

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 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：2013～2015

課題番号：25460708

研究課題名(和文) 蛍光共鳴エネルギー移動を利用した迅速かつ簡便なテロメラーゼ活性測定法の開発

研究課題名(英文) The development of novel, quick, and simple FRET-based telomerase assay method

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：凝集誘起発光(AIE)色素を用いてガンとアルツハイマー病(AD)の診断を行う手法の開発を行った。それぞれのマーカーはテロメア鎖およびアミロイド(A β)とした。テロメア鎖は、AIE-DNAプローブにより、高い感度で定量が可能であった。また、AIE色素の周辺に分子運動を阻害するダングリングエンドが存在することが、蛍光増大の要件であることが示された。A β の検出には、AIE色素-アミロイド繊維化促進ペプチド(AIE-AFPP)をプローブとして用いた。AIE-AFPPとA β との共凝集によるAIEの蛍光増大から、4.2 nMの検出限界で短時間で容易にA β の定量が可能であった。

研究成果の概要(英文)：A simple and sensitive methods for measuring telomeric tandem repeat DNA and amyloid- β based on AIE phenomena were developed. According to these methods, telomere concentration can be estimated with high sensitivity (5 pM for 12-mer telomeric sequences) using AIE-CCCTAACCTAA probe. On the other hand, the detection of A β was performed with AIE dye-amyloid fibrillization-promoting peptide (AFPP) probe. 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. This method provides a simple, rapid, sensitive and cost-effective assay for telomere sequence and A β .

研究分野：有機合成化学

キーワード：凝集誘起発光 テロメア アミロイド ガン アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

蛍光色素は構造多様性、多彩な蛍光波長(紫外領域～近赤外領域)、高感度などの性質から、有機 EL などの発光デバイス分野だけではなく医療・診断分野においても必要不可欠なものとなっている。特に、蛍光プローブによるセンシング技術やイメージング技術は大きく発展してきた。蛍光色素の中でも、500 nm 以上に吸収・蛍光極大を有し、輝度(モル吸光係数×蛍光量子収率)が高いフルオレセインやローダミン、シアニン、ボロンジピロメテン (BODIPY) などの各種誘導体は、生体試料由来の自家蛍光による影響を抑えつつ、検出感度も高いことから現在使用または市販されているプローブの大半を占めている。しかしながら、現在においても新規な蛍光色素が精力的に開発されて続けているのは、汎用されている蛍光色素がどのような場面においてもその能力を十分に発揮できるわけではないことに起因している。汎用されている蛍光色素において最も懸念される事象が濃度消光であり、例えば蛍光センシングにおいてはプローブが集積することによって濃度消光が問題となる。生体内で生成されるバイオマーカーは、アルツハイマー病 (AD: Alzheimer's Disease) における Amyloid- β ペプチド ($A\beta$) のように、局所的に濃度が高くなるケースが存在する。AD の発症は $A\beta$ の蓄積(凝集)が原因であると考えられているが、上記の性質から汎用的な蛍光色素の利用に課題がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、医療・診断分野における蛍光色素の応用範囲を拡張し、従来の蛍光色素では適用が制限されるバイオマーカーの検出法を開発することである。診断のターゲットとなる疾患として、従来の蛍光色素の利用が困難であり、かつ社会的に大きな問題となっているガンと AD を選択した。これらの疾患は、数ある疾患の中でも早期診断技術の開発が最も望まれている。したがって、本研究の最終的な目標として、次の3項目を設定した。

①バイオマーカーの集積を検出するための蛍光色素として、凝集誘起発光 (AIE: Aggregation-Induced Emission) 色素を用い、ガンにおいてはテロメアの鎖長(テロメア量)、AD においては $A\beta$ の濃度が、高感度かつ広いダイナミックレンジで定量できるプローブを開発する

②本研究で開発するプローブを用いて、テロメアの定量における TRAP Assay や $A\beta$ の定量における ELISA のような従来法に比べて、測定者の熟練や特殊な装置を必要とせず、安価・簡便・高感度・ハイスループットな新規診断手法を確立する

③AIE 色素を利用したプローブを他の疾患に応用するためのプローブ設計の指針となるよう、本プローブによるバイオマーカーの

検出メカニズムを明らかにする

3. 研究の方法

1) AIE 色素ラベル化 DNA プローブを用いたテロメア DNA 検出法の開発

テロメア鎖の相補鎖である CCCTAA の2回繰り返し(12mer)に AIE 色素としてトリフェニルアミンを結合させたプローブを合成し、このプローブを種々の濃度・鎖長のテロメア混合物に加えて蛍光を測定し、テロメア量の定量可能性とその感度について評価した。

2) HeLa 細胞を用いたテロメラーゼ活性の測定

HeLa 細胞の抽出物を用いてテロメア伸長反応を行い、得られた混合物について PCR を行うことなくプローブを加え、蛍光を測定した。用いた HeLa 細胞の細胞数に対して得られた蛍光強度をプロットし、定量性を評価した。

3) AIE 色素ラベル化 PNA プローブを用いたテロメア DNA 検出法の開発

DNA をプローブ中のターゲット認識部位として用いた1)の検討では、融解温度の関係からプローブを 12mer としたが、DNA-DNA 二重鎖よりも安定性の高い DNA-PNA 二重鎖を利用することで、より短鎖のプローブを用いることができ、同一鎖長のテロメアに対してより多くの AIE 色素が結合できることで高感度化を測った。

4) AIE 色素ラベル化ペプチドプローブを用いた $A\beta$ 検出法の開発

$A\beta$ の凝集には通常数日間の時間がかかるが、特定の配列のペプチドはその凝集を3時間程度に短縮できる。このペプチドに AIE 色素を結合させたプローブを合成し、種々の濃度の $A\beta$ 溶液に加えて数時間後、蛍光測定を行った。 $A\beta$ 濃度と蛍光強度の関係から、定量性と感度、ダイナミックレンジについて評価した。

4. 研究成果

1) まず、鎖長の異なるテロメア鎖(12mer～96mer)の溶液に、CCCTAACCTAA の12mer の核酸に AIE 色素を結合させたプローブを加えて蛍光を測定したところ、鎖長に比例して蛍光強度の増大が見られた。このことから、本プローブを用いて、テロメア鎖長の定量ができることがわかった。そこで、次に48mer のテロメア鎖について、濃度が異なる複数の資料を準備し、これに同様にプローブを加えて蛍光測定を行ったところ、この場合にも濃度に比例して蛍光強度が増大した。

実際のサンプルでは、テロメア鎖の鎖長や本数が異なる混合物であるので、この条件を再現したモデル試料として、様々な鎖長のテロメア鎖をいろいろな濃度で混合した溶液を調製し、そのテロメア量を(TTAGGG)の6mer 単位の濃度に換算した値を指標(telomere unit)として同様の蛍光測定を行

った。その結果、蛍光強度は telomere unit に比例して変化することから、本法により任意のテロメア混合物の定量が可能であると結論できる (図1)。

これらの結果を基に、本手法の検出限界を求めたところ、48mer のテロメアに換算して 1.2nM の低濃度まで検出可能であることが明らかとなった。

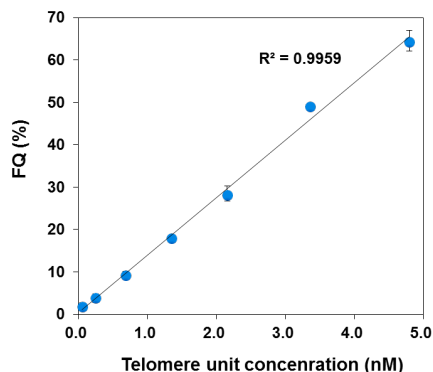


図1. テロメア量と蛍光強度の関係

この検討の過程で、蛍光強度とテロメア鎖長の関係を注意深く調べたところ、プローブの DNA 部分と同じ鎖長である 12mer のテロメア鎖 (TTAGGGTTAGGG) において、蛍光強度の増大が極めて小さいことが明らかとなった。このことは、ターゲットとプローブの結合が 1 : 1 の場合には二重鎖上で AIE 色素の凝集が起こりえないからであるとも考えられるが、今回用いている蛍光色素が分子内回転抑制により発光が誘起される色素であることから、別の可能性も視野に入れて更なる検討を行った。

ターゲットのテロメア鎖の 5'-端側に、プローブの結合と関係のない数残基分のヌクレオチドを結合したものをターゲットとして用い、プローブは先の検討と同じものを用いて蛍光測定を行ったところ、ターゲットとプローブを 1 : 1 のモル比で混合しても蛍光の増大が観測された。これは、ターゲットの 5'-端のヌクレオチドがダンダリングエンドとして存在し、それが AIE 色素の分子内回転を抑制したためであると考えられる。

したがって、同様の考え方で生体分子を認識する部位と AIE 色素を連結したプローブを用いて生体分子のセンシングを行おうとする際には、結合した時に AIE 色素の近辺に存在してその分子内運動を阻害するような部位を設計段階で構築しておく必要があることが示された。

2) 本手法を実際のガン診断に適用することが可能であるかを調べるため、HeLa 細胞を用いてテロメラーゼ活性の測定を行った。

HeLa 細胞からの抽出物を用いてテロメア伸長反応を行った後、PCR を行わずにプローブを加えて蛍光測定を行った。比較のためテロメア伸長反応を行う前に 90°C でインキュベートし、テロメラーゼを失活させた試料を用

いて同様の操作を行い、その蛍光をバックグラウンドとし、それらの差分と、用いた HeLa 細胞数 (1 μL あたり) の関係を求めた。その結果、細胞数 400 個/μL 以上で、テロメラーゼの発現が明確に確認できた (図2)。

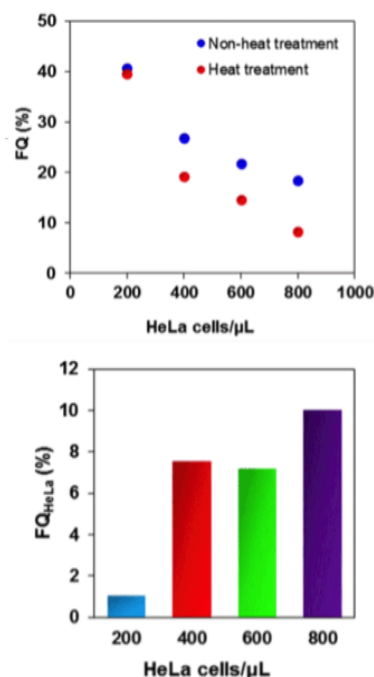


図2. 蛍光強度と HeLa 細胞数の関係

3) 1) ~ 2) の検討では AIE 色素と DNA を結合させたプローブを用いたが、測定の際の試料の取り扱いの簡便さと再現性を重視した結果、二重鎖の融解温度が室温より高くすることが必要であったため、プローブの DNA 鎖は 12mer としているが、凝集誘起発光という特性を最大限に利用するためには、テロメアの最小繰り返し単位である 6mer のプローブを用いて AIE 色素をより多く凝集させた方が発光効率が高く高感度化に適する。したがって、短い配列で融解温度を上げることを目指してプローブに PNA を用いた検討を行った。研究の方法は 1) と同様である。得られた結果から、DNA プローブの場合と同様にテロメア量の定量が可能であることが明らかとなった。ただし、当初の予想とは異なり、テロメア量の増加に伴い観測される蛍光強度は減少した。また、プローブのみをバッファーに溶解させたサンプルは強い蛍光を示した。これは、PNA が DNA に比べて疎水性が高いため、プローブ自身が水溶液中で凝集しているため、プローブそのものよりも DNA との二重鎖の方が親水性 (水溶性) が高いために、テロメア鎖と二重鎖を形成するにつれてプローブの凝集が解消され、蛍光強度が減少したと考えられる (図3)。

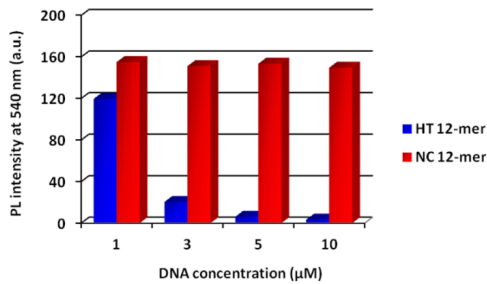


図3. AIE-PNAプローブによるテロメア鎖の定量

4) ADのバイオマーカーであるAβの定量には、AIE色素とアミロイド凝集促進ペプチド(AFPP)を結合させたプローブを用いた。一般の条件ではAβが凝集するには数日程度の時間がかかるが、特定の配列のペプチド(AFPP)を共存させると凝集にかかる時間が約3時間程度まで短縮できる。これはAFPPとAβが結合したものが核となってβシートの形成を促すためであり、その機構から添加したAFPPは生じたAβの凝集体に取り込まれた形で存在すると考えられる。したがって、このAFPPにAIE色素を結合させておくことで、Aβの凝集とともに蛍光強度の増大が期待できる。実際に合成したAβと、プローブを混合して3時間経過後に蛍光スペクトルを測定すると、Aβの濃度に依存して蛍光強度の変化が見られた。この場合、Aβの凝集は時間とともに進行するため、蛍光の強度はAβの溶液とプローブを混合した時点からの経過時間に依存することになる。したがって、測定は厳密に混合後3時間の時点で行った。

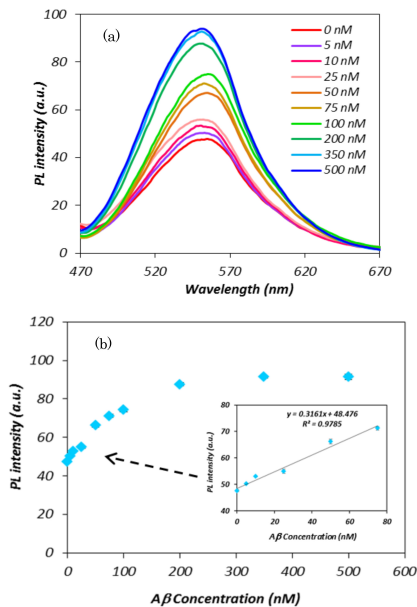


図4. Aβの濃度による蛍光強度変化

この結果から、Aβの濃度が低い領域では濃度と蛍光強度の間には比例関係があり、本手法によってAβの定量が可能であることが示された。また、本法によるAβの検出限界は4.2nMであった。

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 11 件)

1. K. Kawamura, A. Matsumoto, T. Murashima,
“Facile DNA Detection Based on Fluorescence Switching of A Hydrophobic AIE Dye-Labeled Peptide Nucleic Acid Probe by Aggregation/Disaggregation.”

Int. J. Med. Nano. Res. **2015**, 2:011. (査読有)

2. K. Kawamura, R. Nakayama, A. Matsumoto, S. Fujii, T. Murashima,

“Facile Quantification of Alzheimer’s Disease Amyloid-β Based On Aggregation-Induced Emission.”

J. Pharm. Med. Res., **2015**, 1, pp. 27-30. (査読有)

3. H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto,

“A mRNA-responsive G-quadruplex-based drug release system.”

Sensors, **2015**, 15, pp. 9388-9403. (査読有)

4. R. Maeda, H. Yaku, T. Nakabayashi, T. Murashima, N. Sugimoto, D. Miyoshi,

“DNA G-quadruplex detection system employing a protein fibril ligand”

Telomere and Telomerase, **2015**, 2, e691. (査読有)

5. K. Kawamura, H. Yaku, D. Miyoshi, T. Murashima,

“A simple "add and measure" FRET-based telomeric tandem repeat sequence detection and telomerase assay method.”

Org. Biomol. Chem., **2014**, 12, pp. 936-941. (査読有)

6. H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto,

“In vitro assays predictive of telomerase inhibitory effect of G-quadruplex ligands in cell nuclei.”

J. Phys. Chem. B, **2014**, 118, pp. 2605-2614. (査読有)

7. I. Toda, T. Tsuruoka, J. Matsui, T. Murashima, H. Nawafune, K. Akamatsu,

“In situ synthesis of metal/polymer nanocomposite thin films on glass substrates by using highly cross-linked polymer matrices with

tailorable ion exchange capabilities.”
RSC Advances, **2014**, 4, pp. 4723-4726. (査読有)

8. H. Yaku, T. Murashima, H. Tateishi -Karimata, S. -I. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto,
“Study on effects of molecular crowding on G-quadruplex-ligand binding and ligand-mediated telomerase inhibition”
Methods, **2013**, 64, pp. 19-27. (査読有)

9. T. Matsushita, Y. Fukumoto, T. Kawakami, T. Tsuruoka, T. Murashima, T. Yanagishita, H. Masuda, H. Nawafune, K. Akamatsu,
“In situ template synthesis of one -dimensional gold nanoparticle arrays in organic nanowires”
RSC Advances, **2013**, 3, pp. 16243-16246. (査読有)

10. H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto,
“A highly sensitive telomerase activity assay that eliminates false-negative results caused by PCR inhibitors”
Molecules, **2013**, 18, 11751-11767. (査読有)

11. V. Gabelica, R. Maeda, T. Fujimoto, H. Yaku, T. Murashima, N. Sugimoto, D. Miyoshi,
“Multiple and cooperative binding of fluorescence light-up probe thioflavin t with human telomere DNA G-quadruplex”
Biochemistry, **2013**, 52, pp. 5620-5628. (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

1. 星川 喬哉・村嶋 貴之・河村 浩司
「Synthesis of AIE dyes with improved hydrophilicity」
第96回日本化学会春季年会(千葉) 2016年3月26日

2. 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96回日本化学会春季年会(千葉) 2016年3月25日

3. 河村 浩司・松本 亜衣・中山 瑠奈・村嶋 貴之
「Syntheses of AIE dye labeled biomolecular probes aiming to the development of facile diagnosis methods for cancer and Alzheimer’s disease」
Pacifichem 2015, Hawaii, 2015年12月19日

4. 松本 亜衣・河村 浩司・村嶋 貴之
「Construction of nanoparticles using TICT type BODIPYs」
Pacifichem 2015, Hawaii, 2015年12月19日

5. 村嶋 貴之・河村 浩司・中山 瑠奈・松本 亜衣・藤井 敏司
「Development of diagnosis tools for Alzheimer’s diseases based on AIE phenomenon」
Pacifichem 2015, Hawaii, 2015年12月19日

6. 松本 亜衣・河村 浩司・村嶋 貴之
「アルキルアミノ基を有する BODIPY の合成と AIE 特性評価」
第95回日本化学会春季年会(千葉) 2015年3月28日

7. 河村 浩司・松本 亜衣・中山 瑠奈・村嶋 貴之
「AIE 色素標識プローブを用いた生体分子検出法の開発」
第95回日本化学会春季年会(千葉) 2015年3月26日

8. 河村 浩司・松本 亜衣・中山 瑠奈・藤井 敏司・村嶋 貴之
「凝集誘起発光(AIE)色素標識プローブを用いた生体分子検出法の開発」
第9回バイオ関連化学シンポジウム(岡山) 2014年9月12日

9. 山口 隼平・河村 浩司・村嶋 貴之
「両親媒性凝集誘起発光(AIE)型 BODIPY の合成」
第34回有機合成若手セミナー(大阪) 2014年8月5日

10. 河村 浩司・松本 亜衣・村嶋 貴之
「凝集誘起発光(AIE)プローブを用いた簡便なテロメア DNA 検出法の開発」
第34回有機合成若手セミナー(大阪) 2014年8月5日

11. 松本 亜衣・河村 浩司・村嶋 貴之
「アルキルアミノ基を有する BODIPY の合成と AIE 特性評価」
第34回有機合成若手セミナー(大阪) 2014年8月5日

12. 夜久 英信・村嶋 貴之・三好 大輔・杉本 直己
「生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果(56)アニオン性フタロシアニンによるがん細胞特異的増殖阻害」
第94回日本化学会春季年会(名古屋) 2014年3月30日

13. 河村 尚登・村嶋 貴之
「ポルフィリン DNA コンジュゲートによる超分子構造の構築」
第94回日本化学会春季年会(名古屋) 2014

年 3 月 28 日

1 4. 石田 隆真・河村 浩司・村嶋 貴之
「DNA とポルフィリンから構成された機能的分子の合成」

第 94 回日本化学会春季年会 (名古屋) 2014
年 3 月 28 日

1 5. 河村 浩司・池田 創・加賀山 弘樹・村嶋 貴之

「凝集誘起発光 (AIE) 特性および光誘起電子移動 (PeT) 特性を有する蛍光色素の合成と物性評価」

第 94 回日本化学会春季年会 (名古屋) 2014
年 3 月 27 日

1 6. 北 拓朗・村嶋 貴之

「両親媒性ポルフィリンを用いたカプセル型超分子の作製」

第 94 回日本化学会春季年会 (名古屋) 2014
年 3 月 27 日

1 7. 池田 創・河村 浩司・村嶋 貴之

「生理的 pH で蛍光 ON/OFF の制御可能な BODIPY 誘導体の合成」

第 94 回日本化学会春季年会 (名古屋) 2014
年 3 月 27 日

1 8. 石田 隆真・河村 浩司・村嶋 貴之

「4 重鎖を Framework とするポルフィリン-DNA ナノコンジュゲート構築」

第 33 回有機合成若手セミナー(神戸)2013 年
8 月 2 日

1 9. 池田 創・河村 浩司・村嶋 貴之

「pH 応答性蛍光色素 BODIPY の合成の検討」

第 33 回有機合成若手セミナー(神戸)2013 年
8 月 2 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 件)

[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

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

三好大輔 (MIYOSHI Daisuke)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・
教授

研究者番号 : 50388758