

新しい
分子生物学の手法
センサーチップを用いた蛋白質の機能解析

戸田年総*, **



- ①ヒトゲノム DNA の全塩基配列が解読されたことにより、今後は蛋白質の機能解析に軸足が移される。
- ②蛋白質の機能の多くは、ほかの蛋白質や生体分子との相互作用によって発揮されており、機能を解明するためには蛋白質相互作用解析をおこなうことが重要である。
- ③蛋白質相互作用には複合体形成のような強く安定な結合をするものと、酵素と基質、レセプターとリガンドのように弱くて可逆的な結合をするものがある。
- ④蛋白質相互作用解析をおこなうためのさまざまな装置がすでに数多く開発されており、研究の目的や対象によって最適なシステムが選べるようになってきている。
- ⑤センサーチップを用いた蛋白質相互作用解析は、今後のプロテオーム創薬研究において威力を発揮するものと期待される。

Key Word/プロテインチップ, プロテオミクス, 機能解析, 蛋白質相互作用, センサーチップ

● はじめに

1986年に提言され、1991年にスタートした国際ヒトゲノム解読計画¹⁾²⁾は、当初の予測を大幅に上回る速度で解読が進んだ結果、20世紀最後の年にあたる2000年に全体の9割に相当する領域のドラフトシーケンス解読終了が国際コンソーシアムから発表され、また2001年には『Nature』誌³⁾と『Science』誌⁴⁾にその概要が報告された。そして奇しくもワトソンとクリックがDNAの二重らせん構造を解明してからちょうど50年の節目にあたる2003年に、この計画に参加した米国、イギリス、日本、フランス、ドイツ、中国の6カ国の政府機関によって、ヒトゲノムDNAの全塩基配列の解読完了が宣言

された。これにより、今後は特定の遺伝子の異常によって引き起こされる遺伝病や家族性の疾患、複数の遺伝子多型が発病のリスクを左右する生活習慣病などの原因解明に弾みがつくものと期待されている。

理屈のうえでは、DNAの塩基配列が明らかになれば蛋白質の一次構造が判明し、それによってコンフォメーション(立体構造)が明らかとなり、最終的に機能が特定できるはずである。しかし現実はその簡単な話ではなく、ヒトゲノムDNAの全塩基配列の解読を完了したことによってすべての蛋白質の機能が即時的に明らかになるわけではない。多くの蛋白質は翻訳後にさまざまなプロセッシングや修飾を受けており、これによって32,000の遺伝子から10万種以上の蛋白質がつけられ、各種の生物

* TODA Tosifusa/財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究グループ、** TMIG プロテオーム共同研究センター

機能が調節されている。ゲノム DNA の塩基配列から直接翻訳後の蛋白質の挙動を推定することは困難であり、やはり蛋白質の真の機能を解明するためには、これを直接調べるのが必須である。

1 DNA チップとプロテインチップの違い

文字どおり、チップで解析される分子が前者では DNA、後者は蛋白質であるのは当然のことであるが、それ以上に DNA チップとプロテインチップには大きな違いが生じてくる。DNA チップの場合、チップ表面にプローブとして固定化される分子は比較的短い DNA 断片、もしくは合成オリゴヌクレオチドである。これに対しプロテインチップの場合は、蛋白質自身をプローブとすることもあるが、とくに最近、臨床的応用においてよく利用されるようになっている surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) 法にみられるように、標的蛋白質に親和性のある低分子物質や、荷電をもったイオン交換基、長鎖脂肪酸のような疎水性物質などさまざまな分子がプローブとして使われている^{5)~7)}。これは DNA チップの使用目的が特定の塩基配列を有する DNA の検出にかざられるのに対して、プロテインチップでは蛋白質-蛋白質間の相互作用のほか、各種の調節分子と蛋白質との相互作用が解析の対象となるためである。

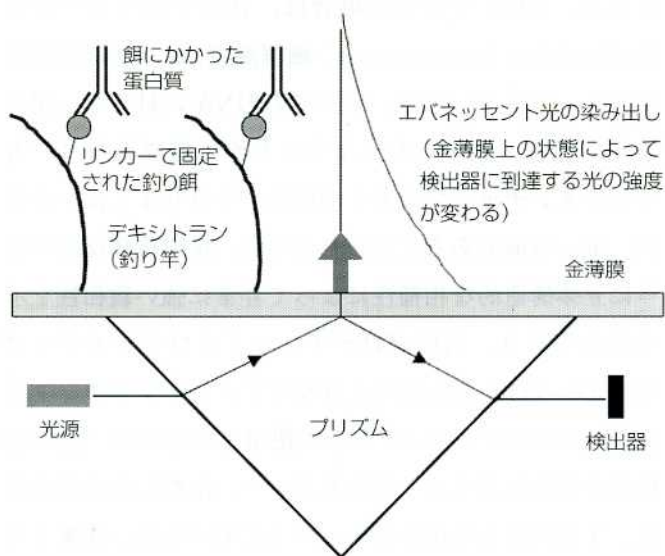
両者の違いはチップの使用条件の設定にもあらわれる。DNA チップにおいては、相補的塩基配列に対する水素結合の熱力学的安定性のみが作用するので、理論的な親和性とチップ上でみられる実際の親和性とのあいだには大きな差はあらわれない。これに対しプロテインチップの場合の相互作用においては、①イオン性解離基の電氣的吸引力、②水素結合による吸引力、③疎水結合的な吸引力、④キレート的な性質による吸引力、⑤立体構造的な嵌まり込みによる吸引力など、さまざまな要因が絡みあっており、これらが①緩衝液の塩濃度、②温度、③有機溶媒濃度、さらには蛋白質のフォールディングの状態によってもいろいろな変化をすることから、チップ上で実際の親和性を理論的に推定することは困難である。このことは、マイクロアレイタイプのプロテインチップを作成する際の吸着条件の設定において大きな問題

となる。DNA チップの場合は、使用するプローブの T_m (melting temperature: 融解温度) が一定の範囲内にそろってさえいれば、すべての DNA に対して一定の条件で吸着・洗浄をおこなうことが可能である。一方プロテインチップでは多くの場合、そううまくはいかない。唯一可能であると思われるのは、抗原抗体反応のように立体構造的な相補性によって非常に強い親和性を示す場合であり、当面プロテインマイクロアレイチップ (SELDI-TOF-MS 法のようなマイクロアレイチップを除く) においてプローブとして使用されるのは一部の抗体にかざられるものと思われる^{8)~10)}。ただしこの場合にも、①どのような抗体をチップ上に並べるか、②多くの種類の抗体をどうやってつくるか、といった課題がある。①については、二次元電気泳動・画像解析などによるディファレンシャルディスプレイによって、より多くの病態マーカー蛋白質を見つけ出すことが先決であり、②についてはリコンビナント抗体の作成など、短期間に多種類の抗体を網羅的に作成できる仕組みづくりをおこなうことが重要なカギを握るものと考えられる。

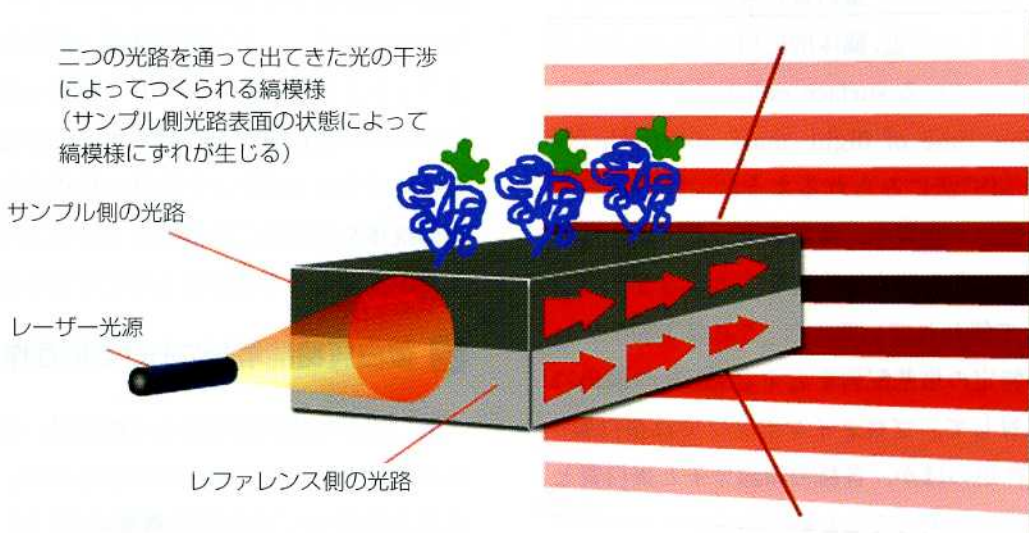
2 蛋白質機能解析における相互作用分析の意義

蛋白質が生体内ではたらく際には、何らかのかたちでほかの分子と相互作用をおこなうため、その作用を調べることによって蛋白質の機能の糸口を得ることができる。たとえばホルモンのはたらきをする蛋白質の場合には、細胞の表面にあるレセプター蛋白質に特異的に結合する性質をもっており、一方でリボソーム蛋白質やプロテアソーム蛋白質のように複数の蛋白質が複合体を形成してはたらくもの場合には、ほかの構成成分と強く結合する性質をもっている。また酵素蛋白質の場合には、基質となる分子や、活性を調節する分子をその構造のなかに取り込んでコンフォメーションを変化させることにより化学反応を触媒するので、どのような分子と相互作用をおこなうかがわかれば、それを手がかりとして機能を推定することが可能となる。したがって今後は、このように蛋白質間、および蛋白質と低分子物質との相互作用をより高感度で短時間に分析できる新しい技術への期待がますます高まっていくものと考えられる。

ただし、細胞内で機能的かつ調節的におこっている蛋



図① 「表面プラズモン共鳴」センサーの基本構造(筆者作成)
 ガラスの表面に蒸着された金薄膜に臨界角を超える角度で入射した光は大部分が全反射によってセンサーに到達するが、一部はエバネッセント光として金属薄膜から染み出し、表面の蛋白質などに共鳴吸収される。これによってセンサーに到達する光の強度に変化が生じる。



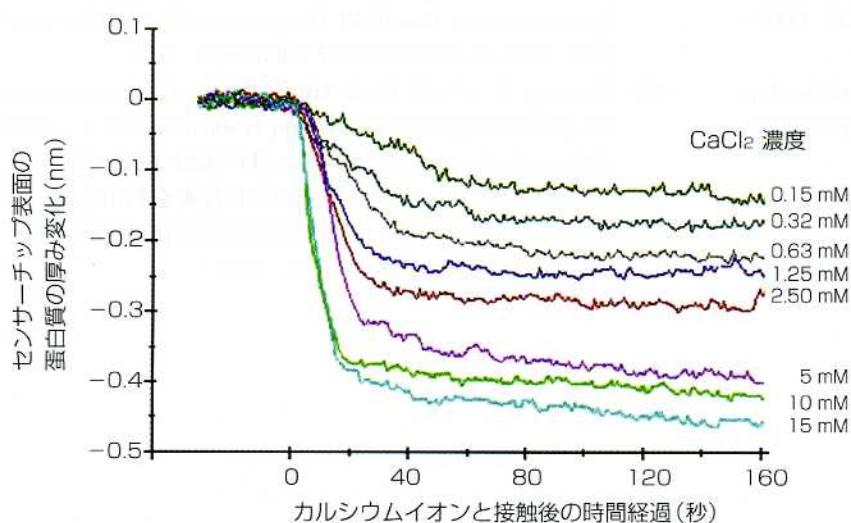
図② 「二面偏波式干渉計型」センサーチップの基本構造(中村徳雄¹³⁾ より一部改変して引用)
 レファレンス側とサンプル側の光路を通ったレーザー光(偏波)は、ちょうど二つのスリットを通った光のように干渉縞をつくる。このときサンプル側の光路表面の蛋白質にエバネッセント光が吸収され、サンプル側の光路を通るレーザー光の位相に変化が生じて、これが干渉縞のずれとなってあらわれる。

蛋白質相互作用は抗原抗体反応のように強くはないので、同一の条件で多数の蛋白質間の親和性を同時に解析できるマイクロアレイ方式のプロテインチップをつくることは容易でない。蛋白質の機能解析を目的とする場合には、むしろチャンネル数の少ないセンサーチップ方式の装置のほうが有利であるように思われる。

③ センサーチップによる蛋白質相互作用分析

蛋白質相互作用をリアルタイムで分析できるセンサーチップとして最も早く実用化された「表面プラズモン共

鳴¹¹⁾¹²⁾ センサーチップは、図①のような構造のものである。金などの薄膜を蒸着したプリズムに臨界角以上の角度で光を入射すると、エバネッセント波が金薄膜を通過して外側に染み出してくる。このときエバネッセント波が到達する範囲内において蛋白質の相互作用による質量変化がおきると表面の屈折率が変化し、これが反射光の強度変化として捉えられる。表面プラズモン共鳴センサーチップを利用した相互作用分析装置としては、BIA-CORE 社や日本レーザー電子株式会社、テキサス・インスツルメンツ社などからすでに多くの製品が市販されて



図③ 「二面偏波式干渉計型」センサーチップの表面にトランスグルタミナーゼを固定化し、種々の濃度のカルシウム液を通したときのセンサー表面における蛋白質の厚みの変化 (筆者作成)

この結果はカルシウムによってトランスグルタミナーゼのコンフォメーションが変化したことを示している。

おり、広く利用されている。

しかし、このセンサーにもいくつかの課題が残されている。たとえば表面プラズモンを利用するには金属薄膜が必要であるが、金属表面は蛋白質の吸着性が高いため、生理的な立体構造を維持した状態のまま蛋白質を金属薄膜に直接固定することは困難である。多くの場合、デキストラン線維を芝生のように金属表面に生やし、それにプローブを固定するという間接方式が取られる。そのため蛋白質のコンフォメーション変化のように微小な変化を検出することは困難である。

これに対して、まったく異なる原理による「二面偏波式干渉計型」センサーチップ(図②)を用いた蛋白質相互作用解析装置が、最近新たに開発された。原理については、イギリス Farfield Sensor 社の装置 (AnaLight® Bio200) を取り扱っている成書¹³⁾ のなかで詳しく紹介しているので、ここでは特長と応用例について簡単に触れるにとどめる。

表面プラズモン共鳴センサーの場合は蛋白質を固定化するのにデキストラン線維を用いているのに対し、二面偏波式干渉計型センサーチップでは、図②のような2層になったガラスの表面に導入されたアミノ基などの官能基に、BS3 などの架橋試薬を介して蛋白質を直接固定することができる。このため、低分子物質の結合などのようにわずかな質量変化でも検出することができる。また密度のほか、センサー表面の蛋白質の厚みと密度の微小な変化を直接捉えることができるので、たとえばトランスグルタミナーゼにカルシウムが結合する場合のよう

に、表面プラズモン共鳴センサーでは検出が困難なコンフォメーションの変化を捉えることもできる(図③)。このことは、さまざまな機能性蛋白質とその調節因子との相互作用の測定などにも利用できることを意味しており、今後、創薬研究などにおいて威力を発揮するものと期待される。

文 献

- 1) Lewin R : National Academy looks at human genome project, sees progress. *Science* 235 : 747-748, 1987
- 2) McKusick VA : HUGO news. The Human Genome Organisation : history, purposes, and membership. *Genomics* 5 : 385-387, 1989
- 3) Lander ES *et al* : Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 : 860-921, 2001
- 4) Olivier M *et al* : A high-resolution radiation hybrid map of the human genome draft sequence. *Science* 291 : 1298-1302, 2001
- 5) Davies H *et al* : Profiling of amyloid beta peptide variants using SELDI Protein Chip arrays. *Biotechniques* 27 : 1258-1261, 1999
- 6) Dayal B *et al* : ProteinChip technology : a new and facile method for the identification and measurement of high-density lipoproteins apoA-I and apoA-II and their glycosylated products in patients with diabetes and cardiovascular disease. *J Proteome Res* 1 : 375-380, 2002
- 7) Cordingley HC *et al* : Multifactorial screening design and analysis of SELDI-TOF ProteinChip array optimization experiments. *Biotechniques* 34 : 364-365, 368-373, 2003
- 8) Kojima K *et al* : Electrochemical protein chip with arrayed immunosensors with antibodies immobilized in

- a plasma-polymerized film. *Anal Chem* **75** : 1116-1122, 2003
- 9) Wang CC *et al* : Array-based multiplexed screening and quantitation of human cytokines and chemokines. *J Proteome Res* **1** : 337-343, 2002
- 10) Senior K : Fingerprinting disease with protein chip arrays. *Mol Med Today* **5** : 326-327, 1999
- 11) Morgan H *et al* : A surface plasmon resonance immunosensor based on the streptavidin-biotin complex. *Biosens Bioelectron* **7** : 405-410, 1992
- 12) Jonsson U *et al* : Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11** : 620-627, 1991
- 13) 中村徳雄 : 二面偏波式干渉計(DPI)技術を利用した低分子と蛋白質の相互作用および高次構造変化のリアルタイム測定. 臨床検査(増刊号) **47**, 2003