

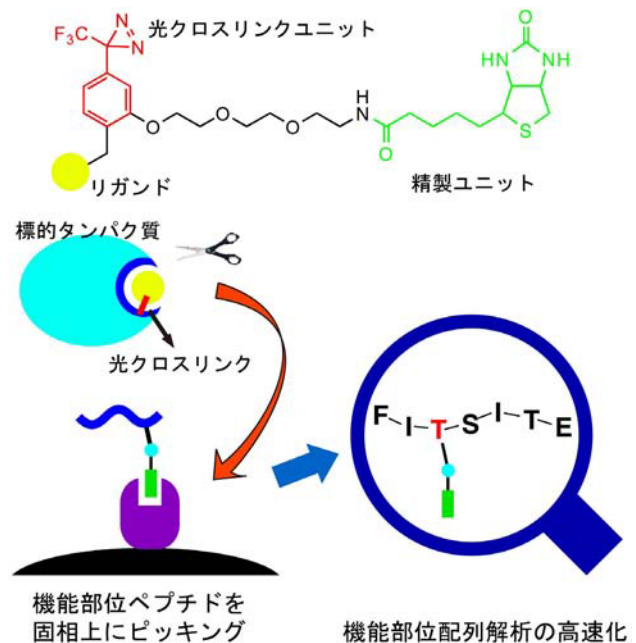
[紫]・ヘテロ接合体 [緑] を明確に判別できた (図 6 下の表。遺伝子の略記: 扁平上皮癌 [ADH]、2 型糖尿病 [CDK]、骨関節炎 [DVWA]、肺癌 [p53])。以上のように、採取した検体 DNA に修飾を施す必要なく、電気化学測定を 1 回行うだけで、SNPs に関する遺伝子型情報を簡便に取得できるようになった。

加えて、ナノオーダーで平らな表面をもつ電極の作製法を、富山大学、田中貴金属工業 (株) 共同で開発した (図 7)。従来使用していたプラスチック基板電極の表面は、金ナノ粒子が緻密に並び起伏に富んだ構造をしていることが分かった (図 7 中央)。そこで、高温処理することで表面粒子の再結晶を促し、平滑な単結晶面を表面に露出させることにした。高温処理に耐えるよう石英ガラス基板を用い、スパッタリング後およそ 500 °C で処理した結果、ナノレベルで平滑な面を得ることができた (図 7 右)。このような原子・分子レベルで平滑な電極を用いることで、電気化学測定における高い測定再現性が約束され、より信頼性の高い SNPs 検出法へと展開することができた。

### ・光応答タンパク質プローブの最適化

本課題の独自技術シーズである光プローブは、解析対象のタンパク質のみを釣り上げ解析できる特徴を持つ (図 8)。本プローブの最適化により、難結晶性タンパク質の構造解析に NMR とは別の化学的解析ルートを開拓することを目的とする。原型のプローブは、釣り上げ機能に微量検出機能を併せ持つ多機能型であり、タンパク質解析ツールとして研究者に広く認められていた。光照射のみでタンパク質機能部位に特殊タグを導入でき、これを釣り上げることで、原理的にはタンパク質の機能構造解析がきわめて短時間に達成できる。しかし、微量タンパク質へ実際に応用するには、これまで有効な手段を欠いていた、極微量ペプチド操作時の試料ロス軽減が必須であり、これを主眼とするプローブ最適化の研究が不可欠となる。

そこで、光応答タンパク質プローブの研究においては、微量なペプチドを扱う技術の開拓を目的として、プローブおよび精製システムの簡略化を主眼に検討した。本プローブを用いる光クロスリンク法は膜タンパク質に有効な数少ない技術の 1 つであり、多くの薬物受容体に適応できる。本プロジェクトでは、薬物副作用と変異の関連が高いタンパク質として ATP 結合性タンパク質を念頭に、その主要なリガンドの光プローブ化を進めた。光反応性の核酸やアミノ酸は一般性・汎用性が高く有用なため、まずこれらの光プローブ化を進めた。さらに、解析過程の高速化をはかるため操作性に優れた固相を導入し、ポリプロピレン固相を用いた脱着 (切断) 系と金固相を用いた固定系のデバイス開発を進めた。



Hatanaka, Y. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102, 2796.

図8. 既存精製技術: 精製及び検出用タグであるビオチンが付随した光クロスリンカーは、結合タンパク質や結合部位同定に至るプロセスを簡略化できるため、世界中の研究者に多機能部位解析ツールとして用いられている。

解析過程の高速化には、光反応性に加えてプローブに複数の機能を組み込むことは必須である。しかし、多機能化に伴ってプローブサイズが大きくなり一般にはプローブの親和性は低下する。これらの点を考慮して、図9に作成した核酸(ATP)プローブを設計した。このプローブはATPとしての認識機能や光クロスリンク能の他に、分子内の三リン酸構造が金属キレートを利用して検出・脱着も可能なため、光プローブへの誘導は最小限に抑えられる。しかもリン酸アミド結合は酸分解可能であり、質量分析のシグナルシフトにより解析が容易な利点も有する。この金属キレート脱着系の導入で、タンパク質レベルでは大幅な解析の高速化を達成した。しかし、タンパク質をペプチドに断片化し、その中からプローブが捕捉した機能部位ペプチドを選別する次段階では、わずかながら精製固相表面へ非特異的吸着が観察され、目的とする微量化には限界があった。この改良のため、図10に示すタンパク質の捕捉からペプチド断片化、捕捉ペプチドの再遊離までが一貫して固相上で行うシステムを構築し、固相に共有結合で捕捉できる優位性を生かして徹底洗浄で問題の非特異的吸着除去を図った。プリプロピレン表面に新しい切断機能構造を導入し、そこに光反応性核酸プローブを導入して精製用切断性固相を作製した。ヘキソキナーゼの光捕捉から断片化、捕捉ペプチドの取得までを1日程度で行える、画期的デバイスの開発に成功した。この結果、最も困難な過程である解析対象のペプチド捕捉・精製において、飛躍的な簡便・効率化をもたらした。さらに、切断機構が全く異なる新しい光反応性アミノ酸の開発にも成功し、種々の生理活性ペプチドに応用できる効率系への道も拓いた。

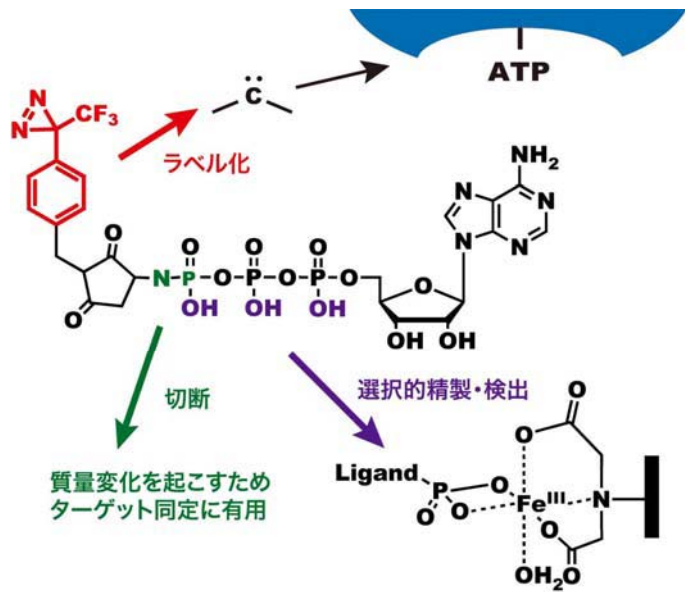


図9. 多機能性ATP光プローブの構造と機能：ATP $\gamma$ 位に光反応基を導入したシンプルな構造ながらも、タンパク質認識、検出、精製部位を有し、さらに質量分析に有利な切断機能も有する。

タンパク質レベルでは大幅な解析の高速化を達成した。しかし、タンパク質をペプチドに断片化し、その中からプローブが捕捉した機能部位ペプチドを選別する次段階では、わずかながら精製固相表面へ非特異的吸着が観察され、目的とする微量化には限界があった。この改良のため、図10に示すタンパク質の捕捉からペプチド断片化、捕捉ペプチドの再遊離までが一貫して固相上で行うシステムを構築し、固相に共有結合で捕捉できる優位性を生かして徹底洗浄で問題の非特異的吸着除去を図った。

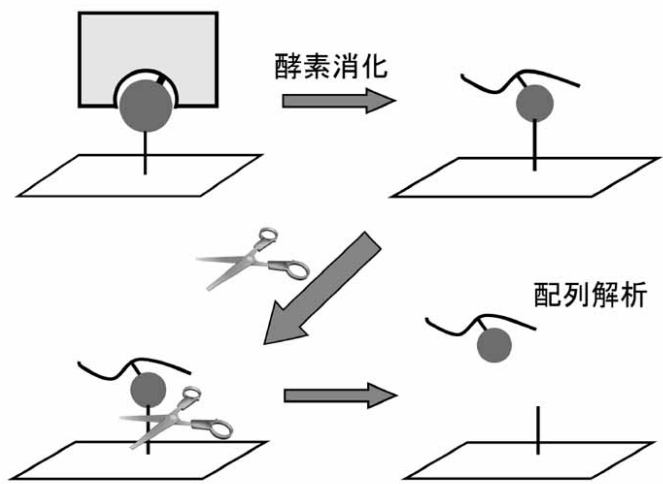


図10. 切断型固相デバイスのアウトライン

以上の結果を踏まえ、さらに微量化が実現可能な金固相デバイス上での技術開発を検討した。金固相へのプローブ構築はナノテクノロジー関連で多くの応用例があり、チオール基を介して簡便に行う方法が確立している。この固定チオール化合物はレーザーにより脱離することが最近の研究で明らかになった。すなわち、先のポリプロピレン固相のように解析ペプチドを質量分析基板に移し換ええる操作（サンプル消失頻度が最も高い）を必要とせず、捕捉基板で直接解析できる点で技術的ブレークスルーが見込める。この方法実現により、プローブ固定から質量分析までの全ての操作を質量分析用基板の上で行うことが

可能になり、著しく高い操作性を備える前例のない高速解析系の開発へと発展できる。金固相については田中貴金属工業（株）と共同しガラス基板およびステンレス基板（一般的なMALDIターゲット）を用いた。ガラス基板はMALDI測定のために導電性のITOコーティングを施し、その上に金を成膜して質量分析用デバイスを作製した。ガラス基板は安価であり操作性も高い。また、ステンレス基板は市販のMALDI質量分析用ターゲット上にそのまま金のコートが可能であり、汎用性が高いので必要に応じて使い分け可能である。

このシステムでは、当面は既存のMALDI質量分析計の規格に合わせるため、捕捉面積がポリプロピレン固相からさらに狭くなるため、結合能力が高い光プローブを用いる必要が有る。このため、先に有効であったATP光プローブより結合定数が高いリガンドとして、抗がん剤として有望なゲルダナマイシンを用いて、新たに光プローブを作成し一連の操作を検証した。

プローブ導入にあたっては、金表面への非特異的吸着を抑えるため、末端にエチレングリコールを持つアルカンチオールでSAM（自己組織化単分子膜）加工し、その中にプローブを混在させる形で膜表面に結合させた（図11）。

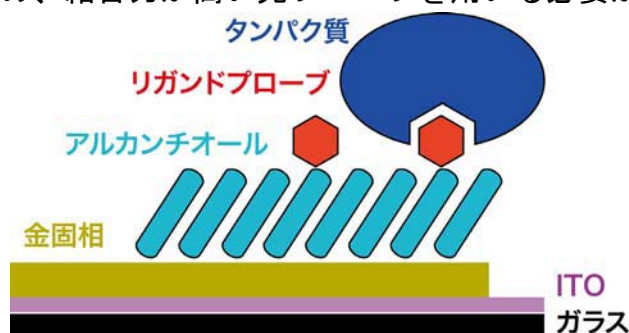


図11. ガラス基板を用いた解析デバイス：ガラス基板の上にITOコーティングし、金薄膜を蒸着。PEG型アルカンチオールによるSAMと共にプローブを構築し、光クロスリンクで結合タンパク質をトラップする。

その結果、金固相上へのプローブの立ち上げ、光照射によるペプチドの捕捉・精製、MALDI質量分析機による直接脱離・検出に成功し（図12）、解析デバイスとして実用可能であることが判明した。以上、プローブ構築から捕捉、断片化、精製、解析に至る一連の操作を同一固相上で行うことで、実験操作に伴うロスをも最小限に抑えつつ短時間に解析できるシステムを構築した。

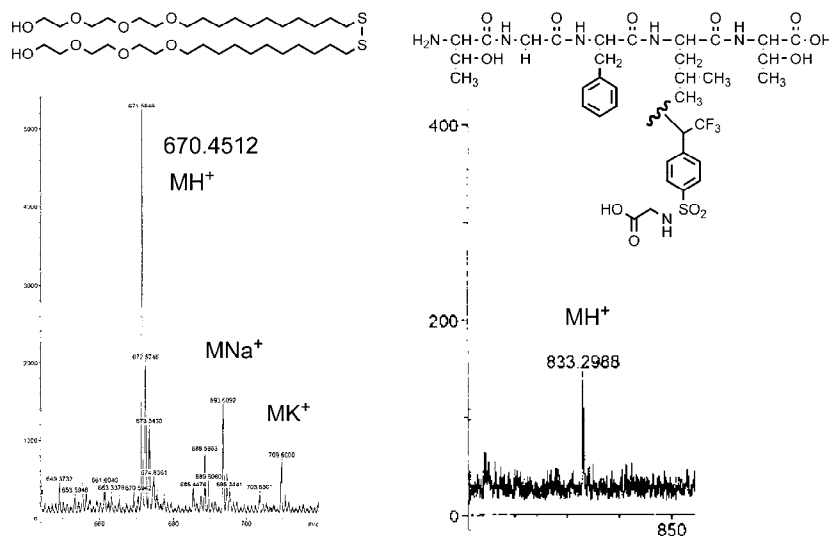


図12. 金基板を用いたMALDI試料分析結果：左は金上にSAM化したアルキルチオールのレーザー脱離産物、右は光固定したペプチドのMALDI-MSシグナル

最後に、最適化したそれぞれのプローブを併用して、「薬剤投与前副作用検出システム」のプロトタイプを実践した。抗がん薬として現在臨床試験中のゲルダナマイシンに光反応基を搭載した光応答タンパク質プローブを作成し、図1に示した模式図に沿って、薬剤作用部位のSNPs検出システムを稼働させた。SNPsと副作用との関連付けは現時点において不明瞭ではあるものの、今後臨床試験で得られる情報と双方向で照合することで、我が国発のDNA—タンパク質相関機能部位解析システムが誕生する。今後は、このシステムを様々な薬剤に対して展開することで、本方法の有用性と一般性の範囲が確立していく。