

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410154

研究課題名(和文) 蛍光性リポソームを用いた酵素阻害剤スクリーニングシステムの開発

研究課題名(英文) Enzyme assay system by using 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光色素を内封したリポソームと膜透過性のポリマーを用いて、蛍光で検出可能かつ、ラベルフリーな酵素活性評価システムの開発を目指した。酵素反応液中に蛍光性リポソーム、膜透過性ペプチドをそれぞれ加えて、膜透過に伴う蛍光発光を観測することで、酵素活性の評価を行った。その結果、リン酸転移酵素の活性を少量のサンプルで定量することに成功した。また、硫酸転移酵素についてもその活性評価に成功し、酵素活性評価キットとして実用化する汎用性の高い酵素評価法を提案できた。また、低濃度で膜透過する新規オリゴペプチドの設計と合成に成功し、酵素の高感度分析の可能性を見出すことができた。

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 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 enzyme reactions led into fluorogenic response. Activities of enzymes, such as kinases and sulfotransferases, were readily evaluated by the "naked eye" detection system. The simple mix-and-measure sensing method will provide a cost-effective enzyme assay kit.

研究分野：生物有機化学

キーワード：膜透過性ペプチド 酵素活性評価技術 リポソーム 蛍光センシング

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、酵素活性の評価においては、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。

2. 研究の目的

医薬品の開発に不可欠な酵素阻害剤のスクリーニングを、従来法よりも簡便かつ迅速に行うことができる全く新しい蛍光検出型の分析システムの開発を目指す。ここでは、カチオン性のポリマーがリポソームの脂質二分子膜を透過する現象(図1)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、酵素阻害剤の活性評価を容易にするラベルフリーなスクリーニングシステムを構築する。本研究期間内に、癌治療に役立つキナーゼ阻害剤など薬理的に重要な酵素群の阻害剤活性の評価系を確立することを目標とする。

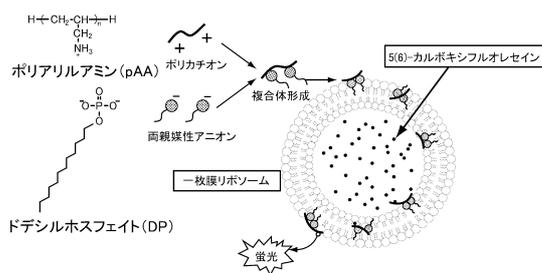


図1. カチオン性ポリマーのリポソーム二分子膜に対する透過現象

本技術は、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ものであり、膜透過活性を有するカチオン性ポリマー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)を用いる。これまでの研究から、カチオン性のポリマー(ポリアルギニンやポリアリルアミン)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(F. Perret, et al., JACS,

127, 1114 (2005))。さらに申請者らは、これらの膜透過性ポリマー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。本研究では、上記 ~ の研究成果を基にして、図2に示すスキームにより、キナーゼ類の活性評価系を行う。キナーゼ類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のリン酸を基質に転移して、リン酸化された基質とADPを生じる反応を触媒する酵素である。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う。本研究期間内では、次の(1)(2)をテーマに研究を進めた。

(1) 酵素センシングの感度向上

分析に用いる成分の濃度など、条件を見直すことにより、より少ない試料で分析できる系の開発を目指す。また、より低濃度で機能する新しい膜透過性分子の開発を行う。

(2) 酵素センシングの汎用性の向上

これまで、分析が容易でなかった酵素として硫酸転移酵素を対象とした分析系の開発を目指す。

以上により、酵素活性評価のコストダウン、ならびに、これまで分析が困難であった酵素の分析など、酵素センシングの汎用性が高まることが期待でき、実用化を見据えた本酵素活性評価の基盤技術を確立することを目的とする。

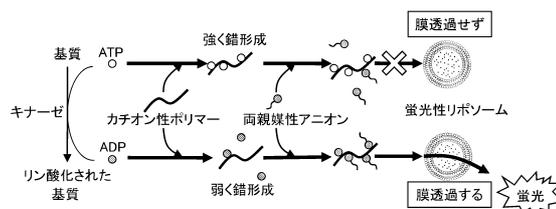


図2. 蛍光性リポソームと膜透過性ポリマーを用いた酵素キナーゼの活性評価

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、酵素反応に伴って発生する蛍光発光の強度を、蛍光光度計により定量的に検出することで、酵素活性の評価を行った。一方、より感度の高い酵素分析系の確立を見据え、より低濃度で機能する膜透過性ペ

チドの合成を行った。膜透過活性が認められているオリゴアルギニンに、疎水性のピレニル基を共有結合で導入したペプチドを設計し、固相合成法を用いて新規合成した。そして、蛍光色素を内封したリポソームに添加し、膜透過に伴う蛍光発光の強度から、新規オリゴペプチドの膜透過活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 酵素センシングの感度向上

図2に示す通り、本酵素センシングシステムにおいては、膜透過性を有するポリアルギニンと、ATPとの相互作用が鍵を握っている。酵素分析の際に、このポリアルギニンの濃度を低くできれば、それと相互作用して膜透過活性を抑制するATPの濃度を下げることができ、試料を少量にすることが可能となる。そこで、ポリアルギニンの濃度を可能な限り低くし、膜透過活性を調べた。すると、従来法で用いていた128 nMのポリアルギニンに比べ、1/10の濃度である、12.8 nMにおいても膜透過に伴う蛍光発光が観測された。つぎに、12.8 nMのポリアルギニンを用いて、ATP共存下での膜透過活性の低下を調べると、そのIC₅₀値が0.4 μMとなり、従来の128 nMのポリアルギニンを用いた場合のIC₅₀値3.2 μMよりも1/8に低下することを確認した。続いて、この新たに設定した分析条件でヘキサキナーゼの活性評価を行ったところ、酵素反応溶液の試料の量を1/9にしても、従来法と同様の酵素反応曲線を得ることに成功した。これにより、高価である酵素の量が少なくても有効な分析結果を得ることができた。

つぎに、さらなる酵素の高感度分析につながる技術の開発を目指し、新しい膜透過性ペプチドの開発を行った。これまでの研究から、オリゴペプチドの膜透過には、脂質二分子膜表面との相互作用部位となるグアニジウム基、および、脂質二分子膜の疎水領域を透過できるよう、疎水性の置換基の付与が、重要であることが明らかとなっている。そこで、グアニジウム基を持つアミノ酸であるヘキサアルギニンをベースとし、疎水性基としてピレニル基を導入した、新しいオリゴペプチドを設計した(図3)。まず、ピレニル基をもつアミノ酸を合成した。リシンの側鎖のアミノ基に対してピレン酢酸を作用させ、アミド結合を介してピレニル基を導入した。このアミノ酸とアルギニンを使って、ピレニル基を1~4個有するヘキサペプチド、6-Py(1)、6-Py(2)、6-Py(3)および6-Py(4)をそれぞれ固相合成法により合成した。高速液体クロマトグラフによる精製の後、質量スペクトルにより、構造の同定を行った。つぎに、これらのペプチドをジメチルスルホキシドに溶解し、それを蛍光性リポソームに添加し、蛍光強度を測定することによって、各ペプチドの膜透過活性を評価した。すると、いずれのペプチドにおいても膜透過に伴う蛍光発光が観測され、これらの新規ペプチドは、ドデシ

ルホスフェイトなどの両親媒性アニオン分子の助剤なしに、膜透過活性を有することが確認できた。また、各ペプチドの活性をそのEC₅₀値によって評価したところ、分子内に存在するピレニル基の数が1個から3個に増えるにつれ、そのEC₅₀値は、50.1 μM, 6.9 μM, 0.4 μMと大幅に減少することを見出した。これは、ピレニル基が脂質二分子膜の疎水性部への親和性を高めるため、ペプチドの膜透過性を著しく向上させていると考えられる。一方、4個ピレニル基をもつペプチドでは、そのEC₅₀値が1.7 μMとなり、活性の低下が見られた。これは、ピレニル基の増加に伴い、膜表面との相互作用する部位であるグアニジウム基の数が減少したことが原因であると考えられる。よって、3個のピレニル基を持つオリゴペプチドが最も高い膜透過活性を有することを見出し、これは、従来からあるポリアルギニンと比較して、約1/300のアミノ酸残基で作用できる膜透過性ペプチドであることがわかった。このことから、この新規膜透過性ペプチドを用いることによって、酵素活性評価におけるサンプル量をさらに低減できる可能性を見出すことができた。

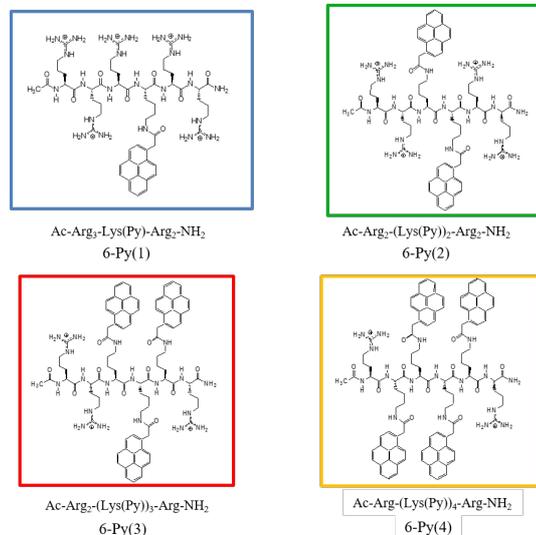


図3. ピレニル基を有する新規膜透過性ヘキサペプチドの構造

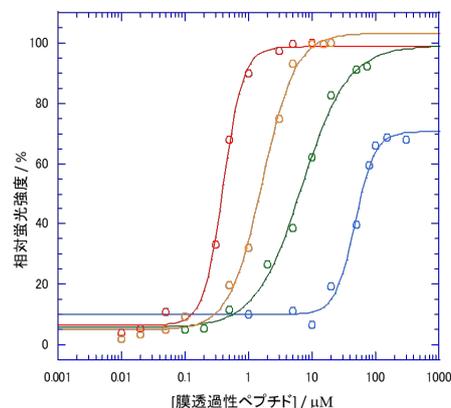


図4. 各ペプチドの膜透過に伴う蛍光強度と

ペプチドの濃度との関係(青線:6-Py(1), 緑線:6-Py(2), 赤線:6-Py(3),黄線:6-Py(4))

(2) 酵素センシングの汎用性の向上

本酵素評価システムはATPの転移酵素であるキナーゼ類に対して有効であることを確認してきた。ここでは、他の異なる酵素として硫酸転移酵素を対象とし、その酵素活性評価を試みた。硫酸転移酵素は、コンドロイチンなどの基質が持つ硫酸基に対し、硫酸基を転移する酵素であり、Adenosine 3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS)を利用する酵素である。そこで、図2に示したキナーゼ類の反応系においてATPの増減を元に分析を行ったのと同様に、ここでもPAPSの濃度変化を酵素反応の追跡に利用することを試みた。PAPSを含む緩衝溶液中で、ポリアルギニンの膜透過活性を評価したところ、PAPSはポリアルギニンの膜透過活性を下げる働きを持つことを確認でき、その IC_{50} 値は $1.1\mu\text{M}$ と求められた。一方、反応後に生成するAdenosine 3',5'-diphosphate(PAP)は、膜透過阻害に対する IC_{50} 値が $37\mu\text{M}$ と大きいことが明らかとなり、図2のコンセプトに基づく酵素活性評価が行えることが確認できた。そして、緩衝溶液中、37で硫酸転移酵素の反応を行い、その溶液を逐次サンプリングし、蛍光性リポソーム、ポリアルギニン、ならびに両親媒性アニオンであるドデシルホスフェイトを加えたところ、酵素反応時間の経過に伴って、蛍光強度が増大することが確認できた(図5)。以上の結果から、本酵素活性評価システムは、リン酸を転移するキナーゼのみならず、硫酸を転移する酵素にも適用できることを実証することができた。

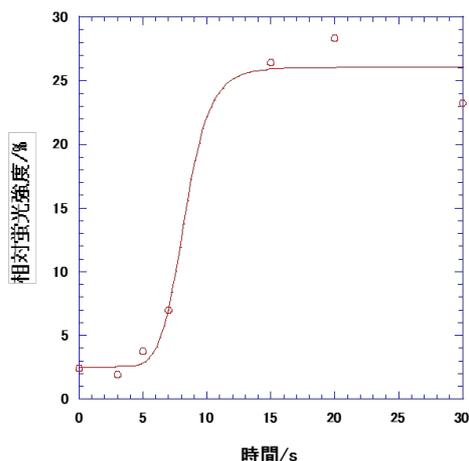


図5. 硫酸転移酵素の反応に伴う、蛍光強度の時間変化

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)

[学会発表](計10件)

宮武智弘、山崎翔平、M. Stefan、「ピレ

ン基を導入した膜透過性オリゴペプチドにおけるピレン部の会合挙動」第9回バイオ関連化学シンポジウム、1P-080(熊本大学、熊本県熊本市、2015年9月10日~12日)

T. Miyatake, H. Takemura, Y. Isotani, S. Matile, "Kinase Assay with Cell-Penetrative Polyallylamine and Fluorogenic Liposome", Eleventh International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, P30 (立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市、2015年5月29日~31日).

宮武智弘、竹村仁志、磯谷侑司、MATILE Stefan「膜透過性を持つカチオン性ポリマーと蛍光性リポソームを利用したキナーゼ類の簡便な活性評価」、日本化学会第95春季年会、2PB-078(日本大学船橋キャンパス、千葉県船橋市、2015年3月26日~29日).

宮武智弘、山崎翔平、MATILE Stefan、「オリゴペプチドにピレニル基を導入した新規膜透過性分子の合成と物性」、日本化学会第95春季年会、3J5-21(日本大学船橋キャンパス、千葉県船橋市、2015年3月26日~29日).

宮武智弘、「混ぜるだけで様々な酵素の活性を蛍光で評価できる検査キットの開発」、関西9私大新技術説明会、(JST東京本部別館ホール、東京都千代田区、2015年2月27日).

宮武智弘、山崎翔平、Matile Stefan「オリゴアルギニンにピレンを導入した新規膜透過性分子の合成と物性」、第8回バイオ関連化学シンポジウム、2P-079(岡山大学、岡山県岡山市、2014年9月11日~13日).

T. Miyatake, S. Yamazaki, S. Matile, "Novel Cell-Penetrative Oligopeptides Possessing Hydrophobic Pyrene Groups", Tenth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, P36 (立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市、2014年6月1日).

宮武智弘、山崎翔平、MATILE Stefan、「オリゴアルギニンにピレンを導入した新規細胞膜透過性分子の開発」、日本化学会第94春季年会、1PB-110(名古屋大学東山キャンパス、愛知県名古屋市、2014年3月27日~30日).

宮武智弘、「蛍光で簡便に検出できる酵素活性評価システム」、第30回バイオ技術シーズ公開会、(大阪科学技術センター、大阪府大阪市、2013年9月26日).

宮武智弘、磯谷侑司、MATILE Stefan「カチオン性ポリマーの膜透過現象を応用した酵素活性の蛍光センシング」

第25回配位化合物の光化学討論会、
O3-02(唐津ロイヤルホテル,佐賀県唐津
市,2013年8月5日~7日).

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