ノート*

金電極上に固定された荷電ペプチドの電気化学的な検出

和田 宏之**, 上山 博幸**, 脇 道典**, 竹中 繁織**, 高木 誠®**

Electrochemical detection of charged peptides immobilized on a gold electrode surface

Hiroyuki WADA, Hiroyuki UYAMA, Michinori WAKI,
Shigeori TAKENAKA and Makoto TAKAGI**

**Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812-8581

(Received 29 April 2002, Accepted 19 August 2002)

Protein or peptide chips are expected to be valuable tools for detecting and analyzing interactions involving proteins and peptides in post-genome projects. As a preliminary study aimed at such a chip technology, a differential pulse voltammetry was successfully used to detect the electrostatic interaction between the charged chemical species on an electrode and those in the solution. Specifically, a gold electrode surface was modified through thiol chemistry by anionically-/cationically- and multi-charged peptides (peptide electrodes). The electrodes were used to detect anionically or cationically charged ferrocene-containing species (ligands; including a peptidic derivative) in solution. Unique DPV signals due to a ferrocene redox reaction were obtained when the nature of charge on the peptide electrode matched that of the ligand in solution. The magnitude of the signal correlated with the charge of the peptide molecule on the electrode, indicating that the binding affinity of the ligands was based on an electrostatic interaction with the peptides on the electrode surface. The results as a whole indicate that ferrocene labeling can be a useful means to electrochemically detect some specific interactions taking place between peptides on an electrode surface and those in solution.

Keywords : peptide-immobilized gold electrode; electrochemical detection; ferrocene labeling; electrostatic interaction; protein chip.

1 緒 言

ヒトゲノムプロジェクトが終わりに近づき、興味を中心は遺伝子そのものより、その塩基配列情報からもたらされる機能分子としてのタンパク質へと移行しつつある¹⁾。このポストゲノムプロジェクトを支える技術として、タンパクチップが注目されている^{2)~4)}。タンパクチップはDNAチップと同じくチップ基板上にタンパク質を固定化したもので、タンパク質の機能をハイスループットに調べる手法として期待されている。しかし、タンパク質分子はDNA

分子に比べ個々のタンパク質ごとに特有の立体構造と性質を有するために、チップ基板上へ天然と同じ状態で固定化するのは困難である。また、検体試料中にある標的物質(タンパク質、ペプチド、糖、核酸やその他の小分子)がタンパクチップに結合したとき、これを高感度に検出する一般的手法が確立されていない。これらの理由のため、タンパクチップはまだ広く利用されるに至っていない。

著者らは、これまでに二本鎖DNAに高い選択性を有する電気化学活性リガンドとDNAアレイを組み合わせ、極めて感度の高い電気化学的な遺伝子解析システムの開発を行ってきた⁵⁾。このような電気化学的DNAアレイの技術をタンパク(ペプチド)チップへ応用すれば、水溶液中でのタンパク質(ペプチド)-タンパク質(ペプチド)間、

* 若手研究者の初論文特集

** 九州大学大学院工学研究院応用化学部門: 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

		net charge
Ac-Cys-Trp-(Lys) ₆ -NH ₂	1	+6
Ac-Cys-Trp-(Gly) ₃ -(Lys) ₃ -NH ₂	2	+3
Ac-Cys-Trp-(Gly) ₆ -NH ₂	3	0
Ac-Cys-Trp-(Asp) ₆ -NH ₂	4	-6

Fig. 1 Structures of peptides with different net charges

Cys: cysteine (C); Trp: tryptophan (W); Lys: lysine (K); Gly: glycine (G); Asp: aspartic acid (D)

Fig. 2 Structures of ferrocene-derived compounds

K: lysine; D: aspartic acid

あるいはタンパク質-生体分子間の相互作用を高感度に検出するシステムへと展開できることが期待される。

本研究では、電気化学的タンパクチップを開発する基礎研究の一つとして、タンパク質のモデルとして荷電数の異なるシステイン含有モデルペプチドをデザインした。このペプチドを、ペプチド中に含まれるシステイン残基のチオール基を介して金電極上に固定した。次いで電気化学的に活性なフェロセン化合物を溶液に加え、これと金電極上のペプチドとの静電的相互作用による結合を電気化学的手法によって検出した。

2 実 験

2.1 試薬及び溶媒

ペプチド固相合成に用いる 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)-アミノ酸誘導体及び合成用樹脂は渡辺化学工業製、カップリング試薬、Fmoc 基切断試薬及び反応溶媒は Applied Biosystems 製を使用した。脱樹脂用の試薬類はキシダ化学製を用いた。フェロセンカルボン酸 (Fc-COOH, 5) 及びヨウ化(フェロセニルメチル)トリメチルアンモニウム (6) は、それぞれ Aldrich 製及び Lancaster Synthesis 製を購入して使用した。その他の試薬は特級品を用いた。

2.2 ペプチドの合成

合成したペプチドを Fig. 1, 2 にまとめた。本研究の取り扱い条件下 (pH 7) でこれらのペプチドが分子全体として持つ荷電の数も併せて Fig. 1 中に示した。なお, Fig.

2 中のフェロセニル (Fc)-ペプチド 7 は、三つのリジン残基のうち二つがフェロセンカルボン酸アミドの形になっているので、pH 7 付近での分子全体の荷電は -2 である。

保護ペプチド樹脂は、Applied Biosystems 431A 型ペプチド合成装置を用い、同社のプロトコールに従い、Fmoc 法による固相合成⁶⁾により調製した。得られた保護ペプチド樹脂をスカベンジャー含有のトリフルオロ酢酸で室温にて 2 時間処理し、脱樹脂、脱保護基の操作を行った。得られた粗ペプチドを、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した。精製ペプチドの純度検定と同定は HPLC 及びマトリックス支援イオン化-飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) にて行った。MALDI-TOF MS の測定には PerSeptive Biosystems 製の Voyager Linear-SA 型装置を用いた。マトリックスとしては α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を使用した。

7 は、固相合成で調製した Ac-(Lys-Asp)₃-NH₂ (8) とフェロセンカルボン酸の *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル⁷⁾とを *N,N*-ジメチルホルムアミド中トリエチルアミン存在下で 45°C にて 2 日間反応させ、反応物を HPLC で精製して調製した。純度検定と同定は HPLC と MALDI-TOF MS にて行った。

2.3 金電極へのペプチドの固定

ペプチドの金電極への固定化は、既報⁸⁾に準じチオール基 (システイン残基) の金基板への化学吸着を利用して行った。前処理 (2 M 水酸化ナトリウム 1 時間煮沸、硝酸 30 分浸漬、純水洗浄) した金電極 (Bioanalytical Systems 製、直径 1.6 mm) へ 0.01 ~ 3 mM の各ペプチド水溶液 1 μ l をスポットし、室温で 2 時間保持してペプチドを金基板上へ固定化した。修飾した金電極は純水で十分洗浄した後、電気化学測定に用いた。各ペプチド水溶液のペプチド濃度は、システイン残基を Ellman 定量法⁹⁾によって、あるいはトリプトファン残基を紫外吸収スペクトル法 (280 nm)¹⁰⁾ によって定量して決定した。

2.4 電気化学測定

電気化学測定は既報⁸⁾に準じた。サイクリックボルタンメトリー (CV) あるいは微分パルスボルタンメトリー (DPV) の測定は CH Instruments 製の ALS/chi 電気化学分析計 410 型を用い 25°C で行った。測定セルは、作用極としてペプチド修飾金電極、対極に白金板、参照電極に銀-塩化銀電極を用いた三電極構成とした。

測定溶液は、5 mM 濃度のリン酸塩あるいは bis-Tris 緩衝剤によって pH 7.0 に調整するだけとし、イオン強度調整目的の支持電解質は用いなかった。

Fig. 3 Differential pulse voltammetric (DPV) response of peptide-immobilized electrodes to ferrocenecarboxylic acid **5** in solution

For electrode modification, 1 μ l of the peptide solution of varying concentration was applied onto the Au electrode of 1.6 mm surface diameter. (a): peptide **1** (+6 net charge)-immobilized; (b): unmodified (bare Au electrode); (c): peptide **3** (0 net charge)-immobilized; (d): peptide **4** (-6 net charge)-immobilized. DPV measurement conditions: 0.2 mM **5** in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C, scan rate 100 mV/s

3 結果及び考察

3.1 ペプチドの合成

目的とするペプチド (**1**~**4** 及び **8**) はいずれも高純度 (95% 以上) のものを高収率 (固相合成の出発樹脂より換算して 95% 以上) で得ることができた。

Fc-ペプチド **7** はペプチド **8** から収率 50% で得られた。純度は 99% であり極めて高純度であった。

3.2 陰イオン性フェロセン化合物 (**5**) とペプチド修飾電極との相互作用

フェロセンカルボン酸 **5** は、本研究における取り扱い条件下 (pH 7) では基本的にプロトン解離し、陰イオンとして存在している。**5** の水溶液についてペプチド修飾電極を用いて DPV 測定を行ったところ、陽イオン荷電数の多いペプチド修飾電極ほど水溶液中の **5** を電極上に濃縮させ、0.3 V (*vs.* Ag/AgCl) 付近にフェロセンに由来する大きい酸化還元ピークが検出された。このピーク電流を金電極に添加したペプチド水溶液の濃度に対してプロットした (Fig. 3)。ペプチドの固定化量が多すぎるとフェロセンからの応答電流は抑制された。このことから金表面へのペプチドの固定化には至適量があることが分かった。今回用いた金電極に対しては、添加する最適なペプチド水溶液の濃度は 0.1~1.0 mM であった。このことから、少なくともナノモルレベルあるいはそれ以下のペプチド固定化量でペプチドの電気化学的な検出が可能であると言える。

Fig. 4 Differential pulse voltammograms for cationic ferrocenyl compound **6** on several peptide-immobilized electrodes

(a): **4** (-6 net charge)-immobilized; (b): **3** (0 net charge)-immobilized; (c): **2** (+3 net charge)-immobilized; (d): **1** (+6 net charge)-immobilized. Measurement conditions: 0.2 mM **6** in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C, scan rate 100 mV/s

3.3 陽イオン性フェロセン化合物 (**6**) とペプチド修飾電極との相互作用

陽イオン性フェロセン化合物 **6** では上記 Fc-COOH **5** の場合とは逆の結果が得られた (Fig. 4)。すなわち、陰イオン荷電数の多いペプチド修飾電極ほどフェロセンに由来する酸化還元ピークが大きくなった。これは陰イオンで修飾された電極表面に **6** が濃縮されていることを示唆する。

更に Fig. 4 においてペプチドを検出する電気化学プローブとしての化合物 **6** のピーク電位が、ペプチドの性質によって変化していることにも注目すべきである。すなわち、**6** の見掛けの酸化還元電位を -6 価ペプチド **4** 修飾電極について見ると (0.37 V), 0 価ペプチド **3** 修飾電極におけるそれ (0.44 V) に比べて大きく (0.07 V) 負に変移している。+3 価及び +6 価ペプチドにおいては、逆に正に変移しているが、その大きさは 0.01 V 程度で小さい。このことは、陽イオン性のフェロセン誘導体 **6** が電極表面の陰イオン性ペプチドと結合した結果、酸化されやすくなっていることを意味する。

3.4 陰イオン性 Fc-ペプチド (**7**) とペプチド修飾電極との相互作用

水溶液中の陰イオン性 Fc-ペプチド **7** と、金電極に固定化された陽イオン性ペプチドとの相互作用による電極上への Fc-ペプチドの濃縮が、フェロセン部の電流応答によって観測された (Fig. 5)。また、陽イオン荷電数の多いペプチド **1**-修飾電極では大きな濃縮効果を示したことにに対し、逆に陰イオン性ペプチド **4**-修飾電極では阻害効果が観察された。これらのことは、溶液中のペプチドが電極上のペプチドに結合するに当たり、静電的な相互作用が重要

Fig. 5 Differential pulse voltammograms for anionic ferrocenyl peptide 7 on several peptide-immobilized electrodes

(a): **1** (+6 net charge)-immobilized electrode; (b): **3** (0 net charge)-immobilized electrode; (c): **4** (-6 net charge)-immobilized electrode. Measurement conditions: 0.1 mM **7** in 5 mM bis-Tris·HCl buffer (pH 7.0), 25°C, scan rate 100 mV/s

な役割を果たしていることを示す。

なお、ここでは pH 緩衝剤として bis-Tris を用いた実験例を示したが、前項までの実験結果 (リン酸塩緩衝剤使用) も含めて、緩衝剤の種類によって電位電流曲線が有意に変化することはなかった。一方、本研究では溶液の電解質を基本的に 5 mM の pH 緩衝剤のみとしており、格別にイオン強度を変化させた場合の電位電流測定は行っていない。溶液中のプロープ分子と電極上のペプチドとの間に働く静電的な相互作用は、当然のことながらイオン強度の影響を受ける。したがって、共存する塩の濃度が大きい場合は、そのような条件下での検討が改めて必要であろう。

4 結 言

金電極上に固定化された荷電ペプチドは、水溶液中の荷電フェロセン化合物あるいはフェロセン誘導体化ペプチドと、電極上で静電的に相互作用することが分かった。正負の荷電が大きいほど静電的相互作用が強く、フェロセンに基づく応答電流が大きく観察された。このことによって、ペプチドを電極に固定化し電気化学的に活性なフェロセン化合物を用いることにより、ペプチドと他分子との分子間相互作用を電気化学的に検出可能なことが示された。今後のペプチドチップあるいはタンパクチップへの応用展開が期待される。

(2001 年 8 月, 国際分析科学
会議 2001 において一部発表)

文 献

- 1) D. Eisenberg, E. M. Marcotte, I. Xenarios, T. O. Yeates: *Nature* (London), **405**, 823 (2000).
- 2) G. MacBeath, S. L. Schreiber: *Science* (Washington, D.C.), **289**, 1760 (2000).
- 3) H. Zhu, M. Snyder: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 40 (2001).
- 4) T. Kodadek: *Chem. Biol.*, **8**, 105 (2001).
- 5) S. Takenaka: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 217 (2001).
- 6) J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C.-D. Chang: *Int. J. Pept. Protein Res.*, **13**, 35 (1979).
- 7) S. Takenaka, Y. Uto, H. Kondo, T. Ihara, M. Takagi: *Anal. Biochem.*, **218**, 436 (1994).
- 8) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo: *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
- 9) G. L. Ellman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **32**, 70 (1959).
- 10) D. B. Wetlaufer: *Adv. Protein Chem.*, **17**, 303 (1962).