

平成 23 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21760644
 研究課題名 (和文) 分子修飾ナノ粒子を用いた核内受容体を標的とする
 簡易薬剤スクリーニング法の開発
 研究課題名 (英文) High-throughput ligand screening of nuclear receptor
 by using gold nanoparticle modified with co-activator peptide
 研究代表者
 池野 慎也 (IKENO SHINYA)
 九州工業大学・大学院生命体工学研究科・助教
 研究者番号：20437792

研究成果の概要 (和文)：

活性化された核内受容体が結合できるペプチドを粒子表面上に修飾することで構築した機能性金ナノ粒子を用いて、核内受容体のリガンドを迅速に評価できるセンサを開発した。本センサは、リガンド結合時における核内受容体の選択的複合体形成を、機能性金ナノ粒子の吸収スペクトル変化で簡便に評価できる。また、30分以内に解析することが可能であり、核内受容体を創薬の標的とした新規薬剤スクリーニング法として期待できる。

研究成果の概要 (英文)：

We have developed functional gold nanoparticles (SRC1-GNP) for high through-put ligand screening of nuclear receptor. The SRC1-GNP was constructed to introduce the SRC-1 peptide on GNP. The SRC-1 peptide is part of co-activator, which is bound to the nuclear receptor activated by agonist. The SRC1-GNP can analyze agonist activity of nuclear receptor ligand to detect the visible spectra change of the solution. This colorimetric sensor will be specific, responsive, rapid and low-cost method for identification of lead-substances in the drug discovery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：生物機能・バイオプロセス

科研費の分科・細目：

キーワード：バイオセンサ、ナノ粒子、核内受容体、薬剤スクリーニング、局在表面プラズモン

1. 研究開始当初の背景

近年、受容体そのものが転写調節因子として機能する核内受容体が、創薬のターゲットとして注目されている。核内受容体は、糖尿

病、肥満、骨粗鬆症、ホルモン依存性腫瘍など、飽食・高齢化社会に伴い増加してきた疾患と非常に強く関わっている。

この核内受容体はリガンド依存的転写因子であり、そのリガンドは種々の脂溶性ホルモンである。遺伝子発現誘導を行う物質（リガンド）が存在すると、「核内受容体」、「コアクチベータ（転写因子）」が「標的DNA」上で機能発現複合体を形成し、その下流の遺伝子の転写調整を行うことで生体の生理機能をコントロールする。

しかし、その基礎的な研究の進展と相まって、単純な評価法による新規薬剤スクリーニング法が開発されていない現状がある。このように、現在使用されている分析法は迅速・簡便化、低コスト化すべての点で、核内受容体をターゲットとした医薬開発におけるHigh-throughput Analysis (HTA) に成り得ていないと考えられる。

評価法	評価対象	測定時間	簡便性	その他
受容体結合アッセイ	リガンドの結合のみ	迅速 (数分)	◎	リガンドまたは被験物質に標識が必要
コアクチベータを用いた受容体結合アッセイ	アゴニスト活性評価	3時間ほど	△	コアクチベータの固定化が必要 抗体を用いた測定法のため測定にコスト・時間が掛かる
FRETを利用したアフィニティ評価	アゴニスト活性評価	迅速	○	受容体・コアクチベータに双方に蛍光標識する必要がある
レポーターアッセイ法	アゴニスト活性評価	数時間～ 10数時間	△	細胞を用いるため手間がかかる

表 核内受容体機能評価法

以上のような学術的背景から、核内受容体をターゲットとする医薬品開発において、初期の段階から候補化合物の有効性を判断できるHTA法の開発が、医薬開発のスピードアップ、開発費の低減を図るうえで非常に強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、核内受容体を分子標的とした医薬開発時での薬剤候補物質のスクリーニング法を、従来法より大幅に迅速・簡便化する新規評価法の開発である。

金ナノ粒子は可視光域に表面プラズモン吸収を持つため、粒子の分散/凝集の状態により可視光域での吸収スペクトルが大きく変化する。本評価法は、その現象を利用し、金ナノ粒子に固定化した転写因子と核内受容体の複合体の形成現象を、ホモジニアスかつ *in vitro* で測定することで、薬剤候補物質の核内受容体への作用を迅速かつ簡便に検知する方法である。提案する評価法は、洗浄・分離操作が不要であるうえ、薬剤候補物質のアゴニスト/アンタゴニスト活性を数分で高感度に見出すことが可能である。

3. 研究の方法

図1に示す検出原理によりセルフリー系の迅速・簡便な評価法を考案した。上述の目的に対し、実施した研究の具体的な項目は次のものである。

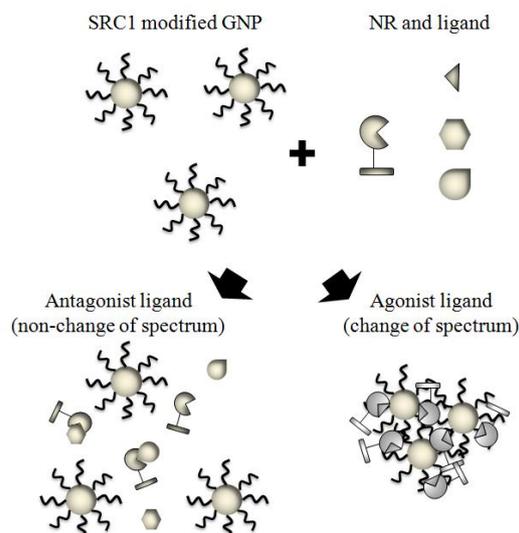


Fig.1 Schematic view of ligand screening for nuclear receptor with GNP sensor

(1) 核内受容体結合分子の評価のための機能性金ナノ粒子の創製

SRC-1 ペプチドは、ペプチド自動合成機により合成を行った。合成した SRC-1 ペプチドには、N末端にシステイン導入してあり、自己組織化単分子膜法 (SAM) により金ナノ粒子上に修飾し、機能性金ナノ粒子を作成した。

(2) 機能性金ナノ粒子の表面解析、機能解析および分散安定性の獲得

作製した機能性金ナノ粒子の反応緩衝液中 (pH7.4) における分散特性を、UV/Vis 吸収スペクトル、動的光散乱粒径測定およびゼータ電位測定により評価した。

機能性金ナノ粒子上の SRC-1 ペプチドの構造評価は、CD スペクトル、分子シミュレーションによりおこなった。

ナノ粒子の分散の安定化を目的として、C 末側に D (アスパラギン酸、pI : 2.77)、PEG を追加した新規ペプチドを合成し (粒子表面に負電荷を加える)、分散が安定した機能性金ナノ粒子を構築した。

(3) 本センサ粒子の迅速・簡便・高感度化の検討

迅速・簡便・高感度化を可能とする核内受容体 (ER α) をターゲットとした薬剤スクリーニング法の確立を行った。迅速性、感度の検討を評価した。

4. 研究成果

4.1 機能性ペプチドの設計と合成

機能性ペプチドの設計を行うにあたって、重要な点は3つある。ひとつは設計した機能性ペプチドが核内受容体と複合体を形成できることである。そのため、核内受容体(エストロゲン受容体)と結合性が確認されている SRC1 を基に機能性ペプチドを設計した。次に金ナノ粒子へ特異的に化学修飾できることである。今回、修飾方法はチオール基と金とをメルカプチド結合させる。最後は機能性ペプチドが金ナノ粒子へ修飾された後も分散を保つことである。そのためには、生体内の状態に近い緩衝液中で電荷を帯びている必要があるため、機能性ペプチドのC末端にpKaが酸性側のアミノ酸が望ましい。塩基性のアミノ酸であると緩衝液の置換を行う過程で凝集を引きおこしてしまう可能性がある。金ナノ粒子はクエン酸緩衝液中で負の電荷を帯びて分散を保っているため、電荷の正負が変化する過程で粒子同士が引き合ってしまう凝集してしまう。そのため、機能性ペプチドのC末端はpKa 3.0であるアスパラギン酸(D)にすることで、修飾後も金ナノ粒子の分散を保つと考えられる。このような3つの条件を満たす機能性ペプチドを設計する必要がある。

機能性ペプチドの核内受容体と結合する部位は疎水性の高いアミノ酸で形成されている。そのため、修飾した際に金ナノ粒子表面に吸着し、核内受容体との複合体形成を阻害する可能性が高い。そこで、金ナノ粒子表面を親水性の高いPEG(ポリエチレングリコール)で覆うことで、吸着を防ぐことができるという考えのもと、機能性ペプチドにPEGが入ったものも設計・合成した(図2)。

SRC1

CLTERHKILHRLQLQEGSPSD

PEG-SRC1



Fig. 2 Sequence of designed functional peptide

4.2 アフィニティアッセイによる機能性ペプチドのリガンド応答評価

合成した機能性ペプチドの核内受容体への結合能を確認するため、免疫染色法による

確認を行った。まず、金基板上へ合成したペプチドを修飾し、発色酵素を修飾した抗体を用いたアフィニティアッセイを行った。金基板上に修飾された機能性ペプチドは核内受容体とリガンド選択的に複合体形成していることが示された(図3)。アゴニスト活性を示すリガンドは、核内受容体とペプチドの複合体形成を促進し、一方、アンタゴニスト活性を示すリガンドは複合体形成し難いことが示された。この結果は設計した機能性ペプチドがリガンド選択性を有していることを示唆している。

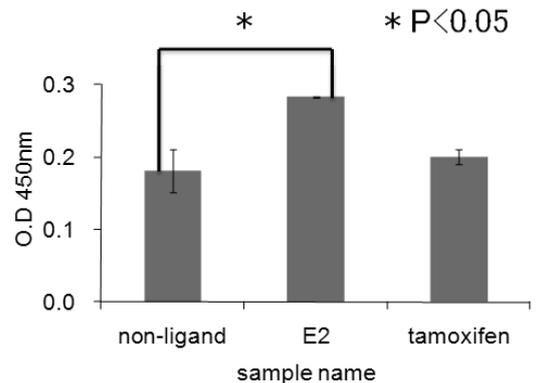


Fig. 3 Ligand response of nuclear receptor by affinity assay

4.3 機能性金ナノ粒子の表面解析、機能解析および分散安定性の獲得

設計・合成した機能性ペプチドの二次構造は、CDスペクトル測定と分子シミュレーション解析より予測したところ、ランダムな構造であると示唆された。

この機能性ペプチドを金ナノ粒子表面へ修飾することで、緩衝液中でも分散を維持した。また、このセンサナノ粒子の粒径とゼータ電位を測定したところ、修飾前に比べて粒径が増加し、ゼータ電位が変化していた。これらの結果から、機能性ペプチドの修飾によって金ナノ粒子は異なった分散特性を示しているものと考察している。

4.4 GNP センサのスペクトル変化によるリガンド応答評価

機能性金ナノ粒子へ核内受容体(ER α)と各種リガンド(E2, タモキシフェン)を加え、スペクトル測定を行った。また、リガンドの違いによる、スペクトル変化について考察を行った。機能性ペプチドを修飾した金ナノ粒子はリガンドによってスペクトル変化に違いがあることがわかった(図4)。これはリガンドと結合した核内受容体がリガンド選択的に機能性ペプチドと複合体形成するこ

とで、金ナノ粒子の凝集度合いに変化が生じていると考察する。

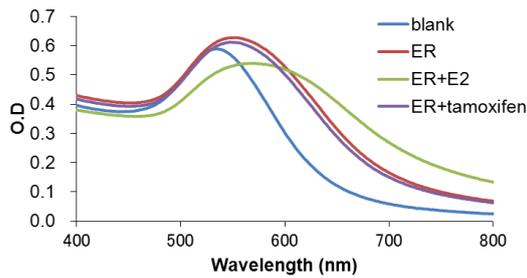


Fig. 4 Spectrum change in gold nanoparticles by formation of nuclear receptor complex

リガンドを添加して 30 分後のセンサナノ粒子の 700nm と 535nm の吸光度比をセンサ応答と定義し、本センサナノ粒子によるアゴニスト (E2) の評価を行った (図 5)。本センサはサブマイクロ以上の濃度の E2 を検知できることが明らかとなった。

この機能性ペプチドを修飾した金ナノ粒子は、核内受容体のリガンド選択性をスペクトル変化によって高感度に評価できる GNP センサとして機能すると結論した。

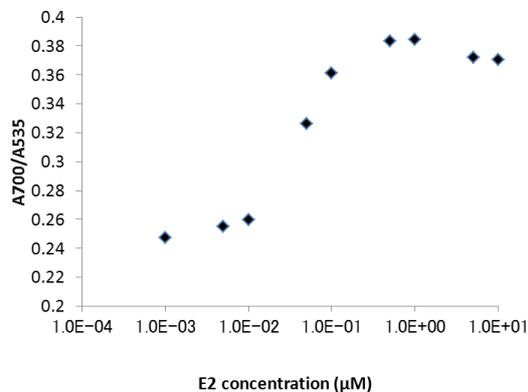


Fig.5 Calibration curve of GNP sensor. A700/A535 at 30min after addition of E2 is plotted.

結言

機能性ペプチドを設計・合成し、金ナノ粒子へ修飾することでリガンド結合時における核内受容体の選択的複合体形成をスペクトル変化によって評価できる GNP センサを構築することに成功した。また、この GNP センサを用いた本手法は核内受容体とリガンドがともに非標識であり、アゴニスト活性を評価でき、かつ 30 分以内に網羅的な解析が可

能である。これは、現在のスクリーニング手法と比較しても有用であり、今後の核内受容体をターゲットとした新規スクリーニング手法として期待される。

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)

[学会発表] (計 7 件)

発表者 (代表) 名、発表標題、学会等名、発表年月日、発表場所

- 1) 高辻義行, 池野慎也, 春山哲也、核内受容体のアゴニストスクリーニングを目的としたナノ粒子センサ、第 20 回インテリジェント材料/システムシンポジウム、2011 年 1 月 6 日、東京
- 2) 高辻義行, 池野慎也, 春山哲也、Functional designs and modifications of gold nanoparticles for affinity assay、Pacifichem 2010、2010 年 12 月 15-20 日、ホノルル (米国)
- 3) 高辻義行, 池野慎也, 春山哲也、核内受容体リガンド検出のためのナノ粒子機能化の検討、第 47 回化学関連支部合同九州大会、2010 年 7 月 10 日、北九州
- 4) 池野慎也, 高辻義行, 春山哲也、High-sensitivity homogeneous affinity sensor based on electrochemical luminescence for high-throughput analysis、Biosensor 2010、2010 年 5 月 26-28 日、グラスゴー (英国)
- 5) 池野慎也, 高辻義行, 春山哲也、核内受容体の結合分子をスクリーニングするための ECL アフィニティセンサ、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 27 日、大阪
- 6) 高辻義行, 池野慎也, 春山哲也、核内受容体結合分子の迅速検出を目的とした分子修飾ナノ粒子の開発、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム/第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム、2009 年 9 月 14 日、福岡
- 7) 高辻義行, 池野慎也, 春山哲也、核内レセプター結合分子の簡便検出を目的とした機能性ナノ粒子の構築、第 46 回化学関連支部合同九州大会、2009 年 7 月 11 日、北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池野 慎也 (IKENO SHINYA)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・助教

研究者番号：20437792

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し