

研究タイトル:

細胞内リン酸化シグナル網羅的解析法の開発



氏名:	園田 達彦 / SONODA Tatsuhiko	E-mail:	sonoda@kct.ac.jp
職名:	准教授	学位:	博士(工学)
所属学会・協会:	日本化学会, 日本分析化学会, 化学とマイクロ・ナノシステム研究会		
キーワード:	ペプチド, ペプチドアレイ, リン酸化シグナル, 質量分析, 酸化チタン		
技術相談 提供可能技術:	<ul style="list-style-type: none"> ・ペプチド合成・精製 ・生体関連物質の評価 ・ 		

研究内容:

細胞内リン酸化シグナルは細胞内における主要な情報伝達手段である。従って、ある刺激に対するリン酸化シグナルの変化を総体で捉えることができれば、それは細胞の状態変化と密接な関連があると予想される。そのような分析を可能にするため、リン酸化シグナルの担い手であるプロテインキナーゼ群の活性を一度にモニタできるペプチドアレイの開発を目的としている。

ペプチドアレイにおいてリン酸化を検出する方法としては、リン酸基と選択的に結合する物質を蛍光標識する手法が一般的である。しかしながらこの手法では、細胞内の夾雑物がアレイ上へ非特異的に吸着することによって引き起こされる擬陽性・擬陰性の発生がしばしば問題となっている。そこで、本研究では以下の2つの方法でこの問題の解決を試みている。

① 酸化チタンを用いたペプチドアレイの開発

アレイ上への夾雑物の非特異的吸着を抑制する方法として様々なブロッキング剤が開発・市販されている。我々は酸化チタンの光誘起超親水化現象に着目し、基板自身が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を進めている。夾雑物のモデルとして蛍光標識したタンパク質を用い、酸化チタン基板の非特異的吸着物除去能を調べたところ、超純水中で10分間超音波処理しただけで、蛍光はほとんど観察されなかった(図1)。ブロッキング剤を使用しなくても、短時間かつ簡便な操作で非特異的吸着物除去が可能であるため、コスト削減につながると期待している。

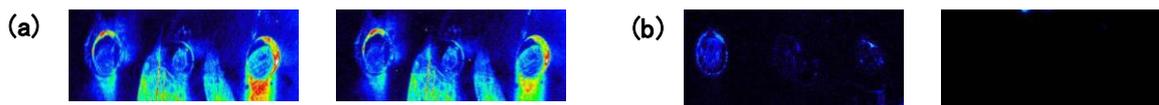


図1 モデルタンパク質吸着後の蛍光顕微鏡画像 (a) ガラス基板 (b) 酸化チタン基板
(各画像の左:5分間超音波洗浄後, 右:10分間超音波洗浄後, 洗浄液:超純水)

② 質量分析検出型ペプチドアレイの開発

質量分析(主としてMALDI-TOF-MS)はペプチドを標識することなく検出できるため、擬陽性・擬陰性がほとんど発生しない。リン酸化によって分子量は80増えるので、2つの分子量ピークを比較することでリン酸化を検出できる。しかし、ペプチドアレイではペプチドが基板上に共有結合で結合しているため、MALDI-TOF-MSで検出することは難しい。そこで、MALDI-TOF-MSに搭載されたイオン化レーザーによって切断される化合物を合成し、この化合物を介して基板上にペプチドを固定化することで、質量分析が可能なペプチドアレイの開発を進めている。

以上のような方法によりリン酸化シグナルの網羅的解析が可能となれば、疾病の診断や薬物スクリーニングなどに利用できると考えている。

提供可能な設備・機器:

名称・型番(メーカー)	
ライフサイエンス用紫外可視分光光度計(日本分光)	
凍結乾燥機(EYELA)	
水晶振動子微小秤量装置(北斗電工)	
ぬれ性評価装置【接触角計】(Nick)	