

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22550086

研究課題名（和文） 蛍光性リポソームと膜透過性分子を用いた酵素センサーの開発

研究課題名（英文） Optical enzyme assay with a fluorogenic 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

研究成果の概要（和文）：酵素ならびにその阻害剤の活性評価、および特定成分の検出・定量に利用できる酵素センサーの開発を目指した。蛍光色素を内封したリポソームと、膜透過性の分子を用いることで、生理的に重要な酵素の活性評価を簡便に蛍光発光で検出できるシステムの開発に成功した。また、本研究で得られた酵素活性の可視化技術を応用し、食品成分の検出と定量を試みた結果、牛乳に含まれる脂肪やヨーグルトに含まれる乳酸の検出と定量を行える酵素センサーを確立することができた。

研究成果の概要（英文）：Cationic polymer – amphiphilic anion complexes can easily cross the lipid bilayer membrane, which can be detected as fluorescence emission by using a fluorogenic liposome. Presence of competitive anions that hinder the formation of polymer-counteranion complexes should reduce the translocation activity. Consumption of the competitive anions or production of activator anions during chemical reactions led into fluorogenic response. Activities of enzymes, such as protein kinase and acetylcholine esterase, and their inhibitors were readily evaluated by the “naked eye” detection system. In addition, we successfully estimated the flavor concentrations of lactate in sour milk, lipid in cow’s milk. The simple mix-and-measure method will be a cost-effective multi-component flavor sensor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生体関連化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：分子センシング、分析科学、酵素、脂質

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

特異的な分子親和性を持つ酵素を分子認識素子とする酵素センサーは、分析対象分子を高選択的に検出・定量する特長を有しており、生体分子の分析や酵素活性および酵素阻害剤活性の評価に利用でき、医療や医薬品の開発、食品成分の分析など様々な応用が期待されている。酵素センサーでは、酵素反応の前後で生成した（または消費された）物質の量を効果的に検出し、信号に変えるデバイス（トランスデューサー）の開発が鍵となる。これまでの例では、電気化学を用いたトランスデューサー等が多く報告されているが、(1)利用できる酵素が主として酸化還元酵素に限られる、(2)電極表面に酵素を効果的に修飾する必要がある、などの問題点を有する。そこで本研究では、様々な酵素反応にも利用でき、簡便かつ蛍光発光により目視でも評価可能な酵素センサーの構築を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光色素を封入したリポソーム（蛍光性リポソーム）と膜透過性のポリペプチドを用いたトランスデューサーを構築することを目指した。これまでの研究から、カチオン性のポリマー分子（ポリアルリルアミンなど）が両親媒性のアニオン分子と錯形成すると、リポソームの脂質二分子膜を容易に透過し、蛍光色素を内封したリポソームを用いると、その減少を蛍光発光により検出することができる（図1）。さらに、ポリマーの脂質二分子膜に対する透過性は、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。この現象を応用して、酵素反応に伴う、物質変換を蛍光発光の強度変化として検出することによって、酵素の活性を蛍光により評価することを試みた（図2）。本研究課題では、本蛍光評価システムを用いて、以下の①、②を確立することを目的とした。

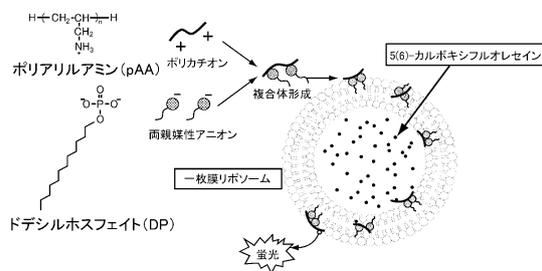


図1. カチオン性ポリマーのリポソーム二分子膜に対する透過現象

- ①癌、糖尿病やアルツハイマー病の治療に役立つプロテインキナーゼおよびコリンエステラーゼ阻害剤の活性を評価する系を構築する。
- ②様々な味覚成分および脂肪などの生体分子を検出・定量する酵素センサーを確立する。

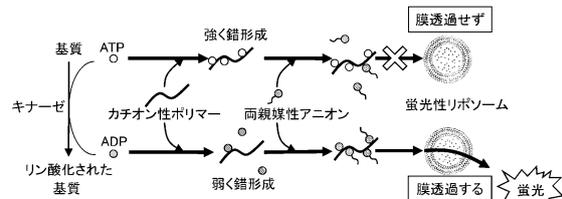


図2. 蛍光性リポソームと膜透過性ポリマーを用いた酵素キナーゼの活性評価

3. 研究の方法

まず蛍光色素を含むリポソームは、蛍光色素としてカルボキシフルオレセインを、脂質分子としてはジパルミトイルホスファチジルコリンを用い、エクストルージョン法により調製した。そして、酵素反応溶液を含む緩衝溶液中にリポソーム溶液と、膜透過性分子をそれぞれ加えることで、酵素活性の評価を行った。各酵素反応の活性評価実験の詳細は以下に示す。

(1) プロテインキナーゼの活性評価

プロテインキナーゼは細胞内における様々なシグナル伝達に係わる酵素で、ATPのリン酸をタンパク質に転移して、リン酸化タンパク質とADPに変換する酵素である。ここで、ATPはアニオン性であり、カチオン性のポリアルギニンと錯形成して、その膜透過を抑制することが考えられる。そこでプロテインキナーゼ反応の進行に伴って、ATPがADPへと変換されると、ポリアルギニンの膜透過が回復し、蛍光が観測されることが期待できる。このコンセプトに基づいて、プロテインキナーゼの活性を蛍光で評価できるシステムの構築を行った。プロテインキナーゼAと基質となるペプチド(kemptide)を加えて、文献記載の条件で酵素反応を行い、その反応液をサンプリングして緩衝溶液で希釈した。そこへ、蛍光性リポソーム、ポリアルギニン、両親媒性アニオンを順次加えて、蛍光光度計を用いて蛍光強度を測定し、その蛍光強度の増加から酵素活性の評価を行った。また、プロテインキナーゼの阻害剤活性評価を行うため、阻害剤を含む酵素反応溶液を同様の方法で分析し、プロテインキナーゼの阻害剤活

性評価を蛍光で行う試験についても実施した。

(2) コリンエステラーゼの活性評価

コリンエステラーゼはアセチルコリンをコリンと酢酸に変換する酵素で、神経組織などに含まれる。ここでは、コリンエステラーゼの反応を文献記載の方法により行った。反応液を採取し、そこへ過剰量の酢酸キナーゼを加え、エステラーゼ反応で生成した酢酸を速やかに酢酸キナーゼと作用させ、酢酸キナーゼ反応で消費される ATP の量を蛍光性リポソームで定量することで、反応を追跡した。

(3) 食品成分の検出と定量

食品成分の検出と定量を簡便に行う酵素センサーの開発をめざし、まずは脂肪の分析を行った。脂肪（トリグリセリド）は、リパーゼによりグリセリンと脂肪酸に加水分解される。ここで、生成するグリセリンを酵素グリセロキナーゼにより分解することで脂肪の検出と定量を試みた。脂肪とリパーゼを混ぜ合わせて酵素反応を行い、その反応液を採取し、過剰量のグリセロキナーゼを作用させ、そこで消費される ATP の量を蛍光性リポソームにより定量することで、脂肪の検出を行った。試料としては、脂肪分を含む牛乳を用い、脂肪の検出と定量を試みた。また、ヨーグルトに含まれる乳酸についても同様に対応する酵素を用いて、成分の検出と定量の実験を試みた。

4. 研究成果

(1) プロテインキナーゼの活性評価

Kemptide を基質として用い、プロテインキナーゼ反応溶液を適宜サンプリングし、カチオン性ポリマーの膜透過に伴う蛍光強度をプロットしたところ、酵素反応の進行に伴って、蛍光強度が増大する様子が確認できた（図3）。このことから、本システムにより、プロテインキナーゼの活性を蛍光発光の強度変化として可視化することができた。さらに、プロテインキナーゼの阻害剤として広く知られている H-89 を酵素反応溶液に加え、同様にしてプロテインキナーゼの活性を評価した。その結果、加えた H-89 の濃度が増大するにつれて、蛍光強度の上昇が抑えられていることが確認できた。このことから、本システムによりプロテインキナーゼの阻害剤 H-89 の活性を蛍光で評価できることを見出した。また、H-89 の阻害活性における IC50 値を算出することにも成功し、本システムは酵素阻害剤のスクリーニングとして用いられるだけでなく、酵素阻害剤の活性を定量的に評価する分析にも利用できることを確認した。さらに、他のプロテインキナーゼ阻害剤として、daphnetin および 6-22amide を用いて同様の試験を行ったところ、いずれの酵

素阻害剤においても、その濃度に伴う酵素反応の活性低下を確認することができた。以上のことから、本システムは様々な種類の酵素阻害剤に対して活性評価を簡便に行えるシステムであることが確認され、創薬研究などで求められている酵素阻害剤の簡便なスクリーニングシステムに利用しうる新しい分析手法を与えることが実証できた。

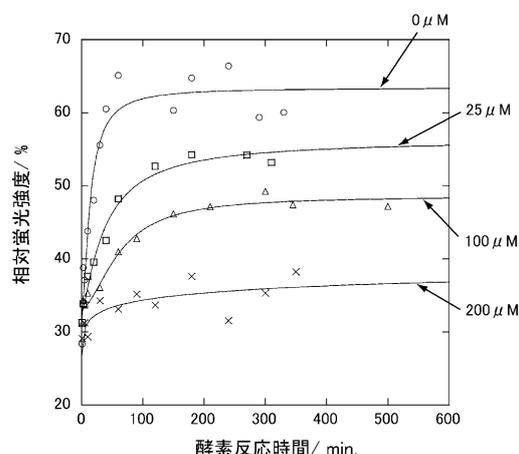


図3. プロテインキナーゼの反応曲線と阻害剤 (H-89) の各濃度における酵素活性の変化

加えて、より簡便かつ高感度な酵素活性ならびに酵素阻害活性のシステムの構築を目指し、新しい膜透過性分子の開発を行った。膜透過性を有するポリアリルアミンに、疎水性の置換基としてピレンを導入した新規膜透過性分子を合成した。この新規化合物は両親媒性アニオン分子がなくとも、膜透過活性を有することが確認できた。さらに、この新しい膜透過性分子をつかって、キナーゼの活性評価を行うことに成功した。これにより、加える試薬の種類を少なくすることができ、より簡便に検査が行える酵素活性の評価キットの構築へと応用展開できることを見出した。

(2) コリンエステラーゼの活性評価

コリンエステラーゼに基質となるアセチルコリンを加えて酵素反応させ、その反応液を逐次サンプリングし、酢酸キナーゼ反応に伴う蛍光発光をプロットした。すると、コリンエステラーゼ反応が進行するとともに蛍光強度が増大する様子が認められ、コリンエステラーゼの活性を蛍光発光で検出できることを確認した。加えて、コリンエステラーゼの阻害剤であるタクリンを加えて同様の実験を行った。その結果、タクリンの濃度が増大するにつれて蛍光の増大が抑制されている様子を確認することができた。以上のことから、生理的に重要な酵素であるコリンエステラーゼならびにその阻害剤の活性評価

を簡便に蛍光発光で検出できることを見出した。

(3) 食品成分の検出と定量

まず、脂肪（トリグリセリド）をリパーゼと作用させ、それによって得られたグリセリンを基質として、グリセロキナーゼの反応追跡を行った。すると、キナーゼ反応を本システムにより蛍光強度の増大として検出できることを確認した。

つぎに、牛乳を試料とし、そこへリパーゼを加えて十分に反応させ、その反応液にグリセロキナーゼとATPを加え、キナーゼ反応に伴う蛍光発光を調べた。すると、牛乳を試料とした際には、上記2種の酵素が適切に働き、その活性を蛍光で検出できることを見出した（図4左）。一方、脂肪分の少ない低脂肪乳を用いて同様の試験を行ったところ、ほとんど蛍光発光は検出されなかった（図4右）。以上のことから、本システムは牛乳中に含まれる脂肪の有無を的確に検出し、蛍光発光でセンシングできることを明らかにすることができた。さらに、試薬としてトリグリセリドを用いたときの蛍光強度から、トリグリセリドに対する検量線を作成し、その結果と、牛乳を用いたときの蛍光強度を比較することにより、牛乳中に含まれる脂肪分の定量を行った。すると、牛乳のラベルに記載の量と非常に良い一致を得ることができた。よって、本システムは牛乳中の脂肪の蛍光センシングのみならず、定量を行うこともできることを見出した。

さらに、別の食品成分として乳酸を対象に実験を行った。乳酸脱水素酵素を用いて、その酵素反応に伴う、蛍光発光強度の変化を利用して、ヨーグルト中に含まれる乳酸の検出と定量を行うことに成功した。

よって、本センシングシステムは食品中の目的成分を分離することなく、蛍光により目視で検出できるシステムであるとともに、様々な系にも対応できる酵素センサーであることを確認できた。

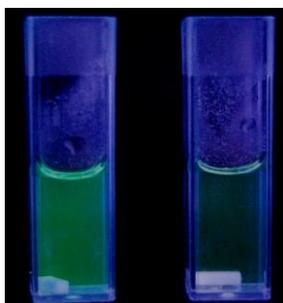


図4. 牛乳中に含まれる脂肪分の検出（左：通常の牛乳、右：低脂肪乳）

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1件）

- ① 宮武智弘、「カチオン性ポリマーの膜透過現象を利用した光による酵素活性の評価」、査読有、オレオサイエンス、11, 39-44 (2011).

〔学会発表〕（計13件）

- ① 宮武智弘、岩本弘輝、Matile Stefan 「膜透過性ポリマーの合成とキナーゼ反応追跡への応用」、第93日本化学会春季年会、4D5-36 (草津, 2013年3月).
- ② 宮武智弘、磯谷侑司、村田廣人、Matile Stefan 「蛍光性リポソームと膜透過性ポリマーを利用したプロテインキナーゼ阻害剤の活性評価」、第93日本化学会春季年会、4D5-35 (草津, 2013年3月).
- ③ 宮武智弘、磯谷侑司、村田廣人、Matile Stefan 「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阻害剤の活性評価」、第6回バイオ関連化学シンポジウム、1P-051 (札幌, 2012年9月).
- ④ T. Miyatake, Y. Isotani, H. Murata, S. Matile, “Kinase Assay with Cell-Penetrative Polymers and a Fluorogenic Liposome”, Eighth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, P9 (草津, 2012年6月).
- ⑤ 宮武智弘、磯谷侑司、村田廣人、Matile Stefan, 「蛍光性リポソームと膜透過性のポリマーを利用したプロテインキナーゼ活性の評価」、日本化学会第92春季年会、3D3-54 (横浜, 2012年3月).
- ⑥ 宮武智弘、磯谷侑司、村田廣人、Matile Stefan 「蛍光性リポソームを用いたキナーゼの活性評価」、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2P-074 (つくば, 2011年9月).
- ⑦ T. Miyatake, “Optical enzyme assay with cell-penetrative polymers,” 日本化学会第91春季年会 Asian International Symposium, 3B5-40 (横浜, 2011年, 3月) 招待講演.
- ⑧ 宮武智弘、「リポソームを用いた酵素活性のセンシング」、大学シーズ説明発表会、(京都, 2011年2月).
- ⑨ 宮武智弘、「蛍光発光で簡便に検出できる酵素センサーの開発」、第4回イノベーションフォーラム IN 福井、(福井, 2011年2月).
- ⑩ T. Miyatake, H. Murata, S. Tojo, S. Matile, “Optical detection of enzyme reactions by using a fluorogenic liposome,” 2010

International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 569, (ホノルル・アメリカ, 2010年12月).

- ⑪ 宮武智弘、村田廣人、東條咲恵、Matile Stefan、「カチオン性ポリマーと蛍光性リポソームを用いた酵素アッセイ」、第4回バイオ関連化学シンポジウム、3A12 (豊中, 2010年9月).
- ⑫ 宮武智弘、「蛍光性リポソームを用いた化学成分の光センシング」、2010年度第2回 REC BIZ-NET 大阪講演会、(大阪, 2010年7月).
- ⑬ T. Miyatake, “Optical Transduction of Chemical Reactions with a Fluorogenic Liposome,” Sixth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, O1 (草津, 2010年6月). 招待講演

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：酵素反応の阻害剤活性分析方法、および、分析キット (国内優先権主張出願)

発明者：宮武 智弘、磯谷 侑司

権利者：学校法人龍谷大学

種類：特許

番号：特願 2013-38620

出願年月日：平成 25 年 2 月 28 日

国内外の別：国内

名称：酵素反応の阻害剤活性分析方法、および、分析キット

発明者：宮武 智弘、磯谷 侑司

権利者：学校法人龍谷大学

種類：特許

番号：特願 2012-51446

出願年月日：平成 24 年 3 月 8 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 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