

令和元年9月3日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08952

研究課題名(和文)凝集誘起発光色素とA凝集促進ペプチドを用いたAの簡便な定量法の開発

研究課題名(英文) The development of simple Amyloid beta detection method with aggregation induced emission dye labeled peptide

研究代表者

村嶋 貴之 (Murashima, Takashi)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：20263923

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)：凝集することで分子内運動が阻害されて蛍光を発する凝集誘起発光(AIE)色素と、特定の疾患のバイオマーカーを認識して結合するアプタマーを結合させたハイブリッド分子をプローブとして用いることで、特定の疾患を診断することができる。本研究では、アルツハイマー病のマーカーと考えられているアミロイド(A β)に結合し、凝集を促進するペプチドにAIE色素を結合させたプローブを用いて、A β の定量を行った。4.2 nMの検出限界でA β の検出に成功したが、さらなる感度向上を目指して、水溶性のAIE色素の開発も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が進む社会においてアルツハイマー病(AD)は大きな社会問題となっている。現在のところ、この疾患については根本的な治療法はないが、コリンエステラーゼ阻害剤などの、進行を遅らせるのに一定の効果を発揮する薬剤が開発されている。したがって、ADに対する対策として早期発見が非常に重要である。早期発見のためには、AD発症の数年以上前から増加することがわかっているアミロイド β の高感度検出が有効であり、本研究で開発した手法はその目的に適したものであることから社会的意義は高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：A novel, facile amyloid beta (A β) peptide detection method was developed based on an aggregation-induced emission (AIE) dye using a modified amyloid fibrillization-promoting peptide (AFPP) probe. The AFPP portion of the probe plays a role in accelerating A β fibrillization, and the AIE portion of the probe plays a role in signal emission. Since the probe molecules were uniformly dispersed in buffer solution without A β , the fluorescent intensity was weak. While A β was added to the probe solution, the aggregation of A β was promoted and the fluorescence was enhanced within 3 hrs. The limit of detection with this method is 4.2 nM. The limit of detection value is insufficient for the quantification of A β found in bodily fluids; however, the present method has the advantage of a simple “add-and-measure” procedure without the need for a high level of laboratory skills and sophisticated equipment.

研究分野：有機合成化学

キーワード：凝集誘起発光色素 アルツハイマー アミロイド 水溶性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微量でも強い蛍光を発する蛍光色素は、その構造多様性と相俟って発光デバイスはもとよりセンシングの分野においても大いに期待され活用されている化合物群である。中でも、医療・診断分野においては、適切な蛍光プローブを開発できれば、非侵襲的な診断も可能であることから、蛍光色素を用いた診断法の開発は様々な疾病をターゲットとして試みられてきた。一方で、蛍光プローブは、原理的には診断の対象となるマーカーが存在しなくても蛍光を発するため、バイオマーカーの存在によって蛍光の ON-OFF がスイッチできる仕組みを組み込むことが一つのハードルとなる。これに対して、我々は凝集誘起蛍光 (AIE) 色素に着目し、ガンやアルツハイマー病の診断に応用できるプローブの開発を行ってきた。AIE 色素は分散状態では蛍光を示さず、凝集により分子運動が制限されてはじめて蛍光を発するようになるため、バイオマーカーの存在により凝集が起こるような設計を施せば、そのままプローブとして利用できることになる。

およそ 8~9 割のガン細胞ではテロメラーゼが活性化しているため、テロメラーゼにより伸長されるテロメアの鎖長はガンの汎用的で有力なマーカーである。したがって、テロメア鎖長に比例した強度の蛍光を示すプローブがあれば、ガン診断が可能になると考えられる。このような考え方に基づき、これまでにガン診断のためのプローブを開発してきた。

ガンにおけるテロメラーゼ同様、様々な疾病において特有のバイオマーカーが出現することが知られているが、それらのバイオマーカーと相互作用して共凝集する分子に AIE 色素を結合させることができれば、それらの疾病の診断が可能になると期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AIE 色素を利用した疾病の診断法を開発することである。原理的には、ある疾患において発現するバイオマーカーが特定されており、かつそのバイオマーカーに選択的に結合できるアプタマー (あるいは有機分子) が存在すれば、そのアプタマーに AIE 色素を結合させることで診断に利用可能なプローブが得られると考えられる。

本研究ではそのような疾患としてアルツハイマー病を選んだ。アルツハイマー病のバイオマーカーとして最も期待されているアミロイド (A β) をターゲットとし、A β を認識する部位として既に報告されているアミロイド凝集促進ペプチド (AFPP) を用いて、AIE 色素をシグナル部位とするプローブの開発を試みた。本研究のマイルストーンとして、次の 3 項目を設定した。

プローブとなる AIE-AFPP (AIE 色素で修飾した AFPP) の合成手法を確立し、このプローブを用いた A β の定量を試み、感度とダイナミックレンジについて検討する

極めて濃度が低い血液中の A β の定量を行うため、可能な限り高い感度の実現を図る

血中に存在する多くのタンパク質から A β を識別し、選択的に検出するため AFPP の配列検討等による偽陽性の排除を検討する

3. 研究の方法

1) AIE-AFPP (AIE 色素ラベル化 AFP プローブ) の合成

A β の凝集を促進するペプチド (AFPP) と AIE 色素のコンジュゲートを作成し、これをプローブとして A β の凝集を定量する手法を検討した。

2) AIE-AFPP による A β の定量

様々な濃度の A β の溶液を標準試料とし、AIE-AFPP を混合したのち蛍光測定を行い、このプローブにより A β の定量ができることを確認した。

3) 感度向上に向けた検討

AIE 色素の“凝集誘起蛍光”という性質は一般に分子内の芳香環を鍵とする性質であり、本質的に疎水性となる。一方で、バイオマーカーの検出は水系溶媒中で行われるのが普通であるため、AIE 色素をプローブとして用いると、バイオマーカーの有無にかかわらずプローブ自身が凝集してしまうことで蛍光が観測されてしまう。これが大きなバックグラウンド蛍光として感度を大幅に退化させるという欠点があった。そこで、水系溶媒中での事故凝集を抑制することを目的として、水溶性の AIE 色素開発を行った。

4. 研究成果

1) AIE-AFPP プローブの合成と A β の定量

Fmoc(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl) 固相合成法により、19 残基からなる AFPP (DAEFRHDKLVFFYEVHHQK) を合成した。このペプチドと各種 TPE 誘導体 (ペプチドと結合させるためのカルボン酸誘導体) を混合し、3 当量の HATU (O-(7-aza-1H-benzo-triazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetra-methyluronium hexafluorophosphate)、HOBT (1-Hydroxy-1H-benzotriazole)、6 当量の DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine) を加え NMP (1-Methyl-2-pyrrolidone) 中で反応させることでプローブを合成した。

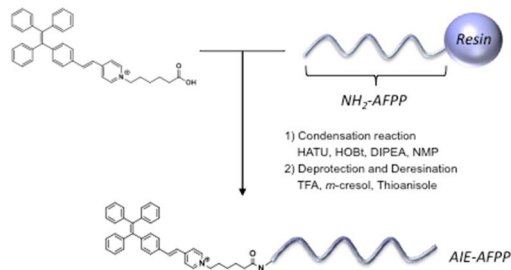


図 1 . AIE-AFPP 合成のスキーム

合成したプローブ (AIE-AFPP) は AFPP 自身と同様に A の繊維化を促進するとともに、A と共凝集することで濃度依存的に AIE の蛍光増大が観測され、短時間で容易に A の定量が可能であることが示された。

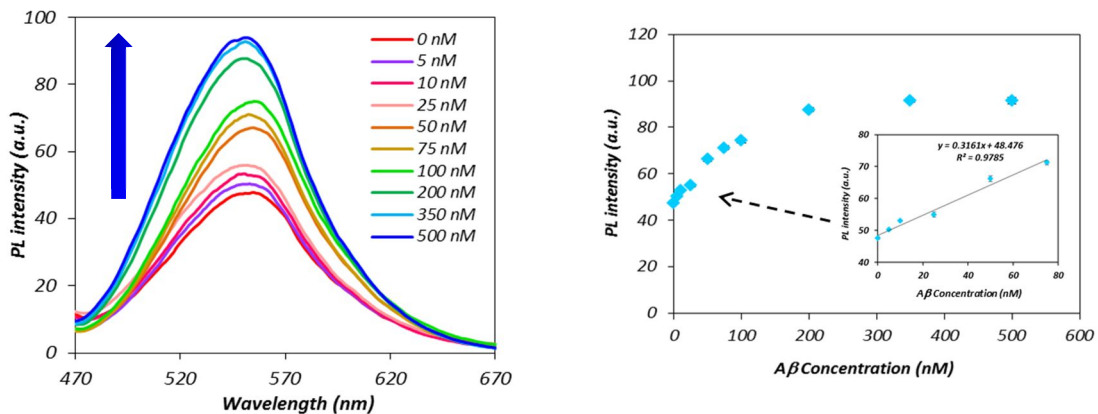


図 2 . A 濃度変化による蛍光強度変化

この手法によると検出感限界 4.2 nM で A を検出することが可能であった。この値は ELISA には及ばないが、プローブ合成および assay の簡便性や、測定者に高いスキルを要求しない点において優れた手法である。ただし、これは髄液中の A を定量することができる程度の感度ではあるが、血中の A 濃度はすい液中の 10 分の 1 程度であるため、血液を利用した診断に利用するには更なる感度の向上が望まれる。

このプローブでは A を認識する部位としてオリゴペプチドを用いているが、これはガン診断に用いたオリゴヌクレオチドとは異なり、かなり疎水的である。したがって、ここで用いたプローブのように AIE 色素も疎水性の構造の場合はプローブの疎水性が高く、水中ではそれ自身が凝集してしまう可能性が高い。すなわち、本手法ではプローブ自身の自己凝集によるバックグラウンド蛍光が感度を低下させる最大の要因であると考えられる。実際に、水中ではターゲットである A の非存在下でもバックグラウンド蛍光が観測された。このことは、原理的に A の検出を妨げるものではないが、検出感度の大幅な低下につながり、もともと存在量が極めて少ないターゲットを検出する手法として適切ではない。この欠点を克服するためには、ペプチド鎖の疎水性をカバーできるほどの水溶性をもった AIE 色素の開発が不可欠であると考え、次に水溶性 AIE 色素の合成を検討した

2) 水溶性 AIE の合成

AIE 色素の水溶性を向上させる戦略として、まず複数の水酸基の導入を検討し、テトラフェニルエチレンの 4 つのフェニル基のパラ位にそれぞれ水酸基を導入した化合物を合成した。この化合物の蛍光を水-THF 混合溶媒で測定したところ、水の割合が 90% で凝集が起こり、蛍光が観測された。

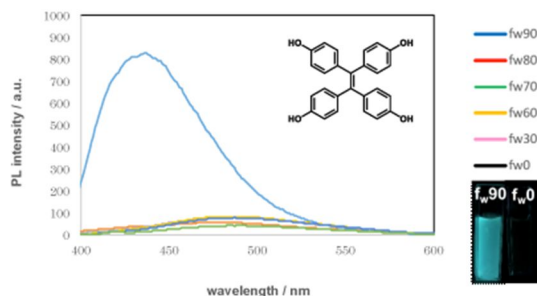


図 3 . テトラキス (p-ヒドロキシフェニル) エチレン

このことは、水中では色素自身が凝集している、すなわち水溶性が不十分であることを示しているため、その他の構造を検討した。水溶性の向上に特化して分子設計を行うならば、たとえばスルホン酸塩などの塩の導入が最もシンプルであるが、生体分子のセンシングにおいてはカウンターカチオン（もしくはカウンターアニオン）の存在が構造や相互作用に大きく影響する場合があるため、今回の目的には適さないと判断した。したがって、本研究の目的に照らして、電荷分離しているが塩の状態ではない構造が最適であると考え、N-オキsid構造に着目した。もともとの AIE 色素が TPE であることから、4つのフェニル基を順にピリジンに置き換え、この窒素原子を酸化してピリジン N-オキsidとした化合物を合成した。これらの化合物のうち、ピリジン N-オキsidを3つ、あるいは4つ導入した化合物は水の割合が90%あるいは純水中でも凝集が起こらず、十分な水溶性を有することが確認された。

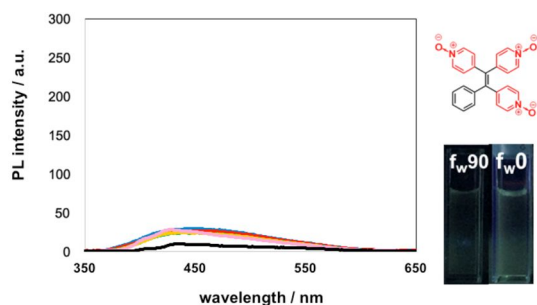


図4 . PTPyE(N-Oxide)

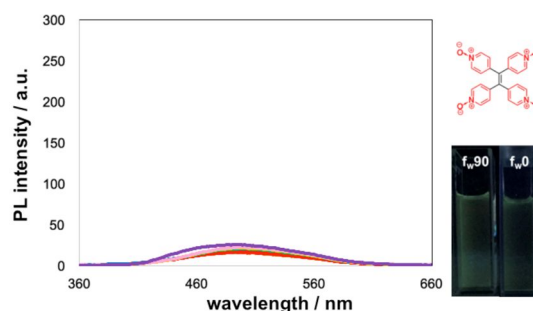


図5 . TPyE(N-Oxide)

しかしながら、この結果からだけでは、水溶性の向上とともに蛍光色素としての性質を失ってしまった可能性も否定できない。したがって、AIE 色素としての性質を保持していることを確かめるため、粘度の高い溶液中で蛍光を測定した。分子内運動の制限により発光する AIE 色素は、凝集した場合と同様に、溶媒の粘性によって運動が制限された場合にも発光することが知られている。

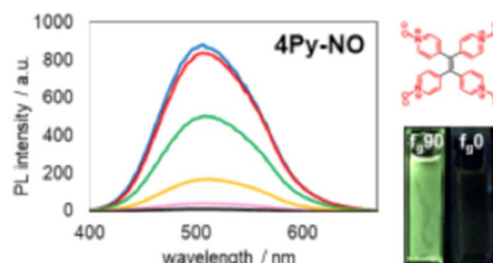


図6 . グリセロール-メタノール混合溶媒中の TPyE(N-Oxide)の蛍光

図のように、溶媒の粘性が高くなるにつれて蛍光強度が増加していることから、水溶性の AIE 色素であることが確認された。

今回合成した水溶性 AIE 色素は、A の高感度分析のための有力な候補であると期待できるが、これらの化合物と AFPP のコンジュゲート作成において、解決すべき問題がいくつか残されており、今後これらの問題を解決して水溶性の高いプローブ作成を行う必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Haruka Nogami, Yuma Nakahori, Takashi Murashima, Jun Matsui
Nicotine-Selective Polymeric Adsorbent Obtained by Molecular Imprinting with Excess Use of Itaconic Acid.
Chromatography, **38**, 15-21 (2017). (査読有)
2. Takashi Murashima, Koji Kawamura, Ai Matsumoto
Elucidation of a “Signal-ON” Mechanism of Aggregation-Induced Emission Dye-Labelled DNA/DNA Duplexes and Application of a Repeat DNA Detection Method.

Med. Chem., **6**, 704-709 (2016). (査読有)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 村嶋貴之・立岩雅大

「アゾ基を含む新規 AIE 色素の合成および物性評価」

日本化学会第 99 春季年会 (兵庫) 2019 年

2. 村嶋貴之・衣笠紫野

「AIE 色素を用いた SNPs の特定方法」

日本化学会第 99 春季年会 (兵庫) 2019 年

3. 島田直昭・村嶋貴之

「複素環式芳香族化合物の N-Oxide をもつ新規 AIE 色素の合成とその物性評価」

日本化学会第 99 春季年会 (兵庫) 2019 年

4. 村嶋貴之・谷 知輝

「Synthesis of the AIE dye-DNA conjugate and the study on application possibility for biosensing」

日本化学会第 99 春季年会 (兵庫) 2019 年

5. 島田直昭・村嶋貴之

「Pyridine N-Oxide 構造を持つ新規 AIE 色素の合成とその物性評価」

日本化学会第 98 春季年会 (千葉) 2018 年

6. 高木武宗・村嶋貴之

「親水性 AIE 色素を用いた新規シグナルオン型プローブの開発」

日本化学会第 98 春季年会 (千葉) 2018 年

7. 村嶋貴之・谷 知輝

「AIE 色素と DNA のコンジュゲート作成及びバイオプローブへの応用」

日本化学会第 98 春季年会 (千葉) 2018 年

8. 星川喬哉・村嶋貴之

「A の定量的検出を指向したバイオプローブの合成と評価」

第 37 回有機合成若手セミナー (京都) 2017 年

9. 谷知輝・村嶋貴之

AIE 色素と DNA のコンジュゲート及びバイオプローブの開発

第 37 回有機合成若手セミナー (京都) 2017 年

10. 島田直昭・村嶋貴之

「Pyridine N-Oxide を導入した新規 AIE 色素の合成及び光物性評価」

第 37 回有機合成若手セミナー (京都) 2017 年

11. 星川喬哉・村嶋貴之

「Facile Quantification of Alzheimer's Disease Amyloid- β based on Aggregation-Induced Emission.」

32nd International Conference of Alzheimer's Disease International, (京都) 2017 年

12. 星川喬哉・村嶋貴之

「凝集誘起発光色素を用いた A 簡易検出法の開発」

日本化学会第 97 春季年会 (横浜) 2017 年

13. 松本亜衣・河村浩司・村嶋貴之

「TICT 型 BODIPY を用いたナノ粒子の作製」

第 6 回 CSJ 化学フェスタ (東京) 2016 年

14. 野上晴加・中堀祐馬・村嶋貴之・松井淳

「Synthesis of Highly-affinity Nicotine-imprinted Polymer by Highly Excess Usage of Itaconic Acid as Functional Monomer.」

The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016) (スウェーデン) 2016 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pi.konan-u.ac.jp/murashima/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村嶋 貴之 (MURASHIMA Takashi)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：20263923

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。