

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560202

研究課題名(和文)病態機能イメージングのための細胞内キナーゼ活性蛍光プローブの開発

研究課題名(英文)Development of fluorescent probes for monitoring of intracellular kinase activity to functional imaging of diseases

研究代表者

片山 佳樹 (KATAYAMA, YOSHIKI)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70284528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：2種類のプロテインキナーゼ活性をモニタリングできる分子プローブシステムを開発した。すなわち、量子ドットと蛍光標識カチオン性基質ペプチドを用いるFRET型と、ポリイオン錯体型のキナーゼ蛍光プローブを開発した。双方とも、リン酸化により静電相互作用が減弱して複合体が解離することでratiometricにキナーゼ活性の評価が可能であった。阻害剤の評価も良好であり、薬剤探索に利用可能な分子プローブの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Two types of molecular probing systems were developed for monitoring protein kinase activity. One is FRET type molecular system consisting of fluorescence-labeled cationic substrate peptide and anionic quantum dot and another one is polyion complex type nanoparticle consisting of TAMRA-labeled polyanion and dextran having cationic peptide substrate as side chain and small amount of Cy5 as internal standard. Both systems changed their fluorescence intensity with the phosphorylation on the peptide substrate due to decrease of the electrostatic interaction between peptide and QD or peptide conjugate dextran and polyanion. Also both systems could evaluate the IC50 of known some kinase inhibitors so the both systems could be useful for kinase inhibitors screening.

研究分野：分析化学、ケミカルバイオロジー、医用工学

キーワード：蛍光分子プローブ プロテインキナーゼ バイオ分析 プロテインキナーゼ 細胞内情報伝達 薬物探索

### 1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼは細胞内にあって細胞の情報処理過程の中核をなす酵素群である。疾患では特定のキナーゼの異常活性化が病態に直結している場合が多く、特にそのような病理的活性状態を分析すること病態を知るうえで極めて重要である。したがって、そのイメージングは医療や創薬において大きなインパクトを与える技術であるが、これまでにキメラタンパクを利用したセンサーがあるだけで、任意のキナーゼに利用可能な蛍光プローブは存在しなかった。

一方、我々はこれまでに任意の標的キナーゼでリン酸化されると遺伝子を放出できるペプチドコンジュゲートを開発し、標的疾患細胞でのみ遺伝子を働かせるシステムや、基板上に固定化したペプチド基質のリン酸化部位を蛍光検出する手法を開発しており、それらの成果に立脚し、静電相互作用を利用する新規な蛍光性ポリオン錯体型のプローブ、および亜鉛錯体を利用する小分子型のプローブを着想した。

### 2. 研究の目的

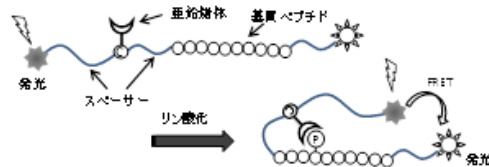
本研究では、細胞内の任意のプロテインキナーゼ(タンパク質リン酸化酵素)の活性を基質に対するリン酸化を利用して蛍光シグナルの変化を元に可視化できる新しいイメージング剤を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

プロテインキナーゼの蛍光プローブ開発に当たっては、当初、小分子型の金属錯体を利用したタイプと、量子ドットを利用するタイプを検討した。

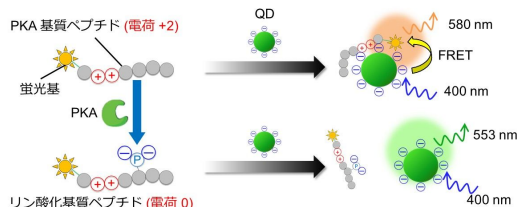
小分子型に関しては、分子内に標的キナーゼでリン酸化される基質ペプチドと、リン酸化部位に結合可能な亜鉛錯体を組み込んだ分子を設計し合成を試みた。固相合成を基本

#### 小分子型プローブ



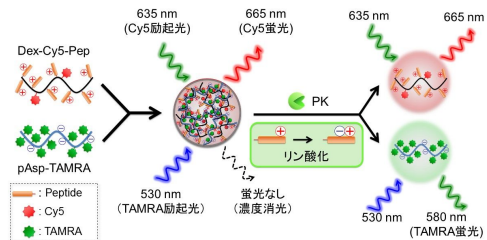
とし、種々の合成ルートを試みた。

また、量子ドットを利用する分子プローブとしては、下図のように、カチオン性ペプチド基質に蛍光標識し、アニオン性の量子ドットとの間の静電相互作用で蛍光エネルギー移動を生じ、これがリン酸化によって解消さ



れるシステムを設計、合成した。さらに当初

の予定にはなかったが、ポリオン錯体からなるシステムも設計して合成した。これは、2種の異なる蛍光色素(Cy5とTAMRA)をそれぞれ、カチオン性基質ペプチドをグラフトしたデキストランとポリアスパラギン酸に導入したものを合成し、両者のポリオン錯体型ナノ粒子を調製したもので、キナーゼによる基質ペプチドのリン酸化によるナノ粒子崩壊に伴う蛍光変化を評価した。

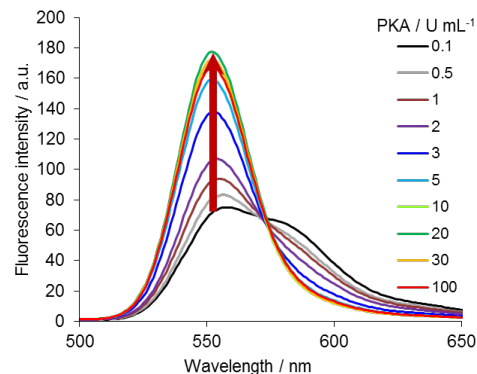


また、得られたプローブシステムに関しては、リン酸化に伴う蛍光変化を評価後、実際に既知の阻害剤を用い、そのIC50値を計測して、システムの妥当性を評価した。

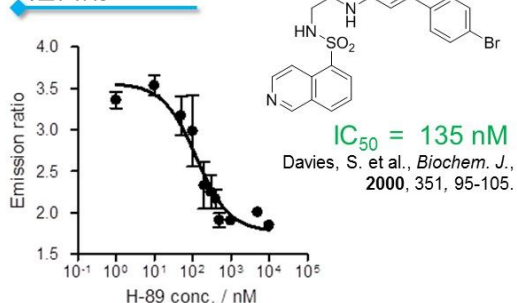
### 4. 研究成果

小分子型プローブに関しては、種々の合成を試みたが、立体障害などが原因で基本骨格の合成には至らなかった。現在も保護基の検討などを続けている。

一方、量子ドットを用いるプローブに関しては、プロテインキナーゼA(PKA)を対象としたシステムを検討した。すなわち、PKAに対する特異基質としてKemptideを用い、そのアミノ末端にジエチレングリコール Spacer を介してTAMRAを導入した。このペプチドを種々の濃度のPKAを混合してリン酸化反応をした後、5~10 nmの量子ドットを添加したところ、PKAの濃度依存的にFRETの解消が見られた。すなわち、基質のリン酸化に伴うペプチドの量子ドットからの解離による蛍

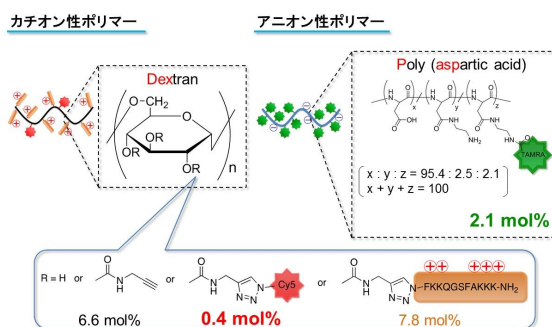


#### 阻害剤: H-89

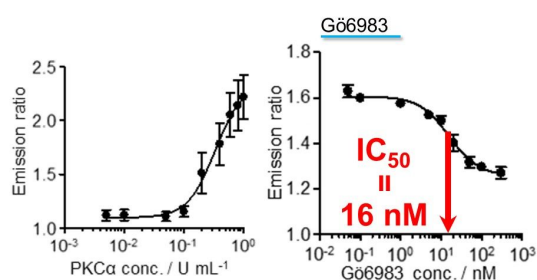


光変化で Ratiometric にキナーゼ活性が評価可能であることが示唆された。また、このシステムを用い、既知の PKA 阻害剤である H-89 の IC50 値を算定したところ、125 nM という値が得られ、これは報告値の 135 nM と良い一致を示した。

また、ポリイオン錯体型としては、以下に示したような分子を合成した。この場合、ポリアスパラギン酸には、TAMRA をポリイオン錯体ナノ粒子中で濃度消光を起こすように



2 mol% で導入し、一方、デキストランには、がんが亢進しているプロテインキナーゼ  $\text{C}\alpha$  (PKC $\alpha$ ) に対する基質と Cy5 をクリック反応により導入した。Cy5 については、ナノ粒子形成前後で蛍光強度に変化が生じないように、4 mol% 導入し、これを内部標準蛍光として用いて ratiometry を可能とした。双方のポリマーを 1:1 で混合すると、100 nm 程度の均一な粒径を有するナノ粒子が形成され、TAMRA の蛍光は効率よく消光されたが、Cy5 の蛍光強度はナノ粒子形成前後で変化なく一定であった。そこで、種々の濃度の PKC $\alpha$  によりリン酸化した後の蛍光変化を両者の蛍光強度比でプロットしたところ、下図左のように良好な応答を示した。また、PKC $\alpha$  の阻害剤である Gö6983 の IC50 値を評価したところ、16 nM という値が得られ、報告された値と良い一致を示した。



以上の結果より、量子ドットを用いた FRET を利用する分子プローブと、ポリイオン錯体型で内部標準を用いる分子プローブの 2 種の新規な ratiometric 型計測システムの開発に成功した。

#### 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 8 件)

1) C.W. Kim, D. Asai, J.-H. Kang, A.

Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, Reversal of efflux of an anticancer drug in human drug-resistant breast cancer cells by inhibition of protein kinase C alpha activity, *Tumor Biol.* **37**, 1901-1908 (2016)

2) D. Funamoto, D. Asai, C. W. Kim, Y. Nakamura, E. K. Lee, T. Nobori, T. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Tandemly Repeated Peptide for Cancer-specific Gene Carrier Prepared by Native Chemical Ligation, *Chem. Lett.* **44**, 474-476 (2015)

3) K. Li, H. Sato, C.W. Kim, Y. Nakamura, G.X. Zhao, D. Funamoto, T. Nobori, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, Tumor accumulation of protein kinase-responsive gene carrier/DNA polyplex stabilized by alkanethiol for intravenous injection, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **26**, 657-668 (2015)

4) H. Sato, Y. Nakamura, E. Nakhaei, D. Funamoto, C. W. Kim, T. Yamamoto, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, A liposome reversibly coated with serum albumin, *Chem. Lett.*, **43**, 1481-1483 (2014)

5) T. Nobori, S. Shiosaki, T. Mori, R. Toita, C. W. Kim, Y. Nakamura, A. Kishimura, T. Niidome, Y. Katayama, A fluorescent polyion complex nanoparticle that incorporates an internal standard for quantitative analysis of protein kinase activity, *Bioconjugate Chem.*, **25**, 869-872 (2014)

6) D. Asai, R. Toita, M. Murata, Y. Katayama, H. Nakashima, J.-H. Kang, Peptide substrate for G protein coupled receptor kinase 2, *FEBS Lett.*, **598**, 2129-2132 (2014)

7) S. Shiosaki, T. Nobori, T. Mori, R. Toita, Y. Nakamura, C. W. Kim, T. Yamamoto, T. Niidome, Y. Katayama, A protein kinase assay based on FRET between quantum dots and fluorescently-labeled peptides, *Chem. Commun.*, **49**, 5592-5594 (2013)

8) J.-H. Kang, T. Mori, H. Kitazaki, T. Niidome, K. Takayama, Y. Nakanishi, Y. Katayama, Serum protein kinase C as a diagnostic biomarker of cancers, *Cancer Biomarker*, **13**, 99-103 (2013)

[学会発表](計 22 件)

1) Yoshiki Katayama, Molecular systems for disease cell-specific gene regulation with peptide-grafted polymer, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 25 日, 同志社大学

2) Yoshiki Katayama, Synthetic alternative of therapeutic antibody, The 8<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 2016 年 1 月 21 日, 武田薬

品工業研修所

3) 片山佳樹、生体シグナル工学の創製に向けて、第18回生命化学研究会、マーキーズ島原、2016年1月8日

4) 片山佳樹、新しいがんターゲットのための分子システム、新規医療イノベーションのためのシンポジウム2015、千里東急ホテル、2015年10月21日

5) Yoshiki Katayama, Protein kinase C-alpha responsive molecular system for tumor imaging and therapy, 第74回日本癌学会学術集会, 名古屋国際会議場, 2015年9月8日

6) 片山佳樹、細胞情報を対象とする新しい分析法と治療法、分析化学海中部支部静岡講演会、静岡県立大学、2015年9月28日

7) Yoshiki Katayama, How we can access to cancers? Development of cancer treatment strategies using signal engineering, The 1<sup>st</sup> Annual International Symposium on Bio-Therapeutics Delivery, Seoul National University, 2015年9月14日

8) Yoshiki Katayama, Purnima Kumar, Md. Zahangir Hosain, Daiki Funamoto, Akihiro Kishimura, Takeshi Mori, Suppression of Inflammatory Cytokine with "Eat-me" Signal Bearing Particles, 42<sup>nd</sup> Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition, Edinburgh International Conference Centre, 2015年7月28日

9) Yoshiki Katayama, Yuta Nakamura, Kai Li, Daiki Funamoto, Akihiro Kishimura, Takeshi Mori, Gene delivery system using serum proteins for effective cancer therapy, Biomedical International 2015, Kenting, Taiwan, 2015年6月2日

10) Yoshiki Katayama, How we can access to cancers? -Development of cancer cell treatment strategies using cell signal engineering-, Biomedical Engineering Seminar, Mahidol University, Thailand, 2015年3月18日

11) Yoshiki Katayama, How we can access to cancers? -Development of cancer cell treatment strategies using cell signal engineering-, Higo project 最先端研究セミナー, 熊本大学医学部, 2015年2月4日

12) Yoshiki Katayama, Small molecule that exerts a similar activity to antibody drug, JSPS A3 Foresight International Symposium on Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine, 東京女子医科大学, 2014年10月8日

13) Yoshiki Katayama, Design of highly cancer specific gene delivery system using intracellular signal-responsive gene regulation carrier, The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, Chang Gung University, Taiwan, 2014年8月27日

14) Yoshiki Katayama, Intracellular signal-responsive carriers as new strategy to secure cell specificity to tumor gene delivery, Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition, Hilton Chicago, USA, 2014年7月14日

15) 登貴信、塩崎秀次郎、中村雄太、串尾聡之、森健、片山佳樹、第62回高分子学会年次大会、2013年5月30日

16) Yoshiki Katayama, Intracellular signal-responsive gene regulation delivery to address recent problem in cancer targeting, 2013 Global Innovation Research Center Symposium, Korea Institute of Science and Technology, Korea, 2013年7月3日

17) Yoshiki Katayama, Satoyuki Kushio, Akira Tsuchiya, Takuro Niidome, Takshi Mori, pH-sensitive PEG-modification onto cell signal-responsive polymers for improved colloidal stability and cell specificity in gene delivery, 40<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Hawaii Convention Center, USA, 2013年7月22日

18) Chan Woo Kim, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Stabilization of complex with PKC-alpha-specific LPEI-peptide conjugates via hydrophobic interaction, 40<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Hawaii Convention Center, USA, 2013年7月23日

19) Yoshiki Katayama, Gene delivery responding to cellular signal as a possible candidate to address current problem in cancer targeting, 第5回アジア・アーデンカンファレンス, 名古屋市立大学, 2013年8月5日

20) Takanobu Nobori, Shujiro Shiosaki, Yuta Nakamura, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Measurement of protein kinase activity based on FRET between QDs and fluorescently-labeled peptides, ASIANALYSIS XII, 九州大学百年記念講堂, 2013年8月22日

21) Yoshiki Katayama, Cell signal-responsive gene delivery for tumor-specific theranostics, 2<sup>nd</sup> International Symposium on Nanomedicine Molecular Sciences, 東京大学山上会館, 2013年10月8日

22) Yoshiki Katayama, Cell signal-responsive gene regulation delivery to address recent problem to cancer targeting, A3 Foresight Program Symposium, Sichuan University, China, 2013年12月18日

〔図書〕(計 1件)

片山佳樹、細胞内シグナル応答型ナノDDS:

D-RECS システム、細胞工学、34、972 - 976  
(2015)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~katayama/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

片山 佳樹 (KATAYAMA, Yoshiki)  
九州大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：70284528

### (2)連携研究者

森 健 (MORI, Takeshi)  
九州大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：70335785