

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：2114501000  
 研究種目：挑戦的萌芽  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23656528  
 研究課題名（和文） 細胞内外の微小な温度差に応答する磁性ナノ粒子を用いた早期がん診断・治療法の開発  
 研究課題名（英文） Development of temperature responsible magnetic nanoparticles for targeting cancer cells  
 研究代表者  
 近藤 昭彦 (KONDO AKIHIKO)  
 神戸大学・大学院工学研究科・教授  
 研究者番号：40205547

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞内外の微小な温度差に応答する磁性ナノ粒子を創製し、その粒子を用いて早期がん診断・治療法の開発を目指した。がん治療の早期診断・治療には、ナノ粒子表面に対してがんを特異的に認識可能な分子を、その機能を保った状態で固定化する要素技術が非常に重要である。本研究では、粒子表面へのタンパク質固定化技術について検討を行ない、目的分子を機能を保った状態で複数種類固定化する技術を開発した。

## 研究成果の概要（英文）：

A microparticle surface was designed by the unique method incorporating streptavidin-biotin affinity and sortase A (SrtA)-catalyzed transpeptidation. Leucine-proline-glutamate-threonine-glycine-tagged streptavidin (Stav-LPETG) was immobilized on the surface using streptavidin-biotin affinity, and GGGGG-tagged red fluorescent protein (Gly5-RFP) was conjugated with SrtA. Biotinylated fluorescein isothiocyanate (biotin-FITC) was then bound to residual biotin-binding sites in Stav-LPETG. The resulting particles had RFP and FITC immobilized on the surface via Stav-LPETG, and RFP- and FITC-associated fluorescence was observed using fluorescence microscopy. Finally, GGG-tagged glucose oxidase and biotinylated horseradish peroxidase were immobilized on the microparticle surface, resulting in a functional particle capable of detecting glucose. This particle can be repeatedly used and is more sensitive in detecting glucose than particles prepared using chemical modification. Our method provides a simple strategy for site-specific coimmobilization on molecular surfaces and expands the use of protein hybrid devices.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

## 研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナノ粒子、固定化、タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

ガン細胞のみを選択的に障害できる技術、の確立が急務である。免疫系の活性化などに加

えて外科的治療や放射線治療など、物理的に腫瘍細胞を障害する技術はがん治療の有力なアプローチの一つであるが、正常細胞にも

ダメージを与えるという問題点がある。

温度感受性磁性ナノ粒子は、温度感受性ポリマーを磁性ナノ粒子の表面に修飾することで、わずかな温度変化を用いて磁性ナノ粒子の粒子径（凝集状態）を制御できる。一方で、ガン細胞はその活発な増殖活性のため、正常細胞に比べてわずかに細胞内の温度が高いことが近年報告された。そこで本研究では、このガン細胞内のわずかな温度変化にตอบสนองする温度感受性磁性ナノ粒子を開発し、「ガン細胞内温度にตอบสนองするナノ粒子を用いたガンの早期発見技術の開発及びガン細胞特異的殺傷技術」を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、温度感受性磁性ナノ粒子を用いたガンの早期発見技術、ガン細胞特異的殺傷による新規治療技術の確立に向け、温度感受性磁性ナノ粒子を用いたガン細胞の増殖イメージングと早期発見技術の開発を行なった。

## 3. 研究の方法

温度感受性磁性ナノ粒子に、ガン細胞特異的ターゲット分子を修飾し、ガン細胞のみ磁性ナノ粒子がデリバリーされる技術の開発を行なった。初めに、固定化条件を検討するために、評価の容易なマイクロ粒子を用い、化学修飾法、物理吸着法、酵素法のそれぞれについて検討した。修飾するモデルタンパク質として緑色蛍光蛋白質 GFP を用いた。また、ガン細胞を特異的に認識する場合、ターゲット分子を複数修飾することは、その認識能を向上させる上で有用である。本研究では、ストレプトアビジンを用いて粒子表面上に複数種類のタンパク質を固定化する技術の開発も並行して行なった。タンパク質連結酵素を用い、ストレプトアビジン及び目的タ

ンパク質を粒子表面に固定化し、その固定化条件についてタンパク質の量、機能をそれぞれ評価した。

## 4. 研究成果

酵素や抗体などのタンパク質はそれ単体で優れた触媒機能や分子認識能を保持しているが、機能性分子を修飾したり、微粒子上へ固定化したりすることによって、タンパク質複合体（バイオコンジュゲート）として様々な局面で応用されている。タンパク質は熱や有機溶媒などに弱く、修飾を行うための反応条件が非常に制限されてしまう。そのため、最もよく用いられている化学修飾法においても、常温下で特定の官能基と反応する架橋剤を用いる手法がほとんどである。架橋反応を用いる手法では、架橋を行うターゲット部位がタンパク質 1 分子内に多数存在することから、目的以外の副反応が生じる可能性があり、バイオコンジュゲートの性能に悪影響を与えてしまう恐れがある。物理吸着法では、基盤にアミノ基などを導入し、静電的相互作用によりタンパク質を吸着させる方法のほかに、タグとよばれる特殊なペプチドモチーフを利用した方法が知られている。本研究においては、酵素の基質特異性を利用した修飾法である酵素修飾法に着目した。

一般的に、酵素は「基質特異性が非常に高く、副反応が起きにくい」、「常温常圧下で反応を触媒する」という二つの優れた特性を有している。酵素修飾法では、アシル転移酵素などの酵素の基質特異性を利用することで、タンパク質と修飾ターゲットを部位特異的に連結することが可能になる。本研究では特に、Sortase A (SrtA) と呼ばれるペプチド転移酵素に着目した。SrtA はグラム陽性細菌に存在する酵素であり、C 末端に SrtA の認識モチーフ (LPXTG; LP tag) をもつ分泌タンパク

質をペプチドグリカン上に並べる役割をもつ。SrtAsa はカルシウムイオン存在下で、目的タンパク質 A の C 末端に存在する LP tag を認識し、T と G の間を切断する。その一方で、切断部を目的タンパク質 B の N 末端（オリゴグリシン配列から成る；G tag）に転移させる反応を触媒する。よって、C 末端側に LP tag を付与したタンパク質（あるいはペプチド）に対して、N 末端側に G tag を付与したタンパク質（あるいはペプチド）を SrtA 存在下で混合することにより、2 分子の部位特異的な連結が可能になる。

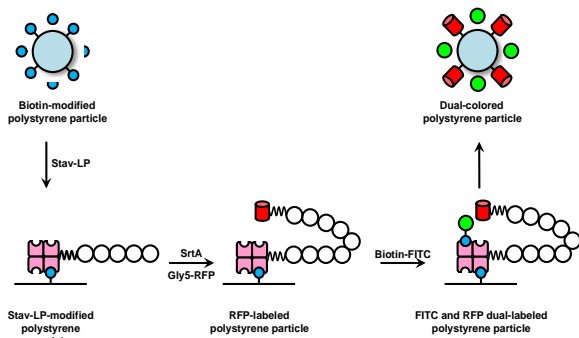


図1 酵素を用いたタンパク質修飾法

ビオチンと非常に強固な結合能をもつ Streptavidin とタンパク質との複合体を調製することで、Streptavidin-ビオチン結合を介して、タンパク質を部位特異的に配向固定化する手法の開発を行った（図1）。

GFP 及び RFP を固定化した粒子の蛍光画像を図2に示す。何も固定化していない粒子では、どちらの蛍光も見られなかったが、GFP を固定化した粒子では緑色蛍光がみられ、また RFP も固定化した粒子は緑色、赤色のどちらの蛍光も観察された。これより、粒子表面へ複数種類のタンパク質を固定化する技術の開発に成功した。

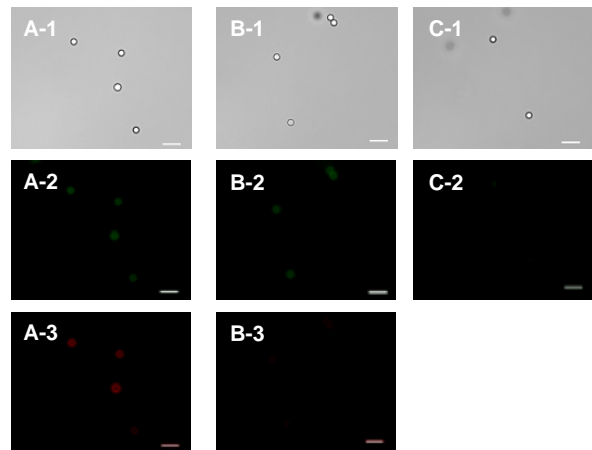


図2 固定化粒子の蛍光画像

続いて、Streptavidin をタンパク質固定化の足場として捉えることで、ビオチン結合能、SrtA 修飾を組み合わせたタンパク質の同時固定化技術の開発を行った。モデルとして固定化した酵素（グルコースオキシダーゼおよび西洋わさびペルオキシダーゼ）を選択し、固定化条件及びその機能を評価した。

その結果を図3、4に示す。左より、粒子、化学修飾法で固定化した粒子、酵素法で固定化した粒子、の酵素活性を示す。グルコースオキシダーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼのどちらについても、機能を維持した状態で酵素を固定化することに成功した。また、その活性は酵素法の方が優れていた。続いて、これら2つの粒子を同一粒子上に固定化した。その粒子の活性の結果を図5に示す。レーン6において、2つの酵素の両方の機能が維持された状態で固定化されていることが示されたことより、タンパク質を複数種類固定化する技術の開発に成功した。本手法は、ガン細胞を特異的に認識する分子を複数固定化し、そのターゲット能を向上させる点において重要な技術として期待される。また、これらの固定化法を磁性粒子において検討したところ、同様に固定化可能であることが示された。今後、ナノ粒子との機能を複合化

させることで、より実用化に適した技術となると期待される。

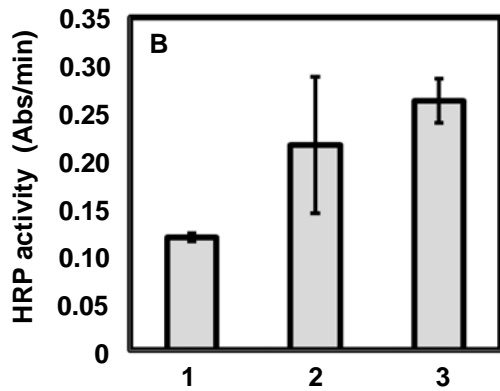


図3 グルコースオキシダーゼ活性

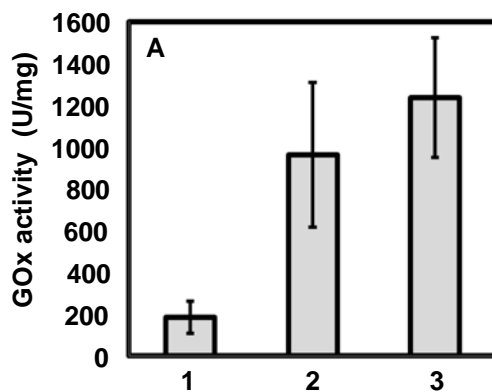


図4 西洋わさびペルオキシダーゼ活性

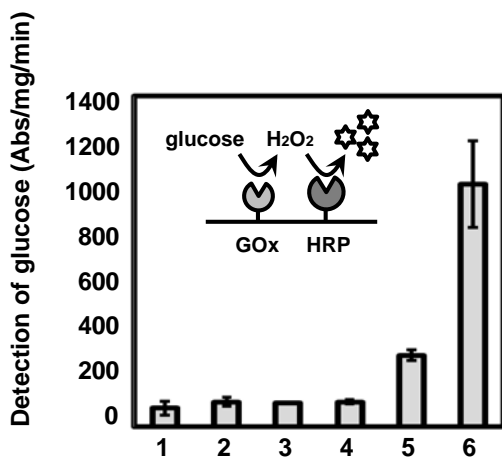


図5 複数種類の粒子を固定化した酵素活

性

## 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)

Matsumoto T., Tanaka T., Kondo, A. (2012) Sortase A-catalyzed site-specific co-immobilization on microparticles via streptavidin., Langmuir, 28(7), 3553-3557

[学会発表] (計2件)

秦 悠斗・松本 拓也・田中 勉・近藤 昭彦 「Sortase A を用いた酵素配向固定化微粒子の作製」化学工学会第78年会 2013.3.17-19 大阪大学

松本 拓也・秦 悠斗・田中 勉・近藤 昭彦 「ストレプトアビジンを介したタンパク質の高配向同時固定化技術の開発」化学工学会第78年会第64回日本生物工学会大会 2012.10.23-26 神戸国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 昭彦 (Kondo Akihiko)

神戸大学大学院工学研究科 教授

研究者番号：40205547

### (2) 研究分担者

荻野 千秋 (Ogino Chiaki)

神戸大学大学院工学研究科 准教授

研究者番号：00313693

田中 勉 (Tanaka Tsutomu)

神戸大学大学院工学研究科 准教授

研究者番号：90436551