

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651259

研究課題名(和文)機能性抗菌ペプチドに基づく多様な酵素活性の検出とセラノスティクスへの応用

研究課題名(英文)Detection of antimicrobial peptide-based universal detection system of enzyme activities and its application to theranostics

研究代表者

水上 進(Mizukami, Shin)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30420433

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):申請者らはこれまでに、13アミノ酸と非常に短い抗菌ペプチドtemporin L(TL)を光刺激応答性保護基で修飾したTL誘導体を開発し、この機能性ペプチドを細菌膜組成リポソームと組み合わせた「光刺激応答性薬物放出システム」を開発してきた。本課題では、TLに酵素基質部位を修飾した機能性ペプチドを新たに開発し、酵素活性に応答して蛍光色素をリポソームから放出するシステムを開発した。標的酵素としてcaspase-3およびphosphataseを選択し、それぞれの基質をTL構造に融合させることで、酵素活性に応答して内包物を放出するシステムを開発し、酵素活性の蛍光検出システムへと応用した。

研究成果の概要(英文):So far, we had developed a light-responsive compound release system by designing a functional antimicrobial peptide, temporin L (TL), modified with a photo-responsive protective group and combining liposomes including fluorophores. In this study, we newly developed an enzyme-responsive compound release system by making fusion peptides of TL and enzyme substrates. We chose caspase-3 and phosphatases as the target enzymes. For caspase-3, the enzyme substrate peptide was modified to the -amino group to yield a branched peptide. For phosphatases, a phosphorylated amino acid was substituted with one of the amino acids in TL. In both cases, the target enzyme activity activated the membrane-damaging activity of the fusion peptides. By using liposome including fluorophores, the system was applied to fluorescence detection of the target enzymes.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：抗菌ペプチド 蛍光 酵素活性

1. 研究開始当初の背景

近年、化学プローブを用いた酵素活性の蛍光検出法は、その簡便性から医学・生化学において極めて重要な技術となっている。それらの蛍光プローブは通常、酵素基質分子に蛍光色素を修飾し、酵素反応によって生成物の蛍光特性が変化するように設計されている。一方、これらの設計手法は、一部の加水分解酵素活性の蛍光検出においては極めて有効だが、同様の原理で様々な酵素の活性を検出できるわけではない。また、*in vivo*における酵素活性検出に適用可能な近赤外蛍光プローブも僅かに報告されてはいるが、高い脂溶性による非特異吸着の問題や合成の難易度などの解決すべき問題が多く、その開発は容易ではない。そこで、既存の酵素活性蛍光検出法とは異なるアプローチによる酵素活性検出法の開発は極めて重要と言える。

申請者はこれまで、生体イオンの挙動や酵素活性等を可視化する分子プローブの開発に携わってきた(*FEBS Lett.* **1999**, 453, 356; *JACS* **2002**, 124, 3920; *JACS* **2008**, 130, 794; *JACS* **2009**, 131, 5016; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3641; *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1151, etc.)。さらに、機能性の薬物放出システムの開発研究を行っており、光感受性基で保護した抗菌ペプチドを用いた紫外光応答性リポソームの開発を報告している(*JACS* **2010**, 132, 9524)。本研究は、上記の二種類の研究 (diagnostics と therapeutics) に基づいている。

2. 研究の目的

本研究では、抗菌ペプチドを酵素基質と融合させることで、酵素活性に応答して膜傷害能を回復する機能性抗菌ペプチドを開発する。さらに、この機能性ペプチドを基にした多様な酵素活性検出システムを開発する。近赤外蛍光色素と阻害剤を同時にリポソームに内包させることで、疾患患部の酵素活性に応答して蛍光シグナルを与え、かつ薬物放出も同時に行う新規セラノスティックシステムを確立する。

3. 研究の方法

(1) 細菌の細胞膜を破壊する抗菌ペプチドのうち、13 アミノ酸と非常に短いアミノ酸配列を持つ temporin L (TL) に着目した。これまでに、TL の Lys の ϵ -アミノ基および N 末端の α -アミノ基を光感受性保護基で修飾した誘導体において細菌膜傷害活性が大きく抑制されることを見出している。そこで、標的酵素として caspase-3 を選択し、TL に caspase-3 の基質ペプチドを連結した「酵素基質部位-膜傷害性部位融合ペプチド」を設計し、合成を行った。このペプチドを、蛍光色素を内包させたアニオン性表面を持つリポソームと組み合わせることで、標的プロテアーゼ活性を蛍光上昇で検出するシステムの開発に取り組んだ。

(2) アミノ基以外の他のアミノ酸残基を修飾することによっても、TL の膜傷害活性を制御できると考えた。そこで、脱リン酸化酵素の基質となるようにリン酸化アミノ酸で置換した機能性ペプチドを複数合成し、リン酸基の修飾による膜傷害能変化を検討した。続いて 3 種類の phosphatase に対して、リポソーム内包蛍光色素の放出アッセイを行った。

(3) リポソームの表面への TL 誘導体の修飾を検討した。これまでに、TL の N 末端アミノ基を保護すると著しく膜傷害活性が低下することが分かっている。そこで、C 末端側から、リポソームに連結させる取り組みを行った。

4. 研究成果

(1) TL の Lys の ϵ -アミノ基に Caspase-3 の基質である Ac-DEVD の配列を導入した分岐型ペプチドを合成した。このペプチドは、TL と比較して膜傷害活性が大きく抑制されていた。ここに caspase-3 を添加したところ、酵素反応の進行に伴って膜傷害活性が回復することが確認された。これをリポソームと組み合わせることで、caspase-3 活性検出に応用できることが示された。

(2) リン酸基の導入位置が膜傷害性に与える影響を考察するために、リン酸基の導入位置の異なった 7 種の TL 誘導体およびその脱リン酸化体を合成し、リン酸基の修飾による膜傷害能変化を調べた。その結果、TL の複数のアミノ酸残基をリン酸化アミノ酸へと置換が TL の膜傷害能を著しく低下させることを見出した。続いて、alkaline phosphatase (ALP)、serine/threonine phosphatase (PP1)、tyrosine phosphatase (PTP1B) の 3 種の脱リン酸化酵素を用いたアッセイを行ったところ、幾つかのリン酸化ペプチドが各 phosphatase 活性によってリポソーム内包色素を放出させることが分かった。すなわち、本システムが phosphatase 活性検出にも適用できることが示された。

(3) TL の C 末端側に数残基ペプチドを伸長させた TL 誘導体を作成したところ、それらの膜傷害活性は保持されていた。この結果から、刺激応答性 TL 誘導体においても C 末端側のペプチド鎖の伸長が膜傷害活性に影響を与えないことが期待される。今後、C 末端側にリン脂質あるいはコレステロールなどを修飾することにより、酵素活性応答性膜傷害ペプチドとリポソームを一体化させることが可能になると期待される。

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 10 件)

Zhanghua Zeng, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Simple and Real-time Colorimetric Assay for Glycosidases Activity Using Functionalized Gold Nanoparticles and its Application for Inhibitor Screening” *Anal. Chem.* **2012**, *134*, 9089-9095. (査読有り)

Satoshi Okada, Shin Mizukami, Yutaka Matsumura, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi “Nanospherical Polymer as an MRI Sensor without Paramagnetic or Superparamagnetic Species” *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 15864–15867. (査読有り)

Tatsuya Nakamura, Shin Mizukami, Miho Tanaka, Kazuya Kikuchi “Efficient Development of Luminescent Lanthanide(III) Complexes by Solid-Phase Synthesis and On-Resin Screening” *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 2685–2690. (査読有り)

Eric Lindberg, Shin Mizukami, Keiji Ibata, Atsushi Miyawaki, Kazuya Kikuchi “Development of Luminescent Coelenterazine Derivatives Activatable by β -Galactosidase for Monitoring Dual Gene Expression” *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14970–14976. (査読有り)

Akimasa Yoshimura, Shin Mizukami, Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi “ ^1H MRI Detection of Gene Expression in Living Cells by Using Protein Tag and Biotinylation Probe” *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 219–221. (査読有り)

Hisashi Matsushita, Shin Mizukami, Fuminori Sugihara, Yosuke Nakanishi, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi “Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ^{19}F Magnetic Resonance Imaging” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1008–1011. (査読有り)

Shin Mizukami, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi “Small-Molecule Based Protein-Labeling Technology in Live Cell Studies: Probe-Design Concepts and Applications” *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 247–256. (査読有り)

Satoshi Okada, Shin Mizukami, Takao Sakata, Yutaka Matsumura, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi “Ratiometric MRI Sensors Based on Core-Shell Nanoparticles for Quantitative pH Imaging” *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 2989–2992.

(査読有り)

Tatsuya Nakamura, Hisashi Matsushita, Fuminori Sugihara, Yoshichika Yoshioka, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Activatable ^{19}F MRI Nanoparticle Probes for the Detection of Reducing Environments” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1007–1010. (査読有り)

Tatsuya Nakamura, Fuminori Sugihara, Hisashi Matsushita, Yoshichika Yoshioka, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Mesoporous Silica Nanoparticles for ^{19}F Magnetic Resonance Imaging, Fluorescence Imaging, and Drug Delivery” *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1986–1990. (査読有り)

〔学会発表〕(計 8 件)

水上進, ナノバイオプローブ設計を基盤とする分子イメージング技術開発, 日本化学会 生体機能関連化学部会 若手の会 サマースクール, 2012年7月27日, 福岡

榎部 順美、水上進、菊地和也, 酵素活性をトリガーとする薬物放出システムの開発, 第28回日本DDS学会, 2012年7月4日, 札幌

榎部 順美、水上進、菊地和也, リポソームと機能性ペプチドを用いた酵素活性検出法の開発, 50回日本生物物理学会年会, 2012年9月22日, 名古屋

水上進, 蛋白質機能を可視化する分子の設計と開発, 新学術領域研究 若手合同シンポジウム「配位プログラム」×「融合マテリアル」, 2012年12月21日, 東京

榎部 順美、水上進、菊地和也, 機能性抗菌ペプチドとリポソームによる酵素活性検出法, 日本化学会第93春季年会, 2013年3月22日, 草津

榎部 順美、水上進、菊地和也, 抗菌ペプチドの機能化による酵素活性応答薬物放出法の開発, 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 2013年9月26日, 名古屋

榎部 順美、水上進、菊地和也, 機能化抗菌ペプチドを利用した刺激応答性化合物放出システムの開発, 日本化学会第94春季年会, 2014年3月28日, 名古屋

Shin Mizukami, Development of smart ^{19}F MRI probes for in vivo imaging, China/Japan Young Chemist Forum, 2014年8月5日, 北京(中国)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水上 進 (MIZUKAMI SHIN)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30420433