

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560814

研究課題名（和文） 多種の血管新生因子を同時検出するための蛍光プローブの創製と
医療診断への展開研究課題名（英文） Development of Fluorescent Probes for the Detection of Various
Angiogenesis Factors and Their Application to Medical Diagnostics

研究代表者

鈴木 祥夫（SUZUKI YOSHIO）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：60321907

研究成果の概要（和文）：これまでに当研究グループで開発したタンパク質分析用蛍光試薬において得られた知見を基に、血管新生因子を検出するための蛍光プローブの設計・合成、性能評価を行った。その結果、ペプチドと蛍光発色団から構成される VEGF 検出用プローブ等を開発し、ナノピラー構造を有する基板に精密に固定化することにより、血清中の VEGF 等を高感度かつ簡易的に検出することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Design and synthesis of fluorescent probes for the detection of angiogenesis was carried out based on the knowledge obtained by the development of fluorescent reagents for the detection of proteins. As a result, molecular probes for the detection of VEGF constructed by peptides and fluorescent molecules were developed, and the highly sensitive and easy detection of VEGF was successful with the use of nano-pillar substrates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

近年の情報機器の急速な発展とともに、撮像技術及び画像処理技術が目覚ましく進歩し、細胞・組織の構造や生体分子の機能などに関わる種々の生命現象可視化イメージ

ングすることが可能となってきた。より詳細な生体機能の可視化解析のために期待されるものは、高感度画像技術などのハードウェアの開発もさることながら、新たなる発想に基づく新規可視化プローブ分子の設計、および

測定法の確立が必要となってくる。

2. 研究の目的

申請者は、特定の化学物質や化学環境に対応したセンシング機能を有する新規機能性材料の設計・合成とそれらを利用した高性能ケミカルセンサーまたはバイオケミカルセンサーの創製に関する研究を推進している。

本研究では、これまでに得られた知見を基に、癌細胞の増殖・転移に密接に関与する代表的な2種類の血管新生因子 (FGF と VEGF) を同時認識し、可視化イメージングを行うことが出来る新規蛍光分子プローブの設計・合成およびその性能評価を行う。さらに、開発した試薬の応用として、癌治療・診断を目的とした病巣の検出・同定を行うための可視化イメージング技術への適応の可能性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光プローブの設計・合成

これまでの経緯から VEGF および FGF に対する有効な結合部位は明らかとなっている。具体的には、VEGF 検出用プローブでは、VEGF 受容体の VEGF 結合部位(アミノ酸配列:NECDIARMWEWECFERL)を採用し、FGF 検出用プローブでは、ヘパリンを採用した。上記結合部位に導入する蛍光発色団を選定する上で考慮することは、①標的物質(VEGF および FGF)との反応前後において蛍光強度が大きく変化すること、②可視光での励起が可能であること③VEGF と FGF を2種類の分子プローブで同時に検出するため、各々のプローブの励起波長が重ならないこと、が挙げられる。上記3つの問題点は、タンパク質検出用蛍光分析試薬の利点(①タンパク質との反応によって無蛍光の状態から強い蛍光を発する、②可視光による励起が可能である、③蛍光発色団と上記結合部位を連結するス

ペーサーを調節する)を採用することによって解決した。

(2) 蛍光プローブの性能評価

VEGF 検出用分子プローブおよび FGF 検出用分子プローブそれぞれ単独で、VEGF 濃度あるいは FGF 濃度と蛍光強度との関係を測定し、解離定数を初めとした熱力学的パラメータの算出を行った。算出した値を基に、VEGF と FGF が混合している系においても、各々の分子プローブが互いに妨害することなく、目的物質を選択的に認識できることを見極めて、混合系に用いる分子プローブを選択した。さらに、各々のプローブの蛍光強度が、VEGF あるいは FGF 以外の妨害物質にどの程度影響を受けるかを確認した。妨害物質として、無機塩、還元剤、界面活性剤、核酸、糖、有機溶媒を用いた。これらの妨害物質を、分子プローブと標的物質との複合体に過剰量添加し、蛍光強度がどの程度変化するかを確認した。

さらに、VEGF 検出用プローブを利用したデバイス化(VEGF の高感度検出)への基礎検討および医療診断に向けた適応の可能性試験として、シリカを原料とし、ピッチ200nm、高さ1 μ m のナノピラーから構成される基板上に精密に固定化し、VEGF との相互作用について検討した。

4. 研究成果

VEGF 検出用蛍光分子プローブ及び FGF 検出用蛍光分子プローブ設計・合成および性能評価を中心に行った。それぞれの蛍光分子プローブの蛍光発色団は、これまでに開発したタンパク質検出用試薬を改良し、標的物質との疎水性相互作用による複合体形成および分子内の ICT 状態の変化によって強い蛍光発光を誘起する部位として4-(ジシアノメチレ

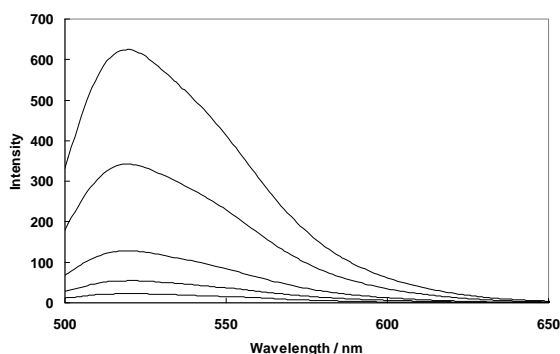


図1 VEGF 添加前後における VEGF 検出用プローブの蛍光スペクトル

ン)-2-メチル-4H-ピランを有するものおよびフルオレセイン誘導体とした。上記の蛍光発色団を、VEGF 検出用プローブでは、VEGF 受容体の VEGF 結合部位(アミノ酸配列：GPGSGRGWVEICAADDYGRGPGSK)に導入した。また、FGF 検出用プローブでは、ヘパリンに導入した。これらの蛍光分子プローブが、それぞれ目的とするタンパク質を特異的に認識するかどうかを、蛍光光度法を用いて確認した。その結果、VEGF および FGF 添加前は、蛍光分子プローブからは微弱な蛍光が観察されたが、室温下、VEGF および FGF を添加すると、それぞれ目的のタンパク質と相互作用した時のみ、瞬時に蛍光強度の増加が確認された。検量線については、VEGF 濃度および FGF 濃度と蛍光プローブの蛍光強度との間には良好な直線関係が成立した。表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて、蛍光分子プローブと目的とするタンパク質の解離定数を算出したところ、 10^{-9} M オーダーの値が算出された。また、妨害物質の影響について検討したところ、無機塩、還元剤、有機溶媒などは、蛍光プローブと VEGF および FGF との反応に影響を与えないことが分かった。さらに、上記蛍光プローブをシリカを原料とし、ピッチ 200nm、高さ $1\mu\text{m}$ のナノピラーから構成される基板上に精密に固定化し、VEGF

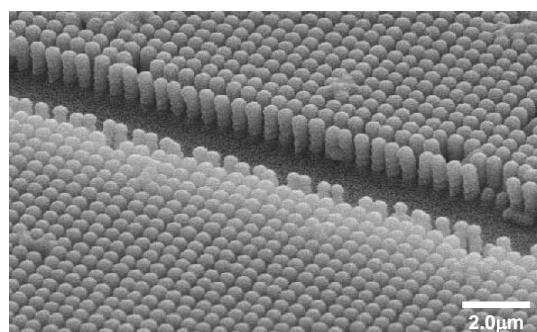


図2 プローブを固定化したナノピラー基板のSEM画像

および FGF との相互作用を確認したところ、単に溶液状態に分散させた時および平坦な基板に固定化させた時よりも、5 倍程度の検出限界の向上および血清中の VEGF および FGF の検出にも成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① 鈴木祥夫、横山憲二、Development of Functional Fluorescent Molecular Probes and Their Biological Applications、Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology、査読有、Vol. 18、2011、1~20

DOI：なし

② 鈴木祥夫、横山憲二、Construction of a more sensitive fluorescence sensing material for the detection of vascularendothelial growth factor, a biomarker for angiogenesis, prepared by combining a fluorescent peptide and a nanopillar substrate、Biosensors and Bioelectronics、査読有、Vol. 26、2011、3696~3699

DOI: 10.1016/j.bios.2011.02.007

③鈴木祥夫、高木信幸、千室智之、篠原淳、坂口菜央、平塚淳典、横山憲二、Design and Synthesis of New Fluorescent Probe for Rapid and Highly Sensitive Detection of Proteins via Electrophoretic Gel Stain、Electrophoresis、査読有、Vol. 32、2011、1403～1413

DOI: 10.1002/elps.201000691

④鈴木祥夫、横山憲二、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を検出するための蛍光ペプチドの創製、細胞、査読無、Vol. 43、2011、32～33

DOI : なし

⑤鈴木祥夫、横山憲二、Development of a Fluorescent Peptide for the Detection of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 、ChemBioChem、査読有、Vol. 10、2009、1793～1795

DOI: 10.1002/cbic.200900190

〔学会発表〕(計16件)

①鈴木祥夫、タンパク質を分光光学的に検出するための機能性材料の創製、「ナノ構造・物性」第四回研究会(招待講演)、2012年1月20日、神戸

②鈴木祥夫、横山憲二、メロシアン構造を有する新規蛍光分子プローブを利用したタンパク質の高感度分析、日本分析化学会第60年会、2011年9月15日、名古屋

③鈴木祥夫、高木信幸、千室智之、篠原淳、坂口菜央、横山憲二、Novel Fluorescent Reagents for High-Throughput and Highly-Sensitive In-Gel Protein Detection and Their Application to Proteomic Research、HUPO2011、2011年9月5日、スイス

④鈴木祥夫、横山憲二、メロシアン骨格を有する新規タンパク質検出用蛍光分子プローブの創製とSDS-PAGEへの応用、日本プロテオーム学会2011年大会、2011年7月28日、新潟

⑤鈴木祥夫、横山憲二、Development of Fluorescent Reagents for the Detection of Proteins and Their Application to High-throughput Protein Analysis、Pacifichem2010、2010年12月17日、ハワイ

⑥鈴木祥夫、横山憲二、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を検出するための蛍光ペプチドの創製、第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010年09月25日、大阪

⑦鈴木祥夫、横山憲二、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)検出用蛍光分子プローブの創製とナノピラーアレイ上における検出、日本分析化学会第59年会、2010年09月17日、仙台

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：タンパク質を検出するための分析試薬

発明者：鈴木祥夫、横山憲二

権利者：(独)産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願2010-170805

出願年月日：2010年07月29日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木祥夫 (SUZUKI YOSHIO)

独立行政法人産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：60321907