

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620115

研究課題名(和文)痛み情報の化学計測と*in vivo*蛍光イメージング研究課題名(英文)Biosensing of pain-sensation-related chemicals and *in-vivo* fluorescent imaging

研究代表者

中野 幸二 (Nakano, Koji)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10180324

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):痛覚や温度覚を担うバニロイド受容体のゲスト認識部位、及び補助的に作用するヘリックス上の結合部位(いずれもアミノ酸10量体)を含んだポリペプチドを分子設計し、基板表面への固定化のためにHisタグを組み込んだ人工ペプチドホストを合成した(VB-His、VB2-His)。VB-Hisは、匂い物質であるバニリンを認識して結合し、蛍光スペクトル応答を示した。VB2-Hisについても同様に検討したが、痛み物質であるカプサイシンと吸収が一致する問題があり、種々検討したが十分な結果が得られなかった。当初予定した分子イメージングは未達に終わったもののVB-Hisを利用した匂い物質センサーを開発することに成功した。

研究成果の概要(英文):By mimicking the transient receptor potential vanilloid receptor 1, two-types of potential artificial receptors that recognize and bind various vanilloid molecules were newly synthesized. The amino-acid sequences of the peptide hosts were as follows: LAMGWTNMLY HHHHHH (VB-His) and YSEILFFVQS-HHHHHH-SLAMGWTNML (VB2-His). Fluorometry spectra for VB-His obtained in the presence of vanillin and related compounds revealed that the host could recognize vanillin to give spectral responses. VB2-His, on the other hand, gave spectrum almost similar to that of the intended guest molecule, capsaicin, which made further applications difficult. Although various fluorophores were examined as alternatives, none of them gave positive outcomes ever. As a consequence one of the initial plan of capsaicin detection for applications to chemical pain sensing was unsuccessful. However, by taking advantage of quartz-crystal microbalance measurements, VB-His was successfully applied to vanillin sensing.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：バイオセンサー バニロイド 受容体 電位チャンネル 合成ペプチド 蛍光共鳴エネルギー移動 カプサイシン 自己組織化膜

### 1. 研究開始当初の背景

生物は、外部環境の変化を素早くキャッチし、適切に行動して絶え間なく変化する環境に対応しなければならない。そのために、外界からの信号を素早くキャッチして処理するセンサーシステム、いわゆる五感（視覚、聴覚、触覚、味覚、嗅覚）をフルに活用している。化学の立場からは、物質情報を捉えて摂食、回避などの生物活動につなげる嗅覚や味覚が興味を中心であった。

最近では「触覚」が新たな研究の潮流になりつつある。例えば、皮膚にはいろいろな受容器が埋め込まれていて、触覚、圧覚、痛覚、温度覚が検知した情報を感覚神経に伝える。そこで、末梢感覚神経に特異的に発現する温度受容体遺伝子がクローニングされた。その結果、一過性受容体電位 (Transient Receptor Potential, TRP) チャンネルに関連するスーパーファミリー (相同性のあるアミノ酸ドメインを持つタンパク質グループ) が明らかになった。なかでもバニロイド受容体 (TRPV1) は、化学物質の侵害刺激 (組織を障害するか、長時間作用すると傷害を生じる可能性のある刺激、カプサイシンなど) を受容するので、いろいろな分野で興味を集めている。バイオセンサーへ関連では、ファージディスプレイ法を利用して発現させたタンパク質を応用する試みが始まっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、TRPV1 のゲスト受容部位を抜き出して化学合成し、これをホスト分子に用いることで痛み情報の化学計測を試みる。痛みは、生物が外界からの侵害刺激を受けたときに、障害部位を認知するために必要不可欠な感覚情報である。しかし、痛みのバイオセンシングについて研究した事例は無い。侵害刺激に反応するホスト分子が利用できなかったことがその理由のひとつであろう。TRPV1 は、カプサイシンやプロトン (酸)、熱など複数の侵害刺激を受容する。言い換えれば、特定の物質を選択性良く測る目的には適していないが、痛みの物質情報を総合的に捉えて「感性」を再現できる可能性がある。そのために、個別の侵害刺激反応だけでなく、それらが共存したことによる増強や不感化についても調べる。併せて、TRPV1 の蛍光応答を使って痛み情報の *in vivo* 蛍光イメージングも検討する。

### 3. 研究の方法

本研究で着目する TRP イオンチャンネルは、細胞膜を 6 回貫通する領域 ( $\alpha$ -ヘリックス) を持つ陽イオンチャンネルである。TRPV1 はそのサブファミリーに含まれ、その有効刺激は、1) トウガラシの主成分であるカプサイシン (辛みとともに痛みを惹起する) に代表されるバニロイド化合物、2) プロトン (酸)、お

よび 3) 熱の 3 つである。これらの刺激を受容するとチャンネルが活性化され、神経細胞の脱分極から活動電位が発生する (図 1)。

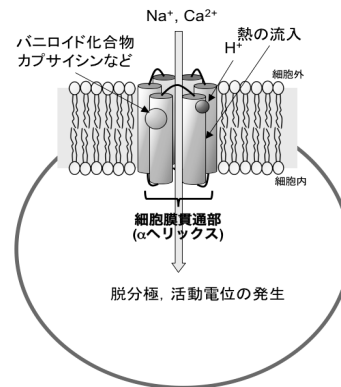


図 1 TRPV1 のイオンチャンネル形成.

TRPV1 はこのように複雑な構造であるが、提案されているゲスト分子の受容モデル (図 2) は、レセプター機能だけを用いるのであれば構造が大幅に簡略化できる可能性を示唆する。即ち、カプサイシンは特定のヘリックス絡みつくようにして結合するので、このヘリックスだけを抜き出して利用すれば良い。相互作用のポイントになるアミノ酸残基 (トリプトファンとチロシン) も、大筋で特定されている。

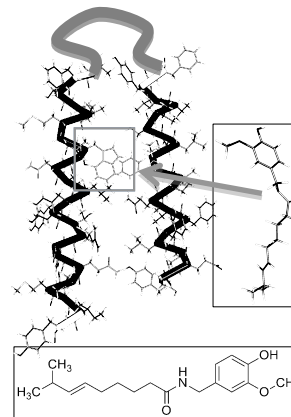


図 2 TRPV1 のカプサイシン受容モデル.

本研究では、トリプトファンを中心にした 10 量体ペプチドを抜き出し、固相ペプチド合成法により化学合成する。このとき、刺激物質の認識情報の読み出しのためにトランスデューサーに固定化できると都合が良い。そこで、カルボキシル基末端にヒスチジンオリゴマーを導入し、Ni(II)-ニトリロ三酢酸錯体 (Ni-NTA) で架橋して固定化できるように工夫する。以下に研究成果をまとめる。

### 4. 研究成果

(1) 新規ペプチドホスト分子の化学合成  
TRPV1 は 6 本のヘリックスのバンドル構

造を持ち、ゲストと相互作用するヘリックス（結合部位）と、それに対向して存在するもう1本のヘリックス（対向部位）がゲストを挟み込むようにして結合したモデルが提案されている。このときの膜貫通部位は20量体程度のアミノ酸から成るが、刺激の受容は外部を向いた10量体程度の領域で起こる。

そこで、報告されているアミノ酸配列を参考に、TRPV1のゲスト受容配列を抜き出して化学合成した（VB）。さらに、上で述べたトランスデューサー表面への固定化のために、ヒスチジン六量体（His タグ）とのコンジュゲートとした（VB-His）。カプサイシン受容ホストの場合には、2本のヘリックスがゲスト分子を挟み込んで結合出来るように、His タグがリンカーになったバンドル構造ペプチドを合成した（VB<sub>2</sub>-His）。いずれのペプチドホストも、理論値の半分程度の偏光性（円二色性スペクトル）を示したので、ヘリックス構造が保たれていると判断できた。表1にそれぞれのアミノ酸配列を示した。

表1 合成ペプチドホストのアミノ酸配列

Entry	Abbr.	Sequence
1	VB	LAMGWTNMLY
2	VB-His	LAMGWTNMLY- HHHHHH
3	VB <sub>2</sub> -His	YSEILFFVQS- HHHHHH- SLAMGWTNML

### (2) 蛍光法によるパニロイドの結合平衡解析

TRPV1のモデルとして、トリプトファン-トレオニンの配列をもったジペプチドが、パニリンが共存するとトリプトファンの蛍光が消光し、代わってパニリン由来の蛍光が生じることが報告されている。これは、トリプトファン残基とパニリンとの間での蛍光共鳴エネルギー移動現象によるものと考えられている。

表1に示したVB、およびVB-Hisについて、トリプトファンやチロシンなどの芳香族性アミノ酸残基由来の蛍光を利用してホスト-ゲスト相互作用を調べた。その結果、パニリンを結合して蛍光共鳴エネルギー移動現象を起こすことが分かった。バンドルペプチドではカプサイシンについても検討したが、両者のUV吸収がほぼ一致するため分離して定量することが出来なかった。非天然の蛍光性アミノ酸の利用や合成後修飾も検討したが、現在までのところ十分な結果は得られていない。このため当初予定した蛍光イメージングは未達に終わった。

### (3) His タグハイブリッド合成ホストの自己組織化と水晶振動子匂い物質センサーへの

### の応用

VB-His、VB<sub>2</sub>-Hisの二種類のHis タグハイブリッドペプチドについて、Ni(II)-ニトリロ三酢酸錯体生成を利用して金基板表面への固定化を検討した。赤外スペクトル測定、あるいは原子間力顕微鏡観察などにより、作製した基板表面を分析した結果、ペプチドホストが自己組織的に結合して単分子膜を形成することを明らかにした（図3）。

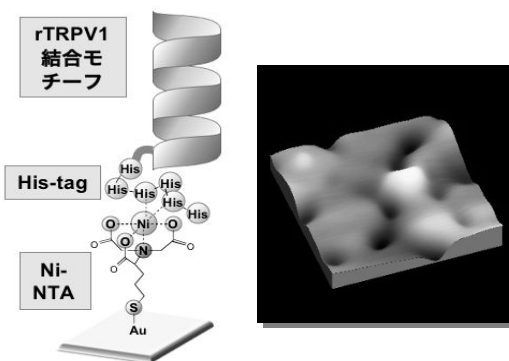


図3 Ni(II)-ニトリロ三酢酸錯体との架橋反応を利用したHis タグハイブリッドペプチドの固定化。右図は、VB-His自己組織化膜の原子間力顕微鏡像。凹凸が数nmしかない金(111)結晶面のテラス構造を維持しながら、均一で滑らかな膜で、ほぼ完全に基板表面を覆われていることが分かった。

以上の結果をもとに、VB-Hisについて、水晶振動子センサーと組み合わせてパニリン（バニラ香の主成分）のバイオセンシングを試みた。図4に結果の一例を示す。まずVB-Hisについては、チップの表面修飾に伴う振動子の共振周波数の低下から、VB-Hisの結合量を $224 \pm 120 \text{ pmol cm}^{-2}$  ( $n=8$ )と定量することができた。これにパニリンを添加した場合(0.725 mM)、同じように共振周波数が低下し、VB-His膜にパニリンが結合することが確認できた。このときの結果は、センサーチップ表面におけるパニリン濃度として $57 \text{ pmol cm}^{-2}$ に対応し、全VB-His分子の66%が結合していることに対応している。以上の結果から、1:1での結合反応を仮定したときの結合定数として $2.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ を得た。

$$K_{\text{app}} = \frac{[\text{VBH-vanillin}]_s}{([\text{VBH}]_s \times [\text{vanillin}])}$$

$$\approx \frac{[\text{VBH-vanillin}]_s}{([\text{VBH}]_s \times C_{\text{vanillin}})}$$

比較のために類似の構造を持つ匂い物質としてアセトフェノンと4-ヘプタノンについても検討した。それぞれ花類や心地よい香りを与える成分であるが、アセトフェノンは10分の1の安定性を示すに止まり、4-ヘプタノンでは全く応答が見られなかった。今回合成

した VB-His は、バニリンとの結合定数はさほど大きくないものの所定の選択性が得られたことから、今後、バニロイド類に対する匂いセンサーへの応用が期待できる。

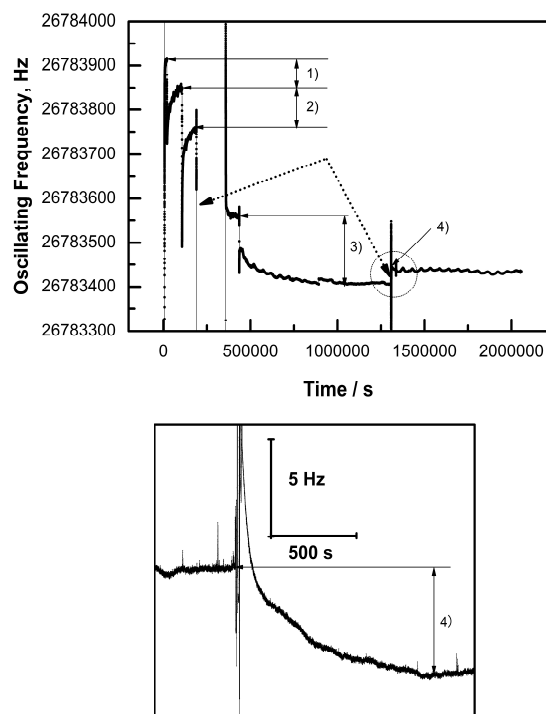


図 4 VB-His 修飾水晶振動子センサーのバニリン応答. 図中番号は、1) ニトリロ三酢酸単分子膜生成、2)  $\text{Ni}^{2+}$  イオン添加、3) VB-His の架橋結合、4) バニリン添加に伴う周波数変化を示しており、下は拡大図. いずれも、振動子を溶液に浸した状態で試料を添加したときの経時変化を示しているが、点線の矢印で示した時間には溶液を全交換している。なおこの実験は、1 個のセンサーチップだけを用いて連続して一連の測定をしている。

## 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 11 件)

K. Nakano, S. Hirata, J. Horiuchi, R. Ishimatsu, T. Imato, T. Onodera, K. Hayashi, Synthesis and Self-Assembly of His-tag Hybrid of Substrate-Binding Short Domain in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 for Vanillin Sensing Application, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 査読有り, 2015, in press.

P. Rattanarat, P. Teengam, W. Siangproh, R. Ishimatsu, K. Nakano, O. Chailapakul, T. Imato, An Electrochemical Compact Disk-type Microfluidics Platform for Use

as an Enzymatic Biosensor, *Electroanalysis*, 査読有り, Vol. 27, pp. 703–712 (2015).

R. Liu, R. Ishimatsu, M. Yahiro, C. Adachi, K. Nakano, T. Imato, Fluorometric flow-immunoassay for alkylphenol polyethoxylates on a microchip containing a fluorescence detector comprised of an organic light emitting diode and an organic photodiode, *Talanta*, 査読有り, Vol. 134, Pp. 37–47 (2015).

S. Guo, R. Ishimatsu, K. Nakano, T. Imato Automated Chemiluminescence Immunoassay for a Nonionic Surfactant using a Recycled Spinning-pausing Controlled Washing Procedure on a Compact Disc-type Microfluidic Platform, *Talanta*, 査読有り, Vol. 133, pp. 100–106 (2015).

R. Liu, R. Ishimatsu, M. Yahiro, C. Adachi, K. Nakano, T. Imato, Photometric flow injection determination of phosphate on a PDMS microchip using an optical detection system assembled with an organic light emitting diode and an organic photodiode, *Talanta*, 査読有り, Vol. 132, pp. 96–105 (2015).

石松亮一, 張瑞峰, 桐野侑子, 中野幸二, 今任稔彦, 表面プラズモン共鳴センサを利用した免疫グロブリン G のフローインジェクション分析, *Journal of Flow Injection Analysis*, 査読有り, Vol. 31, No. 2, pp. 111–114 (2014).

R. Ishimatsu, S. Matsunami, T. Kasahara, J. Mizuno, T. Edura, C. Adachi, K. Nakano, T. Imato, Electrogenerated Chemiluminescence of Donor-Acceptor Molecules Displaying Thermally Activated Delayed Fluorescence, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有り, Vol. 53, No. 27, pp. 6993–6996 (2014).

K. Nakano, T. Kimura, Y. Kitamura, T. Ihara, R. Ishimatsu, T. Imato, Potentiometric DNA sensing platform using redox-active DNA probe pair for sandwich-type dual hybridization at indicator electrode surface, *J. Electroanalytical Chemistry*, 査読有り, Vol. 720–721, pp. 71–75 (2014).

R. Liu, R. Ishimatsu, K. Nakano, T. Imato, Optical Sensing Systems Suitable for Flow Analysis on Microchips, *Journal of Flow Injection Analysis*, 査読有り, Vol. 30, No. 1, pp. 15–20 (2014).

R. Ishimatsu, A. Naruse, R. Liu, K. Nakano, M. Yahiro, C. Adachi, T. Imato, An Organic Thin Film Photodiode as a Portable Photodetector for the Detection of Alkylphenol Polyethoxylates by a Flow Fluorescence-Immunoassay on Magnetic Microbeads in a Microchannel, *Talanta*, 査

読有り, Vol. 117, pp. 139–145 (2014).  
R. Ishimatsu, S. Matsunami, K. Shizu, C. Adachi, K. Nakano, T. Imato, Solvent Effect on Thermally Activated Delayed Fluorescence by 1,2,3,5-Tetrakis(carbazol-9-yl)-4,6-dicyanobenzene, *The Journal of Physical Chemistry A*, 査読有り, Vol. 117, No. 27, pp. 5607–5612 (2014).

〔学会発表〕(計6件)

堀内 潤, 中野幸二, 平田真吾, 石松亮一, 今任稔彦, His タグ融合 TRPV ゲスト結合モチーフペプチドからの自己組織化単分子膜形成とカプサイシンセンシング, 日本分析化学会第 63 年会, 広島市.

田邊 潤吉, 中野幸二, 平田龍太郎, 石松亮一, 今任稔彦, フェロセン化デオキシヌクレオシドポリリン酸の合成と DNA を鋳型とする酵素反応の電気化学分析への応用, 日本分析化学会第 63 年会, 広島市.

K. Nakano, S. Hirata, J. Horiuchi, R. Ishimatsu, T. Imato, T. Onodera, K. Hayashi, Self-Assembly of Vanilloid Binding Domain in Transient Receptor Potential Cation Channels based on His-Tag Chemistry at Gold Surfaces and Guest Molecule Responses, The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, Japan.

中野幸二, 澤田貴文, 森 美詞, 山中 真, 石松亮一, 今任稔彦, 光架橋性分岐 DNA 二重らせんの自己組織化を利用する dendritic 修飾電極の作製とその電気化学特性・バイオセンシング応用, 日本分析化学会第 62 年会, 東大阪市.

S. Hirata, K. Nakano, R. Ishimatsu, T. Imato, K. Hayashi, Synthesis of His-Tag Fused Vanilloid Receptor in Transient Receptor Potential Channels for Biosensing Application of Vanilloids, The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XII), Fukuoka, Japan.

中野幸二, 平田真吾, 石松亮一, 今任稔彦, His タグ融合 TRPV1 ゲスト結合モチーフペプチドからの自己組織化単分子膜形成とバイオセンシング応用, 第 73 回分析化学討論会, 函館市.

〔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.cstf.kyushu-u.ac.jp/~imatolab/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 幸二 (NAKANO KOJI)

九州大学大学院・工学研究院・准教授

研究者番号：10180324