九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

酵素を検出標的あるいは検出手段として用いたバイオ分析のための分子システムの創製

登, 貴信

https://doi.org/10.15017/1931882

出版情報：Kyushu University, 2017, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

（様式２）

氏　　名　：登　貴信

論 文 名　：酵素を検出標的あるいは検出手段として用いた
　　バイオ分析のための分子システムの創製

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

酵素は、生物体内において、様々な化学反応を制御し生命活動を維持している。ゆえに、ある生命活動を司る酵素や疾患関連酵素を検出する技術は、医学・薬学・生物学など、幅広い分野において必要不可欠である。さらに、酵素は、温和な条件下で高い触媒能、特異性を示すという特性から、基礎研究分野における検出ツールや医療現場における診断用ツールとしても利用されている。つまり、酵素は、生命において重要な役割を担っているために検出標的にもなり得る上、触媒分子としての能力の高さから検出手段にもなり得るという、非常に魅力的な研究材料である。ゆえに本論文では、この酵素という生体分子に着目し、『酵素を標的とした分子システム』としてがん関連酵素の 1 つであるプロテインキナーゼ (PK) の活性検出法を、『酵素を手段とした分子システム』として膜タンパク質検出のための細胞染色法 Catalyzed Reporter Penetration (CARP) 法を開発した。

本論文の構成は以下の通りである。

第 1 章では、本論文の導入として、創薬研究における検出標的としての酵素の利用と、生体分子、特に膜タンパク質の検出における検出手段としての酵素の利用を紹介した。

第 2 章では、蛍光性ナノ粒子である量子ドット (QD) と蛍光修飾基質ペプチドを用いた PK 活性検出法を提案した。ハイスループットスクリーニングに有用な PK 活性検出法が開発されている現在において、さらに考慮すべきは「放射性物質を使用しないこと」、「レシオメトリックな検出系であること」、「抗リン酸化抗体を使用しないこと」の 3 つである。これらを満たすべく、QD と PK 基質ペプチド上の蛍光基の間で生じる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用し、リン酸化認識方法の異なる検出法を 2 つ考案した。1 つ目の検出法では、静電相互作用によりリン酸化を認識した。アニオン性 QD とカチオン性蛍光修飾基質ペプチドを混合すると、リン酸化前は静電相互作用により両者は近づき FRET が生じたが、リン酸化後は基質ペプチドの正電荷が相殺され、PK 活性に応じて FRET が解消された。この 2 つの蛍光団の蛍光強度比から PK 活性検出が実現した。2 つ目の検出法では錯形成をリン酸化認識に利用した。リン酸基認識分子である phos-tag を修飾した QD は、リン酸化ペプチドを認識し、それを QD 上に捕捉した。この時、リン酸化率の違いから生じる QD－蛍光基間の FRET 効率の変化から、PK 活性検出に成功した。

第 3 章では、「QD の毒性」、「エンドポイントアッセイ」、「FRET 型検出法の制約の多さ」という第 2 章での問題を克服すべく、静電的な高分子複合体 (PIC) を用いた濃度消光に基づく PK 活

性検出法を構築した。本検出法では、検出シグナルに加え、内部標準シグナルを付与することで、レシオメトリック検出を可能にした。まず「PIC 形成により一方の蛍光基は濃度消光を起こすが、他方は起こさない」という PIC 型プローブを開発すべく、Cy5 を低い修飾率で導入した Cationic polymer と TAMRA を高い修飾率で導入した Anionic polymer を合成した。Cationic polymer には PK 基質ペプチドも修飾した。この 2 種のポリマーから PIC を形成すると、TAMRA は濃度消光を起こす一方、Cy5 ではほとんど生じず、上述した特徴を有する PIC 型プローブが開発できた。このプローブを用いて、実際に PK 活性を継時的に検出したところ、Cy5 の蛍光強度は変化せず、TAMRA の蛍光強度は酵素濃度及び時間依存的に増加した。以上より、TAMRA を検出シグナル、Cy5 を内部標準シグナルとして、第 2 章の問題を克服した新たな活性検出法の構築を達成した。

第 4 章では、アルカリフォスファターゼ (AP) を用いた細胞染色法 CARP 法を開発した。フローサイトメトリー (FCM) を用いた膜タンパク質検出には、従来の染色法では染色能が不十分で、染色能の増幅可能な酵素抗体法ではマルチカラー解析が困難といった問題がある。そこで著者は、AP を用いた新たな細胞染色法による染色能の増幅を試みた。細胞膜上に標識した AP により蛍光修飾基質が脱リン酸化されると、基質は疎水性とカチオン性が増し、細胞膜を透過するため、細胞の蛍光染色が可能となる。設計した蛍光修飾 AP 基質は、メチル-β-シクロデキストリンと包接錯体を形成することで、酵素反応後の細胞染色能が向上した。また、アルキル鎖長が長く疎水性が高い酵素反応後分子ほど、高い染色能を示すことが確認された。次に、内在性 AP 活性の抑制法を検討したところ、バナジン酸あるいは過バナジン酸という阻害剤、または細胞固定によって、内在性 AP 活性の不活化に成功した。最後に、膜タンパク質である CD20 及び EGFR を標的とし、CARP 法による細胞染色とその FCM 検出を行ったところ、どちらにおいても、従来法に比べ検出シグナルの増幅が確認された。以上から、AP を用いて CARP 法のコンセプトの証明に成功した。

第 5 章では、第 4 章とは異なり、内在性酵素の抑制操作なく、バックグラウンドシグナルの抑制と生細胞としての分析を実現するため、哺乳類細胞膜上に発現していない β−ガラクトシダーゼ (β-gal) を用いて CARP 法を構築した。その中で、基質の親水基の数と位置や、基質・酵素濃度、染色時間等の重要なパラメータを評価し、低発現膜タンパク質を標的とした細胞染色に応用可能か検討した。まず、親水基となるガラクトシル基の数と位置の異なる基質を 3 種類合成した。次に、CD20 を標的とした CARP 法において、濃度の異なる各基質を用いたところ、0.1 μM の基質 **Gal2** が FCM 検出において最も優れたシグナルノイズ比を示した。低発現膜タンパク質である CD33 を標的とした場合も 0.1 μM が最適濃度であったため、この条件を以降は利用した。次に、CD20 及び CD33 を標的とした FCM 検出において、染色時間を検討したところ、CD20 検出では 120 分で蛍光シグナルが上限に達したが、CD33 検出では 180 分経過しても増加し続けた。これは標的の発現量の違いに起因すると考えられ、染色時間は標的に応じて調整が必要であると示唆された。基質の種類や濃度、染色時間等の検討が完了したので、CD20 及び CD33 を標的とした FCM 解析において、CARP 法と従来の染色法を比較した。その結果、どちらの膜タンパク質においても、CARP 法の方がより高い染色能を示した。以上より、低発現膜タンパク質を標的として、内在性酵素の抑制操作なく、バックグラウンドシグナルの抑制と生細胞としての分析に成功した。

第 6 章では、本論文の総括を行うとともに、本研究の今後の展望について述べた。