

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34306
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K06612
研究課題名（和文）超高感度酵素アッセイシステムの構築を目指した新規脂質ナノ粒子発光デバイスの開発

研究課題名（英文）Development of lipid nanoparticle luminescent device aiming for construction of ultra-sensitive enzyme assay system

研究代表者
武上 茂彦（Takegami, Shigehiko）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70298686
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：酵素アッセイシステムを構築するために、グルタチオン（GSH）をモデル基質として選び、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ（ γ -GT）アッセイが可能な脂質ナノ粒子発光デバイス（GSH-LNPLD）の開発研究をおこなった。GSH-LNPLDにおいて、0.1～0.4 Uの γ -GT量の範囲においてGSH-LNPLDの発光強度との間で直線性が認められた。本研究では、GSH-LNPLDの γ -GTに対する感度は臨床現場において使用するには不足しているものの、GSH-LNPLDを用いて γ -GTアッセイができる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
脂質ナノ粒子発光システム（LNPLD）のユニークな物質検出メカニズムに基づく、これまでにない酵素アッセイシステムを提案できたという点が、本研究の学術的意義である。また、LNPLDは分析可能な酵素の適用範囲が広いことに加えて、将来的には酵素をターゲットとする酵素阻害剤のスクリーニングに利用することにより、新薬の開発にもつなげることができるという点が本研究の社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：To construct the enzyme assay system, the lipid nanoparticle luminescent device (LNPLD) modified glutathione (GSH) as a substrate (GSH-LNPLD) has been developed for the determination of γ -glutamyltransferase (γ -GT). In the γ -GT concentration range of 0.1-0.4 U, the GSH-LNPLD system had a linearity between the γ -GT concentration and luminescent intensity. This study showed that the GSH-LNPLD system has a possibility applicable for the γ -GT assay, although the sensitivity of the GSH-LNPLD system is low to use in clinical site.

研究分野：分析化学

キーワード：脂質ナノ粒子 γ -グルタミルトランスフェラーゼ グルタチオン イクオリン 生物発光

1. 研究開始当初の背景

生体内酵素をターゲットとした酵素阻害剤は、疾患の有効な治療薬になるため、その開発は極めて重要である。創薬研究における酵素阻害剤のスクリーニングには、高感度・簡便・迅速な酵素アッセイシステムをデザインすることが要求される。

現在よく用いられている酵素アッセイシステムは、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した評価システムである。このシステムでは、基質に発蛍光基と消光基をラベルしている。この方法では、酵素-基質反応前後で基質からの蛍光がオフからオンに切り替わるため、その蛍光を観測することで酵素活性を評価している。しかし、従来の方法には以下に示すような3つの問題点があると考えられる。

- ①外部光源(励起光)が必要であり、装置が高額となる。
- ②生体試料中には発蛍光性の物質が存在するため、測定の際の障害となる(自家蛍光の問題)。
- ③比較的、高感度(約 0.03 mU/ μ L)であるが、これ以上の感度向上は見込めない。

これらの問題点、特に①②を解決するために、図1に示すような、リポソーム表面での分子間相互作用をトリガーとしてイクオリン(AQ)の発光現象を導く、脂質ナノ粒子発光デバイス(LNPLD)を開発している¹。しかし、LNPLDは物質検出のメカニズムがユニークで高い評価が得られた反面、実際どのような物質の検出に応用できるのか、という実用面が問題であった。

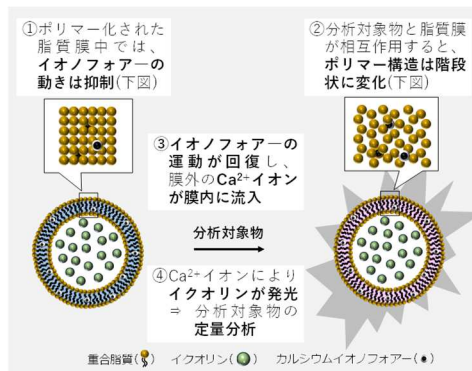


図1. 脂質ナノ粒子発光デバイス(LNPLD)のメカニズム

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の3つの問題点を解決した、革新的超高感度な酵素アッセイシステムを構築するために、これまで遂行してきた研究をさらに発展させ、LNPLDの粒子表面を酵素-基質の相互作用の場として提供し、新規の酵素アッセイ能を有するLNPLDを開発することである。そこで本研究では、図2に示すように、肝臓や腎臓の疾患マーカーである γ -グルタミルトランスフェラーゼ(γ -GT)を検出するために、その基質であるグルタチオン(GSH)を粒子表面に修飾したLNPLD(GSH-LNPLD)の開発を目指し、以下の3つの具体的な目標設定をし、それぞれについて検討をおこなった。

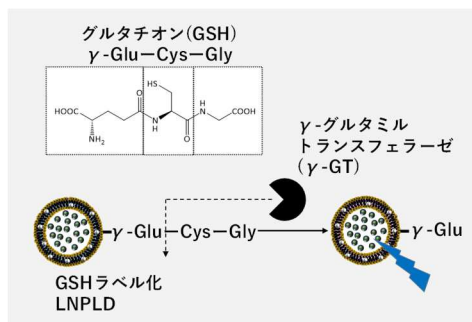


図2. 脂質ナノ粒子発光デバイス(LNPLD)のメカニズム

(1) GSH-LNPLDの調製とキャラクタリゼーション

LNPLDの粒子表面へのGSHの修飾方法ならびにGSH-LNPLDの調製における紫外線照射時間の検討をおこない、GSHがLNPLDに修飾されているか、GSH-LNPLDの物理化学的パラメータ(粒子径やゼータ電位)の特性評価、について調べた。

(2) GSH-LNPLDを用いた γ -GTの測定

(1)で調製したGSH-LNPLDが γ -GTに対して応答するかについて、GSH-LNPLDと γ -GTを混合したときの発光強度を測定し、GSH-LNPLDの γ -GTに対する定量性を調べた。

(3) GSH-LNPLDのさらなる感度向上の検討

γ -GTに対するGSH-LNPLDの応答性をさらに向上させるため、GSHをLNPLDの粒子間をつなぐリンカーとして利用したLNPLD-GSH-LNPLDの調製を検討し、GSH-LNPLDとLNPLD-GSH-LNPLDの γ -GTに対する応答性について比較し、LNPLD-GSH-LNPLDの有用性について調べた。

3. 研究の方法

(1) グルタチオンを修飾した脂質ナノ粒子発光デバイスの調製

脂質としてトリコサジノイルホスファチジルコリンおよび10,12-ペンタコサジン酸、緩衝液として0.1%ウシ血清アルブミンを含むHepes buffer (pH7.4)を用い、単純水和法によりイクオリンとカルシウムイオノフォアを封入した多重膜リポソームを調製した。その懸濁液について、Extrusion法で一枚膜リポソームであるジアセチレンリポソーム(DALS)とした。GSHを修飾したDALS(GSH-DALS)は、DALS懸濁液にN-ヒドロキシスクシンイミド/カルボジイミド、次いでGSHを加え両者の縮合反応を利用して調製した。GSH-DALS懸濁液をゲルろ過クロマトグ

ラフィーに通すことにより、懸濁液中から縮合反応に用いた試薬を取り除いた。最後に、GSH-DALS 懸濁液に 254 nm の紫外線を 15 分間照射し、GSH-LNPLD とした。また、GSH を修飾していない LNPLD も同様の方法で調製した。

(2) 発光測定

一定量の LNPLD あるいは GSH-LNPLD 懸濁液に γ -GT 水溶液を混合し、ルミカウンター NU-2600 を用いて 2 mM の CaCl_2 水溶液滴下後の発光を測定した。

4. 研究成果

(1) GSH-LNPLD の調製とキャラクターゼーション

GSH を修飾していない DALS および GSH-DALS について、基本的な物理化学的パラメータを得る目的で、粒子径およびゼータ電位を測定した。DALS および GSH-DALS の平均粒子径はそれぞれ、約 1.2~1.3 μm および約 1.6~1.7 μm であった。一方、両者のゼータ電位はそれぞれ、-20 mV および -19 mV であった。GSH を DALS の表面に修飾することにより、粒子径やゼータ電位の値に明確な変化は見られなかった。

GSH-LNPLD を調製するにあたり、紫外線照射時間は LNPLD の脂質膜の重合状態に影響を及ぼすため、紫外線照射時間の検討をおこなった。その結果を図 3 に示す。図 3(a) は、DALS 懸濁液を 5, 10, 15 分紫外線照射したときの色相変化の写真である。DALS 懸濁液は最初、DALS 粒子の散乱により白く懸濁しているが、紫外線照射すると青色へと視覚的に変化した。この色相変化について可視吸収スペクトルを測定した結果が図 3(b) である。いずれの吸収スペクトルにおいても 640 nm 付近に吸収極大が観測され、紫外線照射時間が長いほど吸収強度は増加した。このことから、DALS を構成している脂質が有するジアセチレン構造が紫外線照射により共役エンイン結合し、ポリマー鎖が形成されていること、紫外線照射時間の増加により、共役エンイン結合によるポリマー鎖の数が増加していること、GSH の DALS 表面への修飾は紫外線による重合反応、すなわち GSH-LNPLD の調製に影響を及ぼさないこと、が示された。これらの結果より、GSH-LNPLD の調製には紫外線照射時間を 15 分とした。

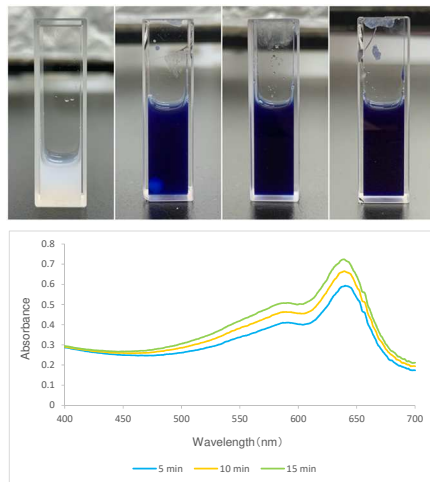


図 3. (a) GSH-DALS から GSH-LNPLD への色相変化(上), および(b)可視吸収スペクトル(下)

(2) GSH-LNPLD を用いた γ -GT の測定

GSH-LNPLD が γ -GT に対して応答するかについて検討するため、GSH-LNPLD に種々の量の γ -GT を混合した懸濁液に CaCl_2 水溶液を注入し、発光測定をおこなった。その結果を図 4 に示す。いずれの γ -GT 量においても、 CaCl_2 水溶液の注入直後に AQ の発光が観測された。また、 γ -GT 量の増加に伴い、AQ の発光強度も増加した。この結果より、GSH-LNPLD は粒子表面に修飾している GSH により γ -GT を認識し、 γ -GT に対して応答していることが示された。

GSH-LNPLD の γ -GT に対する応答性を評価するため、GSH を修飾していない LNPLD の γ -GT に対する応答性と比較した。その結果を図 5 に示す。GSH を修飾していない LNPLD では、 γ -GT 量が増加しても AQ の発光強度は増加しなかった。一方、GSH-LNPLD では 0.1 U から 0.4 U の γ -GT 量の範囲において、AQ の発光強度は増加し、 γ -GT 量と AQ の発光強度との間で直線性を示す傾向が見られた。この結果から、GSH-LNPLD の粒子表面には GSH が修飾されていること、 γ -GT は LNPLD の粒子表面には作用せず、GSH を認識して作用し、GSH-LNPLD はその基質-酵素反応を捉えることが可能であること、が明らかとなった。

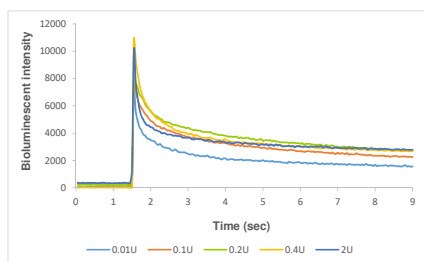


図 4. γ -GT 添加における GSH-LNPLD の発光曲線

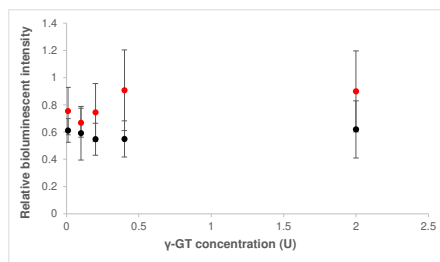


図 5. γ -GT に対する(●) GSH-LNPLD および(●)LNPLD の応答性

(3) GSH-LNPLD のさらなる感度向上の検討

γ -GT に対する GSH-LNPLD の応答性をさらに向上させるため、GSH を LNPLD の粒子間をつなぐリンカーとして利用することを試みた。すなわち、GSH の両端にある 2 つのカルボキシ基にそれぞれ LNPLD を結合させ、GSH と γ -GT の基質-酵素反応を 2 つの LNPLD で捉えることにより、さらなる感度向上につながると考えた。そこで、GSH を縮合剤にてカルボキシ基を活性化し、それと LNPLD を混合して GSH をリンカーとして用いた LNPLD(LNPLD-GSH-LNPLD) を調製した。粒子表面に GSH を修飾した GSH-LNPLD および LNPLD-GSH-LNPLD に対し、一定量の γ -GT を混合し、CaCl₂ 水溶液の注入したときの AQ の発光カーブを比較した。その結果、GSH-LNPLD の発光強度と比較して、LNPLD-GSH-LNPLD の発光強度は 2 倍程度増加した。この結果から、GSH は 2 つの LNPLD の粒子間をつなぐリンカーとして機能していること、両端の LNPLD は GSH と γ -GT の基質-酵素反応を捉えることができていることが示された。

次に、LNPLD-GSH-LNPLD の γ -GT に対する応答性を検討した。しかし、LNPLD-GSH-LNPLD と γ -GT の混合時間を変化させて、LNPLD-GSH-LNPLD の発光強度を測定したが、発光強度に変化は見られなかった。この理由は、LNPLD-GSH-LNPLD の調製量が少なく、設定した混合時間では GSH と γ -GT の基質-酵素反応が完全に終了しており、そのため発光強度に差が見られなくなったのではないかと考察された。今後は、LNPLD-GSH-LNPLD の調製量が多く得られる調製条件の検討が必要であると考えられる。

以上より、LNPLD-GSH-LNPLD は γ -GT に対する定量性などについてはまだ課題が残るものの、感度をさらに向上させる点において極めて有用な手段になりうることを明らかにした。

<引用文献>

- ① Ryoko Yamamoto, Shigehiko Takegami, Atsuko Konishi, Hikari Horikawa, Sayumi Yonezawa, Tatsuya Kitade, Polydiacetylene liposomal aequorin bioluminescent device for detection of hydrophobic compounds, *Anal. Chem.*, **88**, 5704-5709 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 KONISHI Atsuko, TAKEGAMI Shigehiko, KITADE Tatsuya	4. 巻 35
2. 論文標題 A Molecularly Imprinted Polymer-modified Potentiometric Sensor for the Detection of Glutathione	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1111 ~ 1115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.19P166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川美穂, 小西敦子, 北出達也, 武上茂彦
2. 発表標題 19F-NMRを用いたグルタチオン型19F-MRIプローブの脂質膜透過性の検討
3. 学会等名 第80回 分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中亜季, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 分子インプリントポリマーを感応素子とするグルタチオンセンサーの生理的pHにおける応答性能の向上
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 祐輔, 武上 茂彦, 小西 敦子, 北出 達也
2. 発表標題 ポリジアセチレンリボソーム型イクオリン生物発光デバイスのドパミンの定量性に及ぼすオクタデシルボロン酸含量の影響
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児玉 愛、武上 茂彦、小西 敦子、北出 達也
2. 発表標題 グルタチオン修飾ポリジアセチレンリボソーム型イクオリン生物発光デバイスを用いた -グルタミルトランスフェラーゼ検出のための基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都薬科大学 分析薬科学系 薬品分析学分野 https://www.kyoto-phu.ac.jp/education_research/laboratory/?c=laboratory_view&pk=5 京都薬科大学 分析薬科学系 薬品分析学分野 研究内容 (オリジナルページ) http://labo.kyoto-phu.ac.jp/bunseki/research4.html 京都薬科大学 分析薬科学系 薬品分析学分野 研究内容/研究活動 http://labo.kyoto-phu.ac.jp/bunseki/research4.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------