

令和元年9月6日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05827

研究課題名(和文) 蛍光性リポソームを用いた酵素活性の高感度分析

研究課題名(英文) Effective Enzyme Assay System by Using a Fluorescent Liposome

研究代表者

宮武 智弘 (Miyatake, Tomohiro)

龍谷大学・理工学部・教授

研究者番号：10330028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来法とは大きく異なり、蛍光色素を内封したリポソームとその分子膜を透過する分子を用いて、酵素反応の活性を簡便かつ蛍光発光により評価できるシステムの構築を行った。本申請の課題では、より低い濃度で活性を有する新しい膜透過性分子を設計・合成することで、より少ない酵素量で活性評価が行えるシステムの開発を目指した。オリゴペプチドに疎水性の置換基を導入する、あるいは従来の膜透過性ポリマーの化学修飾によって膜透過活性の向上を実現できた。さらに生理的に重要な酵素であるキナーゼを対象とした酵素活性評価を実現でき、僅か0.56マイクロリットルのサンプリング量で活性評価が可能な系を開発することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、高い膜透過活性を持つペプチド、高分子の合成に成功し、これらの構造と機能の解析をさらに進めることで、分子の細胞膜透過性に関する研究の進展に寄与し、細胞への薬物輸送などさらなる応用研究にも発展できると期待される。また、これらの膜透過性分子を利用して、より少量の酵素反応液でその活性評価ができたことは、酵素活性試験の低コスト化に寄与し、医薬品開発のさらなる進展に寄与できる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Here we developed a novel kinase assay system by using fluorescent liposome and membrane penetrating compounds. The newly prepared oligoarginines possessing a hydrophobic group and guanidinated polyallylamines showed effective translocation activities against the lipid membrane of the liposomes. The highly activated membrane penetrating compounds provided an effective kinase assay system, which needed a tiny amount of the enzyme reaction mixture, c.a. 0.56 microliter, to achieve the fluorescence assay.

研究分野：生物有機化学

キーワード：酵素アッセイ リポソーム 膜透過性分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発・創薬研究においては、薬理活性をもつ化合物あるいはその化合物の基本構造を探索することが極めて重要である。薬理活性をもつ分子の中で酵素阻害剤は広く用いられており、膨大な数の候補化合物の酵素阻害活性を迅速に分析することが求められている。現在、酵素活性の評価では、基質分子を放射性同位体や蛍光色素で標識し、酵素反応後に消費された基質を定量する手法が広く用いられているが、基質分子への標識が必要であるため操作が煩雑になるだけでなく、標識により酵素活性が変化する恐れもあることから、ラベルフリーな検出法が望まれている。また酵素などの生化学試薬が高価であるために検査コストが高くなる問題もあり、分析感度を上げ、微量のサンプルでも効果的に活性評価が行なえる酵素活性の分析手法が求められている。

2. 研究の目的

医薬品の開発等に不可欠な酵素および酵素阻害剤の活性評価を、従来法よりも簡便、迅速かつ高感度に行える全く新しい蛍光検出型の分析手法を開発する。ここでは、カチオン性のペプチドや高分子化合物がリポソームの脂質二分子膜を透過する現象を応用して、酵素反応溶液中の基質の濃度変化を蛍光強度の変化として検出する。こうして酵素反応を可視化し、その活性評価を容易にするラベルフリーな分析系を構築する。本研究期間内に、癌治療に役立つキナーゼ類など生理的に重要な酵素群の活性評価を、従来法に比べて高感度で実施できる評価系の確立を目標とする。

本研究では、オリゴペプチドが細胞膜を透過する生命現象を人工的に再現し、これを酵素活性の分析へと応用する。膜透過活性を有するペプチドや水溶性高分子と、蛍光色素を高濃度で封入したリポソーム（蛍光性リポソーム）をそれぞれ利用する。これまでの研究から、カチオン性のオリゴペプチド（オリゴアルギニンなど）は、両親媒性のアニオン分子（ドデシルホスフェイトなど）とイオンペアを作るとリポソームの脂質二分子膜を容易に透過し、このときリポソーム内に封入された蛍光色素が外部へ放出されて濃度消光の解消に伴う蛍光発光を発する、ことが確認されている。さらに、これらの膜透過性ペプチドの活性は系内に共存する分子の種類や濃度によって大きく変化すること、を見出している。例えば、図1に示すように、アニオン性のアデノシン三リン酸（ATP）が系内に存在すると、これがオリゴアルギニンと両親媒性アニオンとの複合化を阻害し、膜透過が抑制される。このとき、プロテインキナーゼなどATPを基質とする酵素反応と組み合わせると、酵素反応の進行に伴ってATPが減少するとともに膜透過活性が回復することによる蛍光発光が生じる、ことになる。この仕組みを利用してプロテインキナーゼ、ヘキソキナーゼ、コリンエステラーゼなど、10種以上の酵素活性の蛍光検出に成功している(T. Miyatake, et al., *JACS*, 128, 1114 (2006); 宮武智弘, *オレオサイエンス*, 11, 39 (2011))。

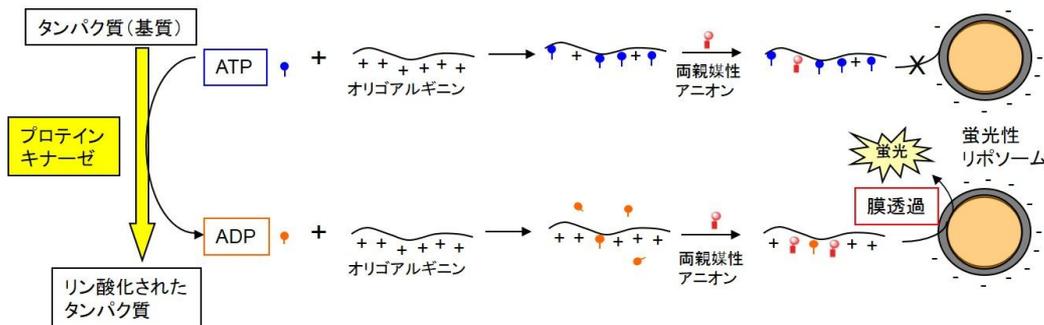


図1. 蛍光性リポソームを用いたプロテインキナーゼの検出. カチオン性の膜透過性ペプチド(オリゴアルギニン)は、アニオン性のリン酸基を持つATPと錯形成すると、その正電荷が中和されて表面が負電荷であるリポソームに対する膜透過現象が抑制される。しかし、酵素によってATPのリン酸基が1つ失われると、オリゴアルギニンの膜透過活性が回復し、蛍光が観測される。

本申請課題においては、より低濃度で作用する膜透過性ペプチドあるいは水溶性高分子を開発することによって、より低濃度の分子を検出できるように改良することを目的とする。そして、新たに開発した高活性型膜透過性分子を応用して、生理的に重要な酵素であるキナーゼ類を対象とした、酵素活性ならびに酵素阻害剤活性の高感度分析を達成することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 低濃度で機能する新規膜透過性オリゴペプチドの合成と物性

これまでの研究から、カチオン性のオリゴペプチドであるオリゴアルギニン類や、ポリアリルアミンなどのカチオン性の高分子は、表面電荷が負である脂質二分子膜と相互作用しやすく、またアニオン性の両親媒性分子と静電的な相互作用により複合化させると、脂質二分子膜の疎

水的な領域を通過しながら二分子膜を透過することが確認されている。そこで本研究では、オリゴアルギニンに疎水性の置換基を共有結合により導入することで、より低い濃度で機能する膜透過性ペプチドの創製を目指した。ここでは、疎水性基として脂肪族のアルキル基、および芳香族のピレニル基を結合したオリゴアルギニンを合成した。特に、アルキル基については、その炭素数およびオリゴアルギニンのアミノ酸残基数を変えながら、その膜透過活性を系統的に調べた。

まず初めに、オリゴアルギニンに共有結合を介して疎水性の置換基を導入した膜透過性分子の合成を試みた(図2)。一般的なペプチドの固相合成法を用いてアルギニンを重合させ、そのN-末端にあるアミノ基に対して、疎水性基をもつカルボン酸を縮合させた。最後に樹脂から疎水性基を導入したオリゴアルギニンを切り出し、高速液体クロマトグラフィーによる精製、質量分析計による化合物の同定を経て、目的の膜透過性オリゴペプチドを合成した。ここでは、疎水性の置換基として芳香環であるピレニル基、および炭素数が6および12のアルキル基を採用するとともに、重合するアルギニン残基数の数も3~9の間で変化させた。

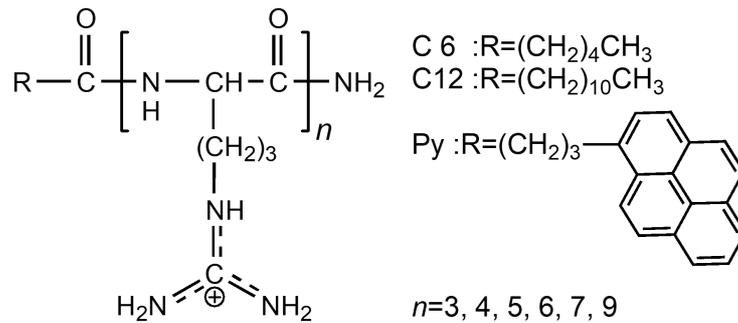


図2. 疎水性基を持つ膜透過活性オリゴアルギニン類の構造

つぎに、水溶性の蛍光色素であるカルボキシフルオレセインを内封したリポソームを調製し、そこに得られた膜透過性ペプチドを加え、その濃度を変化させながら、膜透過により外水相に放出されたカルボキシフルオレセインの蛍光強度から、膜透過活性を調べた。

(2) 低濃度で機能する新規膜透過性水溶性高分子の合成と物性

水溶性の高分子についても分子構造の改変による膜透過活性の向上を試みた。ポリアリルアミン(PAA)はカチオン性のアンモニウム基を有する水溶性高分子であり、両親媒性のアニオンであるドデシルホスフェイトと錯形成することで高い膜透過性を持つことを確認済みである。ここでは、カチオン性の置換基をアンモニウム基からグアニジウム基へと変換し、ドデシルホスフェイトとの錯形成能を向上させることで膜透過活性を上げること検討した。市販のPAA(重合度159)に、1H-ピラゾール-1-カルボキシアミジン塩酸塩を作用させ、アミノ基をグアニジノ基へと変換した誘導体GPAAを合成した。このとき、添加する1H-ピラゾール-1-カルボキシアミジン塩酸塩の量、反応時間をそれぞれ調整することで、グアニジノ基の導入量を変化させることを試みた。この合成生成物における官能基変換の割合は、NMRスペクトルより算出した。そして、得られたポリマーに対してドデシルホスフェイトを加えて錯形成させ、その膜透過活性を上記(1)と同様に蛍光性リポソームを用いて評価した。

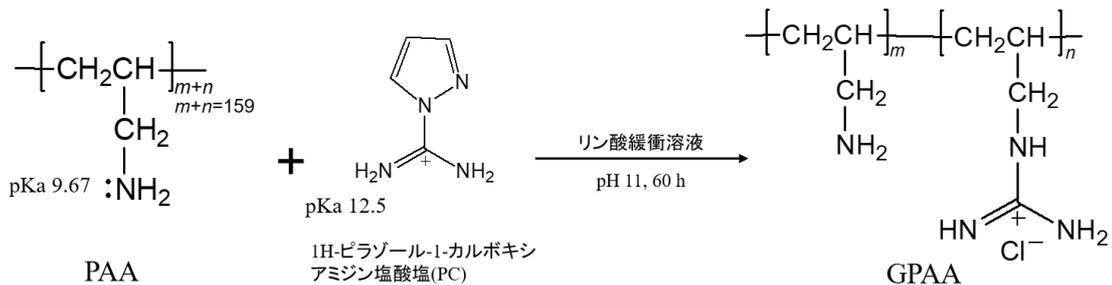


図3. ポリアリルアミン(PAA)のグアニジノ化反応によるグアニジノポリアリルアミン誘導体(GPAA)の合成

(3) 膜透過性分子を用いた酵素ならびに酵素阻害剤の高感度分析

上記のように改良した膜透過性分子を用いて、酵素および酵素阻害剤の活性評価系の構築を試みた。まず市販の酵素を使って一般的な方法で酵素反応を行い、その反応液をサンプリングした溶液に蛍光性リポソームと膜透過性分子とをそれぞれ添加した。そして、反応液中に存在する基質分子の濃度に呼応して膜透過の活性が変化し、蛍光発光の強度が変化する様子を、蛍

光光度計を使って観測することで、酵素活性の評価を行った。そして、できるだけ少ない酵素溶液のサンプリング量で、その酵素の活性が評価できる系を探索した。

4. 研究成果

(1) 低濃度で機能する新規膜透過性オリゴペプチドの合成と物性

まず、ピレニル基をN末端に導入したヘキサアルギニンについてその膜透過性を検討したところ、この新規に合成したペプチド誘導体は高い膜透過性を有することを確認した。対照となるヘキサアルギニンとピレン酪酸との1:1混合物の場合 ($EC_{50} = 78 \mu\text{M}$)と比較すると、合成したペプチドはより低い濃度で高い膜透過性を有していることを確認した ($EC_{50} = 28 \mu\text{M}$)。このことより、共有結合を介して疎水性のピレニル基を導入することによって、より高い膜透過活性を持つことが示された。また、疎水性基としてC6ならびにC12のアルキル基をもつヘキサアルギニンについても同様に検討した。すると、アルキル基の炭素数が12であるペプチド ($EC_{50} = 6.3 \mu\text{M}$)は炭素数が6であるペプチド ($EC_{50} = 85 \mu\text{M}$)に比べて、より低い濃度で膜透過活性を示すことが明らかとなった。そして、C12のドデシル基を持つヘキサアルギニンは、対応するピレニル基をもつペプチドよりもその膜透過活性が高いことが示された。また、一方ドデシル基をもつオリゴアルギニンにおいて、そのアルギニン残基数を3~9の間で変化させても、その膜透過活性に大きな変化は見られなかった。以上のことから、オリゴアルギニンの膜透過活性には、その疎水性置換基の構造が大きく影響し、よりフレキシブルかつ疎水性の強いドデシル基が有効であることが示された。

(2) 低濃度で機能する新規膜透過性水溶性高分子の合成と物性

緩衝溶液中にPAAと1H-ピラゾール-1-カルボキシアミジン塩酸塩を加え、pHを調製しながらPAAのグアニジノ化を行ったところ、pH11において反応が適切に進行することを確認した。つぎに、1H-ピラゾール-1-カルボキシアミジン塩酸塩の量と反応時間を変えながら合成を行い、そのグアニジノ化度をNMRにより解析したところ、グアニジノ化が10~85%進行したGPAAをそれぞれ合成することに成功した。つぎに、得られたGPAAとドデシルホスフェイトによる膜透過活性を調べた。GPAAはPAAと比較して、より低いドデシルホスフェイトの濃度で膜透過活性を示すことがわかった。特にグアニジノ化度が18%のGPAAでは、 $3.8 \mu\text{M}$ と非常に低いドデシルホスフェイト濃度で高い膜透過活性を有することが確認できた。これにより、酵素反応の高感度分析において重要となる低濃度のATPを検出できる糸口を得ることができた。

(3) 膜透過性分子を用いた酵素ならびに酵素阻害剤の高感度分析

上記により得られたGPAAを活用して、生理的に重要な酵素群であるキナーゼの活性評価を試みた。キナーゼは、アデノシン三リン酸(ATP)を転移する酵素群であり、反応においてATPが消費されるため、ここではATPの濃度変化から酵素活性を評価する系を考えた。ATPはリン酸エステル部を有し、アニオン性の化合物である。そこで、このATPがカチオン性のグアニジノ化ポリアリルアミンと錯形成することで、膜透過性ポリマーと活性助剤であるドデシルホスフェイトとの複合化を阻害し、膜透過を抑制する様子を観測した。その結果、18%グアニジノ化したGPAAは、ATPと効果的に錯形成してその膜透過が抑制され、その IC_{50} 値は $0.35 \mu\text{M}$ と極めて低い値となった。

こうして低濃度のATPを検出できる系を応用して、キナーゼ類の活性評価に取り組んだ。ヘキソキナーゼならびにプロテインキナーゼの両キナーゼ反応の反応液を既法により調製し、そこから $0.56 \mu\text{L}$ の試料をサンプリングした。これを蛍光性リボソームが含まれている緩衝溶液に加え、GPAAとドデシルホスフェイトをそれぞれ加えて、膜透過に伴う蛍光発光の強度を測定した。酵素反応時間に対して蛍光発光の強度をプロットしたところ、反応開始後から発光が上昇する様子が確認された(図4)。この発光量の時間変化を、酵素量を変えながら行ったところ、酵素反応の量に応じて発光曲線が変化の様子が確認できた。以上のことから、本系を用いることで僅かな量の酵素反応溶液でも酵素活性を検出することができ、改良前の方法よりも約1/10のサンプリング量で酵素活性を測定することに成功した。加えて、酵素阻害剤を共存させたヘキソキナーゼ反応溶液では、反応が遅くなる様子も確認され、本系は阻害剤活性の評価にも応用できることが示された。

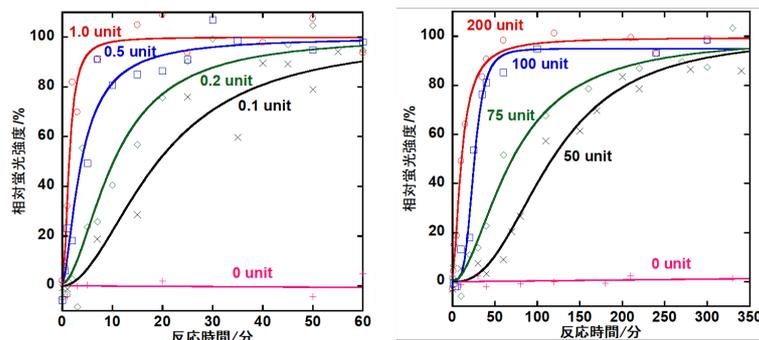


図4. GPAA、ドデシルホスフェイトならびに蛍光性リボソームを用いた酵素反応の追跡結果。
(左)ヘキソキナーゼ反応、
(右)プロテインキナーゼ反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

幡野瑞穂、宮武智弘、「アルキル鎖をもつ両親媒性ペプチドの合成と脂質二分子膜に対する透過現象」、日本化学会第 99 春季年会、2PC-007 (神戸, 2019 年 3 月).

林 友理、宮武智弘、「アンモニウム基およびグアニジウム基をもつカチオン性ポリマーと蛍光性リポソームを用いたキナーゼ類の活性評価」、日本化学会第 99 春季年会、3E1-53 (神戸, 2019 年 3 月).

林 友理、宮武智弘、「アンモニウム基およびグアニジウム基をもつカチオン性ポリマーと蛍光性リポソームを用いた 酵素活性評価」、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、1P-110 (西宮, 2018 年 9 月).

Y. Hayashi, T. Miyatake, "Cell-Penetrative Activities of Cationic Polymers Possessing Ammonium or Guanidinium Groups: Application for ATP Assays", 14th International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, P10 (草津, 2018 年 6 月).

林友理、宮武智弘、「アンモニウム基およびグアニジウム基をもつカチオン性ポリマーの膜透過活性の評価」、日本化学会第 98 春季年会、2PB-029 (船橋, 2018 年 3 月).

宮武智弘、竹村仁志、「蛍光性リポソームを用いた酵素の活性評価」、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2P-051 (金沢, 2016 年 9 月).

〔図書〕(計 0 件)

〔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.ryukoku.ac.jp/miyatake/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。