能が解明し、新薬の開発につながった例もいくつか見られるが、まだまだこの機能解明は容易な作業ではない。先述したように、細胞内情報伝達系の全貌はいまだ明らかとなっていないためである。

そこで我々のグループでは、個々のタンパク質の機能が不明のままでも新薬開発につながる情報を得られる手法として、細胞内情報伝達系の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焦点を絞り、これを網羅的に解析する技術の開発を目指して研究を行ってきた。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コンホメーション変化を誘起し活性調節が行われるというものである^{1),5),6)}。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⁷⁾ことから明らかなように、タンパク質リン酸化シグナルは細胞内情報伝達系の至る所で利用されているものであり、この全貌を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。

このような概念に基づき、我々は Fig. 1 に示すペプチドアレイの開発を進めている。PK の基質となるペプチドを数百~数千配列したチップを作製し、細胞破碎液を用いてチップ上でリン酸化反応を行う。ここで蛍光標識リン酸基認識試薬を用いてリン酸基を検出すると、細胞の状態に応じたリン酸化パターンが得られる。このパターンを比較することで、疾病の診断や薬物スクリーニングが可能になると期待できる。以上の概念に基づいて、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、網羅的な解析までは実現できていないものの、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⁸⁻¹⁰⁾。

一方、このペプチドアレイの開発においては課題も多く存在する。その一つが、細胞内夾雑物のアレイ上への非特異的吸着である。これは偽陽性、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。一般的に、この課題を克服する方法としては、ブロッキング剤と呼ばれる非特異

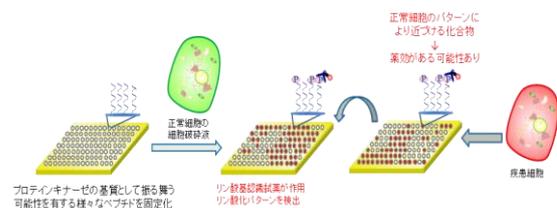


Fig. 1 ペプチドアレイを用いた細胞内リン酸化シグナル網羅的解析の概念図

*九州大学大学院システム生命科学府

**九州大学大学院応用化学部門

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_2 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った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^{11), 12)}。私たちはこのユニークな材料を用いることで、先の課題を解決し、リン酸化シグナルの網羅的解析技術の確立を目指している。

今回はこの酸化チタンが質量分析法において無機マトリクスとして作用するという報告¹³⁾に着想を得て、酸化チタンチップ上のリン酸化ペプチドの検出を質量分析法により行うための具体的な方法について検討したので報告する。質量分析法にはリン酸化ペプチドを標識することなく検出できるという特徴があり、先に述べた偽陽性、偽陰性の発生を抑制できるというメリットも加わるので、このアレイが実現すれば、非常に優れたリン酸化シグナル網羅的解析法となることが期待できる。

2. 実験方法

2-1. 酸化チタン基板の作製および物性評価

酸化チタン基板の作製には液相堆積法 (LPD 法) を用いた。15×25 mm に裁断した無蛍光ガラス基板 (MICRO SLIDE GLASS 白縁磨 No.2、松浪硝子工業株式会社) を中性洗剤、超純水の順にそれぞれ 10 分間の超音波洗浄を行い (超純水は二回)、デシケーター内で乾燥した。続いて、0.04 M チタンフッ化アンモニウム水溶液と 0.12 M ホウ酸水溶液を調製し 25 cm^3 ずつ混合した。この溶液中に洗浄したガラス基板を 3 枚垂直に立て、80 $^\circ\text{C}$ のオイルバス中で 3 時間静置した。その後、基板をデシケーター内で乾燥することで、表面の白濁した TiO_2 基板を得た。

得られた基板の物性評価は、紫外線照射前後における水の接触角測定、走査型電子顕微鏡 (SEM)、原子間力顕微鏡 (DFM モード) による表面観察および薄膜 X 線回折 (XRD) 測定により行った。

2-2. 光切断リンカー(2-bromo-2-nitrophenylacetic acid)の合成

ペプチドアレイ上に固定化されたペプチドを質量分析法で検出するためには、何らかの方法でこれらの化学結合を切断する必要がある。そこで紫外線照射により切断されるリンカーとして 2-bromo-2-nitrophenylacetic acid (BNPA) の合成を行った。

2-nitrophenylacetic acid (東京化成工業株式会社) 25 g を四塩化炭素 (和光純薬工業株式会社) 25 cm^3 に溶かし、塩化チオニル (和光純薬工業株式会社) 40 cm^3 を加え、65 $^\circ\text{C}$ の湯浴中で 1.5 時間還流した。減圧濃縮後、N-プロモスクシンイミド (関東化学株式会社) 30 g と四塩化炭素 125 cm^3 、過酸化ベンゾイル (ナカライテック株式会社) 薬さじ小 2 杯を加え、70 $^\circ\text{C}$ で 4.5 時間還流した。その後、純水 150 cm^3 を加え一晩攪拌した。この溶液にジクロロメタン (和光純薬工業株式会社) を加えて 3 回抽出操作を行い、無水 MgSO_4 (和光純薬工業株式会社) を加え乾燥した。デカンテーションにより溶液を回収後、減圧濃縮し、ジクロロメタン/ヘキサン混合溶液 (体積比 4 : 1) にて再結晶した。析出した結晶の $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い、目的物であることを確認した。

2-3. 基板上へのペプチド固定化方法の検討

TiO_2 には光切断リンカーやペプチドと結合可能な部位がないため、そのままではアレイを作製できない。我々はシランカップリング剤を利用してペプチド固定化部位にのみアミノ基を導入し、これを足場に基質ペプチドを固定化できることを確認している¹²⁾。ここでは、光切断リンカー BNPA を介して、N 末端に Cys 残基を有する基質ペプチドの固定化が可能か確認するため、蛍光によりアミノ基の有無を確認できるフルオレスカミンおよび基質ペプチドのモデル物質である 2-aminoethanethiol を用いて実験を行った。具体的な手順を以下に示す。

BNPA 2 mmol、塩化チオニル 1 cm^3 、ジクロロメタン 10 cm^3 を混合し、2 時間静置して BNPA を酸クロライド化した。この溶液 1 cm^3 にピリジン (和光純薬工業株式会社) 15 μl を加えたものをアミノ基修飾ガラス基板に展開し、2 時間静置した。その後、ジクロロメタン中で 5 分間の超音波洗浄を行い、余剰物質を除去した。

続いて、2-aminoethanethiol (東京化成工業株式会社) 2 mmol と pH 7.4 の緩衝溶液 10 cm^3 を混合し、このうち 1 cm^3 を上記手法で作製した基板上に展開し、2 時間静置した。その後、緩衝溶液中で 5 分間超音波洗浄を行い、余剰物質を除去した。

各段階で期待通り反応が進行したかどうかは、洗浄後の各基板をフルオレスカミン/アセトニトリル溶液で処理し、蛍光分光装置を用いて確認した。

2-4. 酸化チタン基板上に固定化したリン酸化ペプチドの質量分析

酸化チタン基板への基質ペプチドの固定化は、シランカップリング剤を用いたアミノ基導入と実験方法 2-3. で述べた手法を組み合わせて行った。使用した基質ペプチド配列は Ac-CGGLRRApSLGW-NH₂ (pS はリン酸化 Ser の意) で、理論分子量は 1296.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ である。

質量分析は以下の手順で行った。作製したペプチド固定化酸化チタン基板に、出力 1.25 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ の UV ライトガンを用いて 3 分間紫外線照射を行い、リンカーの光切断を行った。マトリクスとして飽和 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) 溶液 2 μl をペプチド固定化部位にスポットし、乾燥した後、質量分析用ステンレスプレート (MTP 384 target plate polished steel BC、BRUKER 社) のくぼみ部分に張り付けた (Fig. 2 の左上位置)。これを質量分析装置



Fig. 2 質量分析用プレート (TiO_2 基板貼付済)

(MALDI-TOF-MS autoflexTM series、BRUKER 社、レーザー周波数 2 kHz、レーザー焦点直径 10 μm、N₂ガスレーザー波長 335 nm) にセットし、ペプチドの質量分析を行った。比較として、質量分析用ステンレスプレート上にも同様の操作でペプチドを固定化し、質量分析を行った。

3. 実験結果および考察

3-1. 酸化チタン基板の物性評価

作製した酸化チタン基板の SEM 観察、DFM 観察結果を Fig. 3 に、薄膜 XRD 測定の結果を Fig. 4 に示す。SEM 画像から 200 nm 程度の微粒子が表面を覆っている様子が確認できた。また DFM 画像より、これらの微粒子がさらに小さな微粒子の集まったものであることを確認できた。一方、XRD 測定の結果から、基板表面にアナターゼ相の酸化チタン結晶が存在していることが示された。

続いて、作製した酸化チタン基板の機能面を評価するために、市販のブラックライトを用いて照射強度 500 μW・cm⁻² で 15 分間紫外線を照射し、照射時間 5 分ごとに基板表面における水の接触角を測定した。結果を Tab. 1 に示す。基板 A、B、C は同条件で調製した酸化チタン基板である。いずれも紫外線照射 10 min で、接触角が 10° 以下となり、表面が超親水化していることが示された。以上の結果から、基板表面にアナターゼ型酸化チタン微粒子が析出し、十分な性能を発揮することが確認できた。

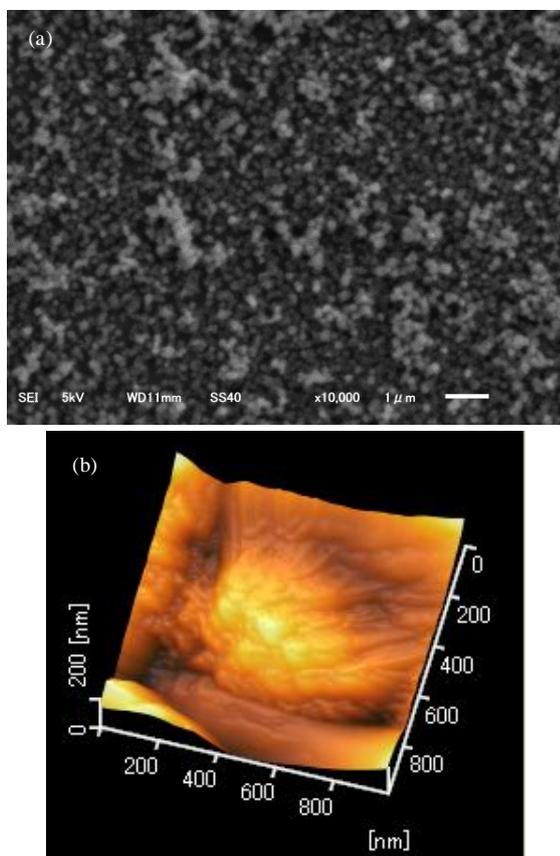


Fig. 3 調製した TiO₂ 基板の (a)SEM 画像 (b)DFM 画像

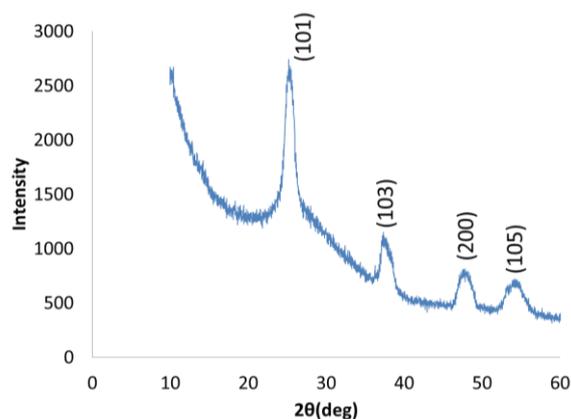


Fig. 4 TiO₂ 基板の薄膜 XRD 測定結果

Tab. 1 TiO₂ 基板表面の水の接触角

基板	紫外線照射前	紫外線照射後		
		5 min	10 min	15 min
A	41.22°	16.52°	3.02°	0°
B	37.30°	14.79°	5.88°	0°
C	37.26°	19.56°	9.85°	0°

3-2. 光切断リンカー-BNPA の合成結果

薄黄色の粉末状固体が得られ、収率は 20%であった。¹H-NMR 測定結果を Fig. 5 に示す。全てのピークを Tab. 2 の通り帰属できたことから、得られた結晶が BNPA であることを確認した。

Tab. 2 ¹H-NMR 帰属

ピーク位置	ピーク分裂	面積比	帰属*
6.1 ppm	s	0.94	D
7.5~7.8 ppm	t, t	1.00, 0.99	B, B
7.9~8.1 ppm	d, d	0.95, 0.87	C, A

*記号は Fig.5 挿入図に対応

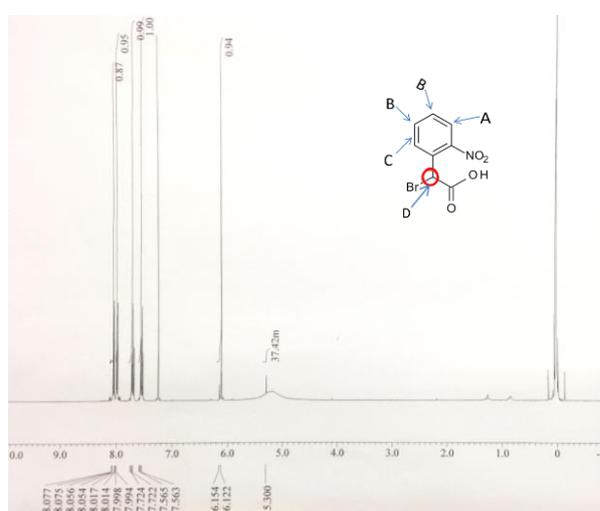


Fig. 5 合成物の ¹H-NMR チャート

3-3. 基板上へのペプチド固定化方法の検討

フルオレスカミンは無蛍光物質であるが、アミノ基に結合すると蛍光を発するので、この官能基の検出試薬として利用できる。この性質を利用して、基板に BNPA が固定化されたか検討した。結果を Fig. 6(a) に示す。図中 A はアミノ基修飾ガラス基板をフルオレスカミンで処理したものであり、465 nm を極大とする蛍光が観測された。一方、図中 B はアミノ基修飾ガラス基板を BNPA 酸クロライド、フルオレスカミンの順に処理したもの、図中 C はフルオレスカミン未処理基板の蛍光スペクトルである。BNPA 酸クロライドで処理するとフルオレスカミンの蛍光は全く観測されない。従って、基板上の全てのアミノ基に BNPA が結合していることが示された。

続いて、BNPA 酸クロライド処理後の基板に 2-aminoethanethiol、フルオレスカミンの順に処理し、2-aminoethanethiol がチオール基を介して BNPA に結合できるか確認した。結果を Fig. 6(b) に示す。図中 D が 2-aminoethanethiol 処理後、図中 E が処理前の蛍光スペクトルである。フルオレスカミンの蛍光が再び観測されたことから、基板上にアミノ基が復活したことが示され、BNPA リンカーに 2-aminoethanethiol のチオール基が結合することを確認できた。実際に固定化するペプチドは N 末端に Cys 残基を有し、その側鎖にチオール基が存在するので、今回と同様の方法で基板上に固定化することができる。

3-4. 酸化チタン基板上に固定化したリン酸化ペプチドの質量分析

固定化したリン酸化ペプチド (M.W. 1296.4) が質量分析により検出できるか検討した。結果を Fig. 7 に示す。いずれの条件でもリン酸化ペプチドに由来するピークが観測できた。これは光切断リンカーである BNPA が紫外線照射に

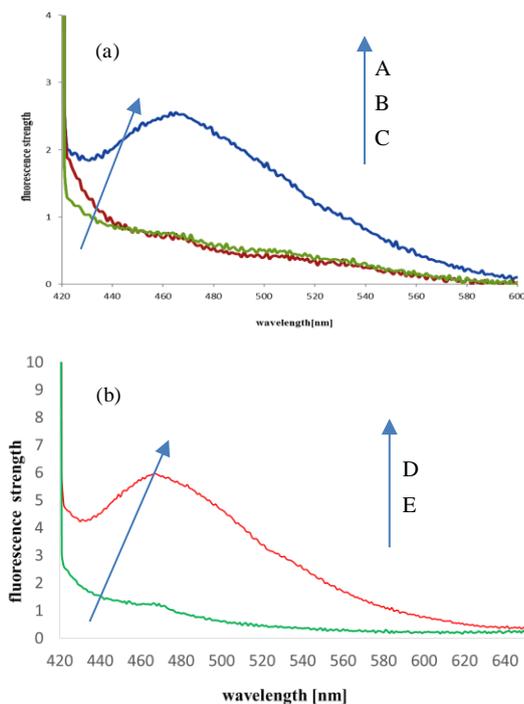


Fig. 6 フルオレスカミン処理後の蛍光スペクトル
(a)BNPA 処理後 (b)2-aminoethanethiol 処理後

より分解し、基板上に固定化していたリン酸化ペプチドが質量分析装置内の検出器まで到達したことを意味する。しかしながら、ピーク強度 (グラフの縦軸) を比較すると、酸化チタン基板は質量分析用プレートに直接固定化したものより感度の面で劣ることが分かった。この原因としてまず考えられたのが、マトリクスである CHCA 溶液を基板上にスポットした際、質量分析プレートではその位置に留まるのに対して、酸化チタン基板では広がってしまったため、単位面積当たりの CHCA 量が少なくなってしまった点である。CHCA 溶液の溶媒は、水とアセトニトリルを体積比 1:1 で混合したものである。そこで、この比率を変更して、酸化チタン基板上で液滴が留まる条件を探索したところ、4:3 が最適な割合であることが分かった。ただし、1:1 溶液と比較して CHCA の溶解量が減少してしまったので、前処理時のスポット回数を 3 回に増やすことで補うこととした。

この条件で再度質量分析を行った。結果を Fig. 8 に示す。期待した通り、CHCA 溶液を最適化したことで、ペプチドのピーク強度はおおよそ 2.5 倍に上昇した。しかしながら、質量分析プレートに固定化した時と比較すると、検出感度は低いままであった。これは当初想定していたように酸化チタンが無機マトリクスとしてうまく作用していないことを示しており、この点を改善することが今後の課題として挙げられる。

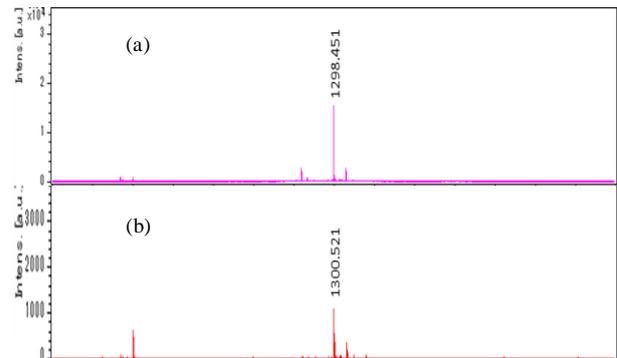


Fig. 7 各基板の質量分析スペクトル
(a)質量分析用プレート (b)TiO₂ 基板

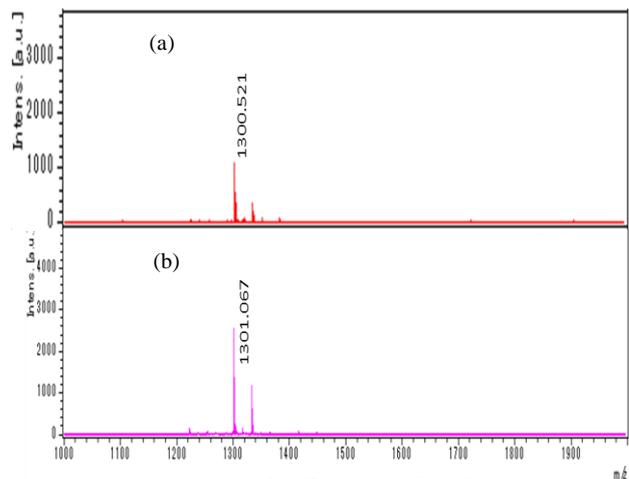


Fig. 8 CHCA 溶液最適化後の質量分析スペクトル
(a)体積比 1:1 (b) 体積比 4:3

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を作製し、質量分析法による固定化ペプチドの検出を試みた。酸化チタン基板は LPD 法で調製し、アナターゼ型の結晶構造を有していること、紫外線照射により光誘起超親水化現象を発現することを確認した。

一方、固定化した基質ペプチドと基板の結合を切断するための物質として光切断リンカー-BNPA を合成し、これを用いた固定化方法を検討した。フルオレスカミンを用いた基板上アミノ基の蛍光検出法により、BNPA を介して基質ペプチドを固定化できることを示した。

最後に上記方法に従って実際にペプチドを固定化した基板を作製し、質量分析を行った。その結果、固定化したペプチドの検出に成功した。しかしながら、検出感度の面で酸化チタン基板は質量分析用プレートよりも劣ることも示された。これは酸化チタンが期待通り無機マトリクスとして作用しなかったためと考えられ、この点を改善することが今後の課題となった。酸化チタンが吸収した光エネルギーがペプチドのイオン化に効率よく使われるようにすることが必要であり、そのためには酸化チタンの調製方法を最適化することが重要であると考えられる。

ただし、私たちがすでに報告しているように、酸化チタンには非特異的吸着物を除去できる優れた性質があり^{11), 12)}、細胞破碎液などの実サンプルを用いて基板上でリン酸化を行った際には、質量分析プレートよりも良い結果を示す可能性が高い。今回の課題を克服できれば、本手法の有用性は十分に示すことができると期待している。

5. 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)(24710137)の助成を受けた。また、酸化チタン基板を質量分析プレートにセットするための加工は、本校教育研究支援室の協力により実現した。ここに謝意を表す。

6. 参考文献

- 1) Higashi, H., Sato, K., Ohtake, A., Omori, A., Yoshida, S., Kudo, Y., *FEBS Lett.*, **1997**, *414*, 55
- 2) 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**.
- 3) 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**.
- 4) Kalo, M. S., Pasquale, E. B., *Biochemistry*, **1999**, *38*, 14396
- 5) Gamboni, S., Chaperon, C., Friedrich, K. Baehler, P. J., Reymond, C. D., *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12189
- 6) Macala, L. J., Hayslett, J. P., Smallwood, J. I., *Kidney Int.*, **1998**, *54*, 1746
- 7) 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
- 8) S. Shigaki, T. Yamaji, X. Han, G. Yamanouchi, T. Sonoda, O. Okitsu, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, *Anal. Sci.*, **2007**, *23*, 271-275.
- 9) K. Inamori, M. Kyo, K. Matsukawa, Y. Inoue, T. Sonoda, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, *BioSystems*, **2009**, *97*, 179-185.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Y.-C. Chen et al, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 1453-57.

(2017 年 11 月 6 日 受理)