

アポトーシスパスウェイの電気的検出に向けた界面の構築

Surface design for electrical analysis of apoptotic pathway

○菅家雅樹¹, 松元亮², 星徹³, 澤口孝志³, 宮原裕二²*Masaki Kanke¹, Akira Matsumoto², Toru Hoshi³, Takashi Sawaguchi³, Yuji Miyahara²

Abstract: Elucidation of apoptosis pathway is an important route to study pharmacological mechanism of candidate drugs and their treatment efficacy. We envision electrical analysis of apoptosis pathway capitalizing on field effect transistor (FET) based signal transduction. A special focus is on analysis of Caspase (cysteine-dependent aspartate-directed proteases), activity of which has been implicated in signal transduction of apoptosis. A series of composite peptides containing Caspase-specific sequences and those suitable for electrode surface installation were designed. Each Caspase-specific cleavage of the designed peptides was confirmed in bulk state. Further efforts will be directed to extending the system to surface-immobilized conditions both on gold nanoparticles and gold sputtered electrodes.

1. 緒言

アポトーシスに至る生体分子間の相互作用による生物学的経路（パスウェイ）は原因によって多様である。アポトーシスと細胞増殖の不均衡が原因となる疾患は数多く存在し、それら治療薬の創薬分野においてパスウェイ解析は候補薬物の薬理メカニズムの解明に繋がる極めて重要な情報をもたらす。本研究では Caspase 群をターゲットとする。Caspase はアポトーシス誘導におけるシグナル伝達の中核を担うタンパク質分解酵素群であり、それぞれ特定のアミノ酸の配列を認識し切断する基質特異性を有している。その酵素の時間・濃度依存的な活性変化を電界効果トランジスタ（Field Effect Transistor : FET）を用いて測定することで電気的にアポトーシスパスウェイの解析を行うことを目的とする。

FET は Gate 電極表面近傍に接近した電荷を持つ DNA やタンパク質などの静電相互作用によってチャンネル部の電荷密度の変化を検出することができる。

これを利用して酵素の反応を基板表面上の電気的変化として捉えることで複数の酵素をラベルフリーかつ並列的に処理できるものと考えた。またアポトーシスパスウェイ解析に FET を用いる事で、半導体の微細加工技術から集積化と高密度化による検出装置の小型化、候補薬物に対する高効率な薬理活性の定量的情報取得、ターゲット分子の絞り込みへの利用が可能である。

本研究では Gate 電極の表面に各種 Caspase の至適配列を含む合成ペプチドを修飾し、Caspase によって至適配列を切断することで Gate 電極表面近傍の電荷密度を変化させ、これを電気的に捉える事で Caspase の活性を測定することを最終目標としている。その為、まずはバルク中で Caspase が設計した合成ペプチドの至適配列を認識し、特異的に切断するか確認する。

2. 実験

今回ターゲットには Caspase-3, -8 を選定した。Caspase-3 は DEVD を Caspase-8 は DEVD, IETD のどちらの配列も認識して切断する。合成ペプチドは以下の配列で合成した。

- Caspase-3 用合成ペプチド (NH₂-GDDDGDEVDG(AHX)(AHX)C-COOH) Mw=1322.31
- Caspase-8 用合成ペプチド (NH₂-GDDDG IETDG(AHX)(AHX)C-COOH) Mw=1322.35

また、Caspase-3, -8 が対応する合成ペプチドを認識して切断するかバルク中で Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight mass spectrometer(MALDI-TOF-MS)を用いて確認した。

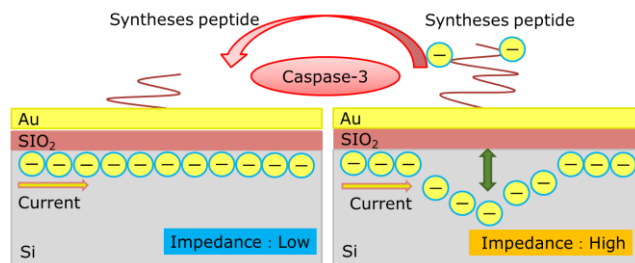


Figure 1. Detection principle

実験操作はまず 25mM HEPES buffer と Caspase-3 用合成ペプチドを用いて 300 μ M のペプチド溶液を作成, 500mL ずつ 3 本のチューブに分注する. 同様に Caspase-8 用合成ペプチドについても 3 本のチューブを作成する. 二種類の合成ペプチドの溶液チューブから 1 本ずつに Caspase-3 を 4 μ L 加え, 別の二種類のチューブに Caspase-8 を 4 μ L 加える. 残ったチューブはコントロールとする. 6 本全てのチューブを 37 $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートし Ethanol : Acetonitril : インキュベートした Sample 溶液を 6 : 3 : 1 の割合で混合し, TOF-MS 用試料溶液を作製, Matrix として 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA) を加えて MALDI-TOF-MS で測定した.

3. 結果

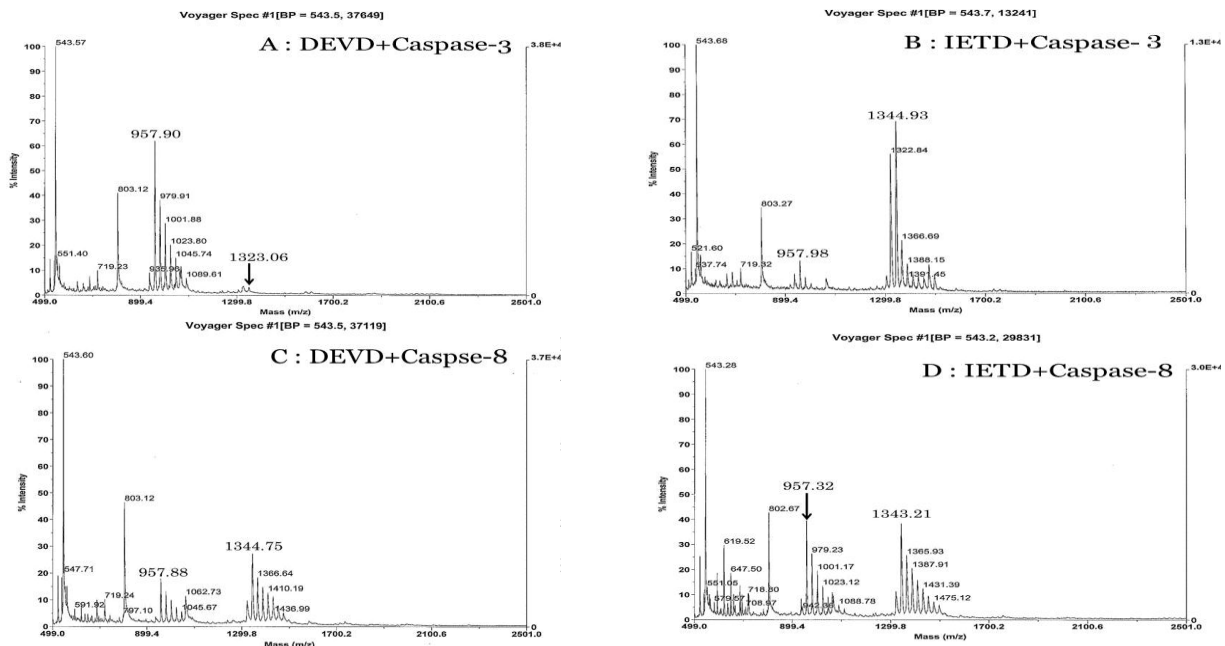


Figure 2. Result of MALDI-TOF-MS measurement

Caspase によって至適配列を切断された合成ペプチドの断片の分子量は 935, これに Na^+ が付加した 957 のピークが認められると至適配列で切断されたといえる. ここから A, B の結果を見ると Caspase-3 は DEVD の配列を含むペプチドを選択的に切断し, IETD の配列を含むペプチドはほとんど切断していない. また, C, D の結果から Caspase-8 はどちらのペプチドにおいても切断が確認できた. 示してはいないが, コントロールでは合成ペプチドの切断は確認されなかった.

4. 結言

今回の実験結果から Caspase-3, Caspase-8 のどちらもバルク中で設計したペプチドの至適配列を選択的に切断することが確認できた. Caspase-3 に関しては至適配列の基質特性も同時に確認した.

この結果から今後は, 金の固層表面でも同様に Caspase が至適配列を切断するか確認する為に, 金ナノ粒子の凝集を利用した表面プラズモン効果による呈色変化の実験を進めつつ, 最終的に基板表面上への修飾が可能か確認する為, 合成したペプチドが金電極表面上に単分子膜を形成するか Cyclic Voltammetry (CV) 測定で確認する. その際, 形成に適した条件も検討する.

5. 参考文献

- [1] V. Gurtu *et al.*, "Fluorometric and Colorimetric Detection of Caspase Activity Associated with Apoptosis" *Analy. Biochem.* Vol. 251, No. AB972220, pp. 98-102, 1997
- [2] P. A. Amstad *et al.*, "Detection of Caspase Activation In Situ by Fluorochrome-Labeled Caspase Inhibitors" *BioTechniques*, Vol. 31, No. 3, pp. 608-616, 2001