

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420841

研究課題名(和文) 不可逆的な酵素阻害剤評価用バイオセンサの開発と薬剤スクリーニングへの応用

研究課題名(英文) Development of biosensor for evaluation of irreversible enzyme inhibitor and application of the sensor for screening of the reagents

研究代表者

飯田 泰広 (IIDA, YASUHIRO)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：40329305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルツハイマー病の原因となるアミロイド線維を形成するのに鍵となる酵素(β-セクレターゼ)の阻害剤を見出すためのツールを開発し、実際にスクリーニングを行い、リード化合物を得ることを目標とした。本研究において、配向性を持たせたβ-セクレターゼを固定化を可能とし、マイクロフローデバイスでの検出感度の向上を達成した。また、新規β-セクレターゼのFRET基質を開発した。更に、新規化合物および生薬抽出物に対してβ-セクレターゼ阻害能スクリーニングを行い、阻害活性を有する物質及び生薬を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：We developed evaluation system for activity of beta-secretase (BACE1) by using orientated immobilized recombinant BACE1 in combination with a FIA (Flow Injection Analysis) system. We tried to miniaturize to the system for minimize of material and reduce assay time by micro flow channel. And, we developed fusion protein which is made from ECFP, EYFP, and those linker including BACE1 recognition sequence as a novel FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) substrate and evaluate the properties. This protein has advantage not only in cost effective screening for BACE1 inhibitor but in in vivo assay for BACE1 activity. Moreover, we applied the developing system to evaluate BACE1 inhibitor. After that, the system was used as a screening method for BACE1 inhibitor from herbal medicine and novel synthesized chemicals. Read compound of BACE1 inhibitor was obtained by the screening.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：セクレターゼ 固定化酵素 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は認知症の一種であり、脳内にアミロイドβペプチド(AB)から成るアミロイド線維が沈着してできる老人斑と神経原線維が異常にリン酸化されたタウタンパクが認められる神経変性疾患病である。高齢化社会を迎えた現在において、認知症性疾患への対策が社会的に重要な課題とされており、国内に約200万人以上もの認知症の高齢者がいると考えられ、その約6割がアルツハイマー病患者であるとされている。今後、高齢者人口の急増とともに、アルツハイマー病患者が増加すると予測されるため、早期の治療薬の開発が求められている。しかし、このアルツハイマー病には、根本的な治療法、予防法がなく、症状は長期にわたって慢性に進行することが多いため、対症療法薬により進行を抑えることが主となっている。

アルツハイマー病の原因は、ABであると考えられており、また、その産生にはβ-セクレターゼが関わっていることから、当該酵素を阻害することにより、新たな抗アルツハイマー薬が開発できると考えられる。

## 2. 研究の目的

固定化β-セクレターゼを基礎としたバイオセンサを構築し、その活性を阻害する物質をスクリーニングする効果的なデバイスの開発を行う。これまでの概念とは異なり、活性を阻害した後、阻害剤を除去した後も阻害状態が続くかという「不可逆的な阻害(阻害の持続性)」を指標として阻害物質をスクリーニングするものである。アルツハイマー病に効果が期待されるβ-セクレターゼ阻害剤のスクリーニングを行うため、固定化に適したβ-セクレターゼ構築・産生させ、スクリーニングを行い、不可逆的に効果のある物質を探索することを目的としている。薬剤開発へ貢献すると共に、他の様々な阻害剤開発への応用が可能であることを例証するが出来ると思われる。これらの目的を達成するために、具体的には以下の項目を小目的とした。

### (1) 配向的固定化用β-セクレターゼの構築

β-セクレターゼの活性を評価するためのバイオセンサを構築する。阻害剤の持続性を評価するために当該酵素を固定化して用いるが、その際、最大限に発揮させるため、固定化の際に配向性を持たせて固定化を行うために独自の組換えβ-セクレターゼの開発を行う。

### (2) マイクロフローセンサシステムの構築

β-セクレターゼの活性を評価するためのマイクロフローを基礎としたセンサシステムの開発を行う。

### (3) 新規β-セクレターゼ活性評価用基質の開発

組換えβ-セクレターゼを用いて大量のスクリーニングを行うために市販の基質を購入することはコスト的に高価である(約100 assay/70,000円)。通常の当該酵素の基質は、

酵素に識別されるアミノ酸配列(-EVKMDAEF-)と蛍光色素からなっており、合成するにはペプチドの合成と成功色素の修飾が必要である。そのために、安価につくれる新規の基質を構築する。

### (4) β-セクレターゼ阻害物質の探索

構築した活性評価法をもとに、市販生薬を対象に阻害活性物質の探索を行う。また、新規化合物を対象に阻害能評価を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 配向的固定化用新規β-セクレターゼの構築とAuプレートへの固定化

β-セクレターゼは、基質であるタンパク質を識別する部位と切断するためのアスパラギン酸を中心とした活性部位とかならなるが、この他に膜に自身をつなぎとめる長い尾部を有している。この尾部は、酵素活性に影響がないため、その領域にビオチンと特異的に結合できるタンパク質であるストレプトアビジンを融合させた新規β-セクレターゼの構築に取り組んだ。

当初の予定では、精製用にヒスチジンタグをβ-セクレターゼに導入する予定であったが、発現用ベクターに、もともとヒスチジンタグが挿入してあるpColdベクターを用いることにより当該タグを導入せずに行った。また、配向性を持たせるためにリシン残基を導入する予定であったが、より特異性、選択性を向上させるために微生物である*Streptomyces avidinill*からストレプトアビジンをクローニングし、ストレプトアビジン融合β-セクレターゼを構築することとした。*Streptomyces avidinill*は、理研BRCより購入し、PCRによりストレプトアビジン遺伝子のクローニングを行った。また、かずさDNA研究所で保有しているBACE1(β-セクレターゼ)配列を有するpFN21Aベクターを購入、β-セクレターゼ配列を同様にPCRによりクローニングし、それぞれをIn-fusion法によりpColdベクターに導入した。発現用ベクターを大腸菌に形質転換後、培養し、目的とするβ-セクレターゼを得た。

得られた組換えβ-セクレターゼは、大腸菌に形質転換後、発現誘導、破碎処理により目的タンパク質を抽出し、当該粗抽出液をNi-NTAによるHisタグを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製を行った。Auプレート上に、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinを用いてビオチンを導入、Auプレート上にSAMを形成させ、そのビオチンと融合タンパク質のstreptavidinを結合させることによって配向性を持たせた固定化を行った。固定化Auプレートの表面を走査型プローブ顕微鏡(SPM)により評価した。

### (2) マイクロフローセンサシステムの構築

Auプレート上に固定化した組換えβ-セクレターゼは、レーザー加工機により作製した

デバイスに挿入後、Fig.1 に示すように、フローシステムに導入して酵素活性を評価した。活性は市販の基質( $\beta$ -secretase substrate2)を用いて評価した。また、従来用いているCPG(Controlled Pore Glass)を担体として用いた場合と活性の比較を行った。

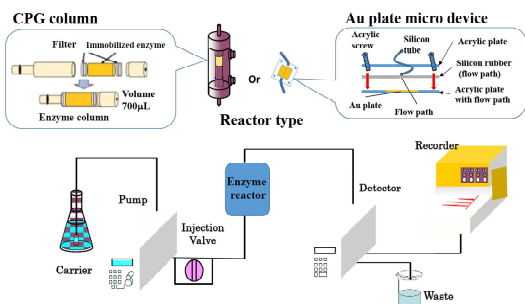


Fig.1 Schematic diagram of FIA system using in this study

### (3) 新規 $\beta$ -セクレターゼ活性評価用基質の開発

$\beta$ -セクレターゼが識別する配列の両端に2種類の蛍光タンパク質(YFP (Yellow Fluorescent Protein), CFP (Cyan Fluorescent Protein))を配置した融合タンパク質の構築を行った。

YFPとCFPの遺伝子をクローニングし、 $\beta$ -セクレターゼの認識配列で両タンパク質を繋いだ状態のDNAを構築し、発現ベクターであるpColdに導入、大腸菌に形質転換を行った。CFPの励起光である440 nmを照射し、生じる475 nmの蛍光波長がYFPの励起波長となり527 nmでの蛍光を測定でき、酵素活性により切断されれば、この現象(FRET: Fluorescence resonance energy transfer)が起こらず、475 nmの蛍光が観察される。この蛍光を評価することで $\beta$ -セクレターゼ活性を評価できるシステムの構築を行った。

### (4) $\beta$ -セクレターゼ阻害物質の探索

市販生薬を50%エタノールにより抽出後、エバポレーターにより減圧留去後、凍結乾燥することにより約300種の生薬抽出物を得、構築した組換え $\beta$ -セクレターゼ活性評価システムを用いて当該酵素の阻害能を有する生薬抽出物のスクリーニングを行った。また、本学(神奈川工科大学応用化学科)山口淳一准教授より提供された新規化合物に対して同様に阻害能の評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 配向的固定化用新規 $\beta$ -セクレターゼの構築

クローニングした $\beta$ -secretaseとstreptavidinの配列をシークエンサーで確認した結果、データベースと100%一致しており、また、融合タンパク質が構築できていることを確認した。当該融合タンパク質と、streptavidinを用いない配向性を考慮しない通常の固定化法によってAuプレートに固定化した酵素の状態を比較した結果をFig.2に示す。配向性

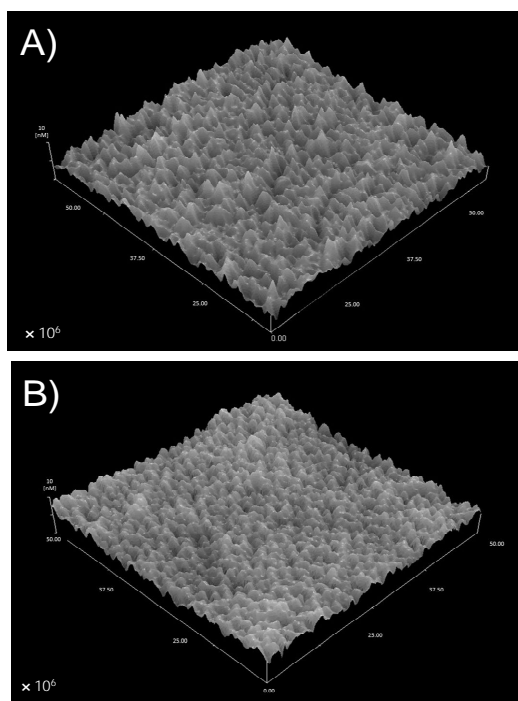


Fig. 2 Evaluation of the surface of orientational controlled immobilized enzyme and w/o the control. sSurface of Au plate of immobilized enzyme; A) without control the orientation, B) control the orientation.

を持たせた場合、分子の高さが約25 nmになることが計算により見積もられているが、本実験でも高さがそろったほぼ均一の表面を観察することができた。一方、配向性を与えなかった場合は、不均一であることが示された。

### (2) マイクロフローセンサシステムの構築

当該融合タンパク質を用いて固定化を行い、フローシステムに組み込んで計測した。その応答曲線をFig. 3に示した。既存法であるCPGを用いた活性評価では、ピークが上昇し始めてから、ベースラインに戻るまでの時間が約7 min程度であるのに対して、Auプレート上への固定化法では、約1 min 30 secであり、ベースラインの確認を考慮すると、同一時間内において約10倍のサン

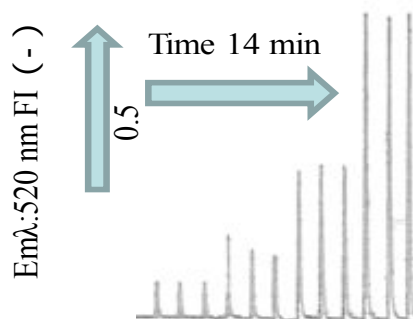


Fig. 3. Response curve of  $\beta$ -secretase immobilized by biotin-streptavidin method on Au plate. Injection volume is 5  $\mu$ L and flow rate is 500  $\mu$ L/min.

プルを評価することが可能となった。また、注入の用量は既存法では 20  $\mu\text{L}$  であるのに対し、Au プレートを用いたデバイスでは 5  $\mu\text{L}$  で Fig.3 のような良好なピークを得ることができた。また、当該システムを用いて作製した検量性を Fig.4 に示す。システムの検出限界は 18.75 nM であり、感度良く計測できることが示された。

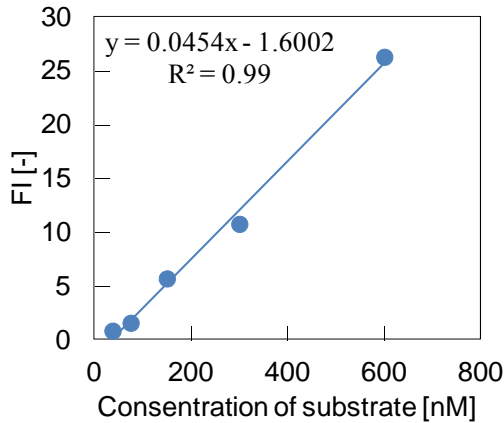


Fig.4 Calibration curve of  $\beta$ -secretase

### (3) 新規 -セクレターゼ活性評価用基質の開発

作製した新規 FRET 蛍光基質 (pCold1-ECFP- $\beta$ SRS-EYFP) を大腸菌から抽出し、電気泳動を行った結果、目的分子量付近にバンドを確認することができ、また、当該 DNA 配列のシークエンスを確認した結果、目的配列と一致していたことから、目的 DNA をクローニングできたと判断した。精製して得たタンパク質の SDS-PAGE の結果、目的タンパク質分子量と一致していた。また、当該ベクターを保有する大腸菌を培養しタンパク質発現の誘導を行った後、蛍光顕微鏡による観

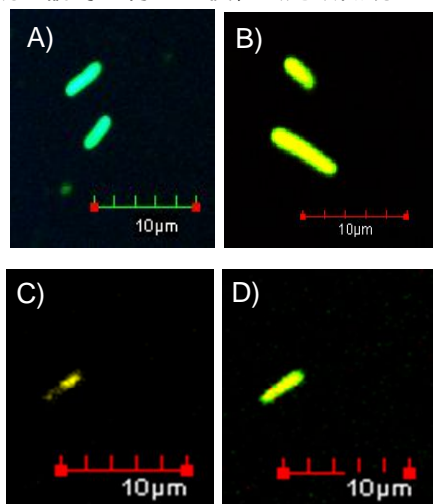


Fig.5 Evaluation of the fusion protein by confocal microscopy .

A) ECFP (Ex 405 nm), B) EYFP (Ex 473 nm), C) ECFP-bSRS-ETFP (Ex 405 nm), D) ECFP-bSRS-ETFP (Ex 405 nm)

察とタンパク質の精製とその評価を行った。顕微鏡観察の結果を Fig. 5 に示す。A)は ECFP 遺伝子のみを形質転換した大腸菌であり、B) は、EYFP 遺伝子のみを形質転換した大腸菌である。それぞれの励起波長によって、青色、黄色に蛍光していることが観察された。一方、C) および D)は、ECFP- $\beta$ SRS-EYFP 遺伝子を形質転換した大腸菌であり、本来の CFP の励起波長である 405 nm で励起しても、YFP 様の蛍光を観察することができた ( Fig. 5-C))ことから、作製した ECFP- $\beta$ SRS- EYFP が FRET を示すことが示唆された。当該タンパク質が BACE1 の基質となり、FRET が観察されなくなるかを調べるために、ECFP、EYFP および ECFP- $\beta$ SRS-EYFP の蛍光スペクトルの計測を行った。ECFP- $\beta$ SRS-EYFP では、ECFP の励起波長 436 nm で励起した結果、Fig. 6 A)に示すように、EYFP の蛍光波長 530 nm が最大蛍光波長となり、実際に FRET をしていることが例証された。また、BACE1 遺伝子を同じ発現ベクターである pCold I にクローニングして発現・精製した BACE1 と当該タンパク質を反応させた後、蛍光スペクトルを観察すると、530 nm の蛍光が減少し、476 nm の蛍光が上昇したことから(Fig.6 B)), 当該タンパク質は BACE1 の基質として正常に作用していることが示唆された。本研究で開発した BACE1 の新規基質は、タンパク質を生成させるのみで得られ、また、細胞内での計測にも応用が可能であるため、有用であると思われる。

### (4) -セクレターゼ阻害物質の探索

構築したセンシングシステムを利用して、既存阻害剤である、KMI429 の阻害特性を

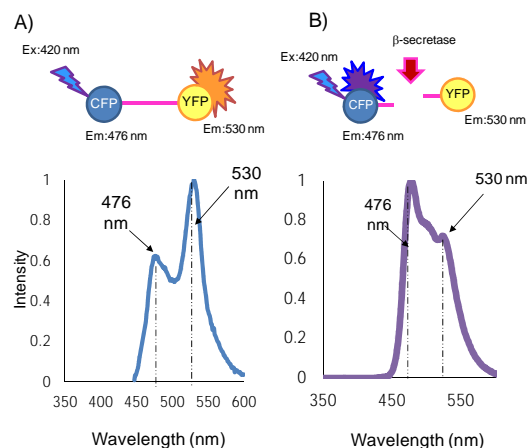


Fig.6 Fluorescent spectrum of ECFP- $\beta$ SRS-EYFP

評価した結果、阻害濃度に応じて阻害活性を評価することが示された。当該酵素の持続性を評価した結果、一時的な阻害であり、当該阻害剤が基質のアナログであることを考慮すると、適切な結果が得られたと考えられた。更に、固定化した系で Lineweaver-Burk plot から  $K_i$  値を評価した

結果 (Fig.7)、固定化を行わない本来の  $K_i$  値とほぼ同じ値であることを確認することができ、当該システムを阻害剤スクリーニングに応用することが可能であることが示された。

そのため、市販生薬抽出物に阻害能を有する生薬のスクリーニングを行い、鶏血藤抽出物に阻害能を有する物質が含まれていることを見出した。また、新規化合物 (Fig.8) を対象に阻害能を評価した結果、HVS(5)をはじめとして、HVG(1)、HLG(2)、HLS(6)などに阻害能が見出され、新たな  $\beta$ -セクレターゼ阻害剤のリード化合物になりえることが示唆された。

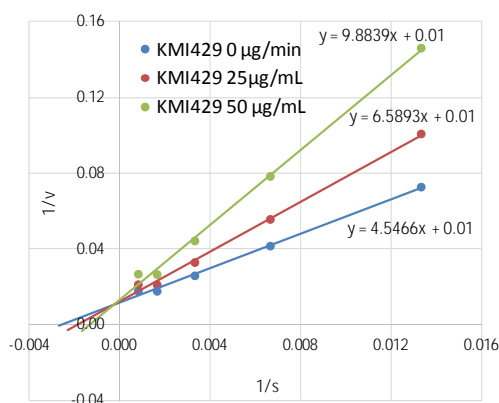


Fig.7 Lineweaver-Burk analyses of effect of KMI429 on the  $\beta$ -secretase activity

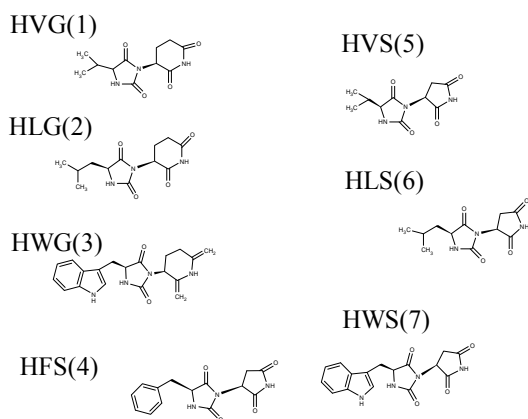


Fig.8 Novel synthesized chemicals as a candidate for  $\beta$ -secretase inhibitor

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 14 件)

飯田泰広、安達 稔、大工原七星、政木貴樹、新規  $\beta$ -セクレターゼ用 FRET 基質の構築とその評価、2016 年電気化学会第 83 回大会

安達稔、飯田泰広、山口淳一、蛍光タンパク質を用いた BACE1 新規 FRET 基質、日本農芸化学会 2016 年度大会

Y. Iida, Flow injection analysis of  $\beta$ -secretase activity by using of immobilized recombinant fusion  $\beta$ -secretase and application of the system for the inhibitor, PACIFICHEM 2015

M. Adachi, Y. Iida, Development of the novel FRET substrate for  $\beta$ -secretase activity assay, PACIFICHEM 2015

政木貴樹、白石有希、飯田泰広、固定化酵素とフローシステムを用いた  $\beta$ -secretase 活性評価システムの構築、第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015

安達稔、飯田泰広、蛍光タンパク質を用いた  $\beta$ -セクレターゼ活性評価法の開発、日本防菌防黴学会第 40 回年次大会 (2015)

Y. Shiraishi, A. Koike-Takeshita, A. Yamamura, J. Yamaguchi, Y. Iida, Development of evaluation system of  $\beta$ -secretase activity in combination with a immobilized recombinant fusion  $\beta$ -secretase and a flow system, The 19th Inter National Conference on Flow Injection Analysis (2014)

Y. Shiraishi, A. Koike-Takeshita, A. Yamamura, J. Yamaguchi, Y. Iida, Evaluation of beta-secretase inhibitory activity of compound with a hydantoin backbone by the combination of immobilized human recombinant immobilized beta-secretase and Flow Injection Analysis system, 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014)

安達稔、安齋源太、飯田泰広、 $\beta$ -セクレターゼ活性評価用新規 FRET 基質の構築、第 4 回 CSJ 化学フェスタ (2014)

白石有希、小池あゆみ、山村晃、飯田泰広、組換え固定化  $\beta$ -セクレターゼを組み込んだフローシステムによるセクレターゼ活性評価システムの構築、電気化学会第 81 回大会 (2013)

Y. Shiraishi, A. Koike-Takeshita, Y. Iida, Construction of the System for Evaluation of Secretase Activity by using Immobilized Recombinant  $\beta$ -secretase based on Flow System, 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013)

Y. Iida, M. Mikami, S. Fujiwara, Y. Shiraishi, J. Yamaguchi, Development of Evaluation System for  $\beta$ -Secretase Activity and Investigation of the Property of the Inhibitor, the 10th Asian Conference on Chemical Sensor (2013)

Y. Shiraishi, J. Yamaguchi, Y. Iida, Construction of the System for Evaluation of beta-Secretase Activity based on a Flow Analysis, the 10th Asian Conference on Chemical Sensor (2013)

白石有希、山口淳一、飯田泰広、固定化組換え  $\beta$ -セクレターゼとフローシステムによるセクレターゼ活性評価法の構築、Separation Science 2013

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 泰広 (IIDA, Yasuhiro)

神奈川県工科大学・応用バイオ科学部・教授  
研究者番号：40329305