

L18

キナーゼ基質ペプチド固定化酸化チタン基板の調製とペプチドアレイへの応用

(北九州高専)○船津貴洋・園田達彦*・山本和弥・松嶋茂憲
(九大院工)片山佳樹・(北九州高専)(正)山田憲二

【緒言】

タンパク質リン酸化反応は、プロテインキナーゼとよばれる酵素群が触媒する反応で、細胞機能を制御する上で重要な役割を担っている。したがって、この反応をペプチドアレイにてモニタリングすることによって、細胞の状態を調べることが可能となり、創薬における1次スクリーニングへの応用が期待される。しかしながら、この手法ではアレイ表面における非特異的吸着による擬陽性シグナルが発生し、正確な解析を困難にしている。

本研究では、表面の濡れ性を制御する事によって非特異的吸着物の洗浄除去が可能ではないかと考え、光誘起超親水化現象を引き起こす酸化チタンを基板に用いたペプチドアレイの開発を目的としている。今回は、酸化チタン基板の物性やペプチドの基板への固定化について検討したので、その結果を報告する。

【実験】

酸化チタン基板の作製と物性評価

酸化チタン基板は、0.5 M チタンテトライソプロポキシド 1000 μ L と超純水 11.7 μ L を混合して調製したゾルゲル溶液 50 μ L をスライドガラス (15×15 mm) にスピンコート法にて塗布後、空気中にて 723 K、30 min の条件で焼成したものを用いた。

まず、酸化チタン基板表面を原子間力顕微鏡にて観察し、基板の表面形態を調べた。続いて、酸化チタン基板に紫外線を照射し、基板表面での水の接触角を測定することで、紫外線照射前後における基板表面の親水性を評価した。さらに、親水化状態の酸化チタン基板を所定の温度、時間で減圧乾燥を行うことによって、基板表面における濡れ性の制御を試みた。

キナーゼ基質ペプチドの基板への固定化

一般的なペプチドアレイでは、表面にアミノ基を導入したガラスを基板として用いているため、ペプチドの基板への固定化は容易かつ確立されている。しかしながら酸化チタン基板へのペプチドの確実な固定化手法は報告されていないことから、それについて検討を行った。

酸化チタンはカルボキシ基とエステル結合を形成するという報告がなされている。そこで、この性質に着目し、ポリアクリル酸と基質ペプチドの複合体を用いることで、基質ペプチドを酸化チタン基板へ固定化する手法を試みることにした。今回は、基礎検討として Rhodamine B 標識ポリアクリル酸 (R-PAA) を酸化チタン基板に固定化し、その様子を蛍光顕微鏡で観察した。また、R-PAA を固定化した基板を水中で 5 min 超音波洗浄し、再度基板を蛍光顕微鏡にて観察し、固定化した R-PAA の残存量を比較した。

【結果・考察】

酸化チタン基板の作製と物性評価

Figure は、酸化チタン基板の DFM 観察像である。基板

作製時に超純水を添加することによって、酸化チタン基板表面の形態が大きく変化していることが観察された。また、超純水を添加することによって、平均面粗さが大きく減少し、基板表面が平滑になっていることが確認された。よって、超純水を添加して作製した酸化チタン基板は、非特異的吸着を抑制する効果が高いものであると期待される。

続いて、紫外線照射時の酸化チタン基板表面における水の接触角を測定したところ、基板作製時に超純水を添加した基板のほうが超純水未添加の基板に比べて、より短時間で基板表面の接触角が 10°以下となった。また、親水化した酸化チタン基板を所定の温度・時間にて減圧乾燥を行うことで、基板表面における水の接触角は増大した。これらの結果から、基板の減圧乾燥及び紫外線照射を組み合わせる事によって基板表面の濡れ性制御が可能である事が示唆された。

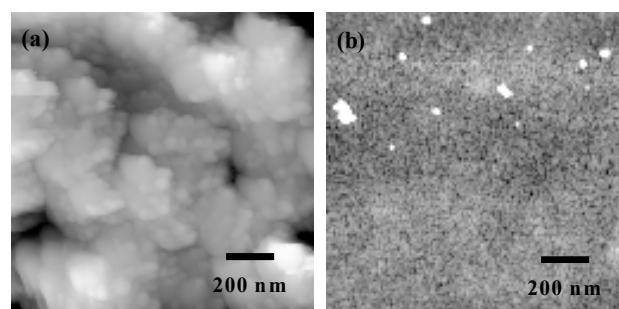


Figure 酸化チタン基板の DFM 観察像。
(a) 超純水未添加 (b) 超純水添加

キナーゼ基質ペプチドの基板への固定化

R-PAA を固定化した各基板を超音波洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察したところ、ガラス基板では超音波洗浄することによって、固定化した R-PAA は、ほとんど残存していなかった。一方、酸化チタン基板では、超音波洗浄後も R-PAA の残存量に大きな変化は見られなかった。ポリアクリル酸への基質ペプチドの導入は容易に行うことができると考えられるため、ポリアクリル酸と基質ペプチドの複合体を用いた固定化手法は有効であると考えられる。

【参考文献】

- 1) 荒川裕則, 表面技術, 2008, 59, 167.

【謝辞】

本研究は、科研費若手研究 (B) (21710121) の助成を受けたものである。

* TEL 093-964-7302 FAX 093-964-7308

E-mail sonoda@kct.ac.jp