

氏名(生年月日) やまもと りょうこ 山本 涼子 (1988年11月17日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博第166号

学位授与の日付 2017年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 疎水性化合物の高感度分析を可能とするポリジアセチレンリポソーム型イクオリン発光デバイスの開発

論文審査委員 (主査) 教授 北出 達也

(副査) 教授 安井 裕之

(副査) 教授 斎藤 博幸

## 論文内容の要旨

疾病の原因究明や予防、あるいは最適な治療を実施するにあたって、血中や尿中の薬物やバイオマーカーの挙動をモニタリングすることは極めて重要である。しかし、これらを高感度に検出するための分析法として用いられる ELISA 法や LC/MS/MS などの分析法には、前処理や機器の操作が煩雑である、機器の導入および維持に高額の設定投資を必要とするなどの問題点がある。従って、臨床現場における分析対象物のより簡便で迅速、低コストで高感度な分析法の開発が強く望まれている。

このような背景のもと著者は、物質検出のための素子を用いた高感度分析法の確立を目指し、物質との相互作用により信号を生じる signal generator の開発に着手すべく、ポリジアセチレン (PDA) に着目した。PDA は分子中にジアセチレン構造を有するモノマーから UV 照射を経て得られるポリマーであり、共役エンイン構造を有するため可視光を吸収するが、外部刺激によってコンホメーション変化を生じ、その色相が変化することが知られている。特に、PDA 膜を有するリポソームと生体分子や化学物質などとの相互作用を用いた比色分析法は操作が簡便で、視覚的にも結果を容易に判別可能であるので、幅広いターゲット分子の分析法の開発に利用されてきた。しかし一方で、色相変化を用いた分析法には、感度が低いという問題点がある。そこで本研究では、PDA のコンホメーション変化を活用した、新規な物質検出メカニズムに基づいた signal generator を開発することを目的とした。すなわち、signal generator として、PDA 膜を有するリポソームと発光タンパク質であるイクオリン (AQ) による生物発光を組み合わせたポリジアセチレンリポソーム型イクオリン発光デバイス (PLABD) を考案し、疎水性アミン化合物を分析対象物として、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性および signal generator としての有用性について検討を行った。

### 第1章 PLABD の構築および物質検出メカニズムの妥当性に関する検討

著者が提唱した、PLABD の物質検出メカニズムの仮説を以下に詳述する。AQ をリポソームの内水相、Ca<sup>2+</sup>イオンキャリアーとしてカルシウムイオノフォア (CI) をジアセチレン脂質膜中にそれぞれ封入したジアセチレンリポソーム (DALs) を作製する。この DALs に 254 nm 付近の UV を照射し、ジアセチレン脂質同士が架橋し PDA 膜となった PLABD を得る。PLABD では隣接するジアセチレン脂質が重合しているため PDA 膜中に存在する CI の運動性が抑制されており、この PLABD 懸濁液に Ca<sup>2+</sup>イオンを加えても、PLABD 内水相に存在する AQ の発光は観測されない。次いで、Ca<sup>2+</sup>イオン存在下

での PLABD 懸濁液に分析対象物を添加すると、PLABD と分析対象物との相互作用により、PLABD 膜のコンホメーション変化が生じる。その結果、CI の運動性が回復し、外水相に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが CI を介して PLABD 内水相へと拡散し、PLABD 内水相の AQ の発光が観測される。したがって、PLABD を用いた分析法はこの時に生じる AQ の発光強度より、分析対象物の定量を行う方法である。

本章では、上記で提唱した物質検出メカニズムの妥当性の検討を目的に、ジアセチレン構造を有する脂質 10,12-pentacosadiynoic acid を用いて逆相蒸発法により DALS を作製し、この DALS に UV を 10 分間照射して PLABD を調製し、DALS および PLABD に  $\text{Ca}^{2+}$  イオン、また PLABD に分析対象物としてリドカイン (LCN) を添加した時の AQ の発光挙動を追跡した。

まず、CI の運動性を検討するために、DALS 懸濁液と PLABD 懸濁液にそれぞれ  $\text{CaCl}_2$  水溶液を添加した時の発光強度を測定した。その結果、PLABD 懸濁液では DALS 懸濁液よりも発光強度は低値となった。DALS と PLABD はいずれも内外の両水相に AQ が存在しているので、この結果は、外部から  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを添加した際に DALS では内外の両水相の AQ が発光する一方、PLABD では外水相の AQ のみが発光し、内水相の AQ は発光しないためであると考えられた。したがって、PLABD では CI の運動性が抑制されていることが示された。

次いで、PLABD の物質応答性を検討するため、あらかじめ一定量の  $\text{CaCl}_2$  水溶液と混合した PLABD 懸濁液に LCN 水溶液を添加すると内水相に存在する AQ の発光が観測され、LCN 濃度の増加に応じた発光強度の増大が見られた。一方、LCN を含まない超純水を添加した場合には AQ の発光はほとんど観測されなかった。以上のことから、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性が示され、目的とする PLABD を構築することができた。

## 第2章 疎水性アミン化合物に対する PLABD の signal generator としての有用性の検討

PLABD の signal generator としての有用性を検討するために、LCN および構造の類似したプロカイン (PCN)、プロカインアミド (PCA) の3種の薬物を分析対象物として、PLABD の応答性と感度について、従来の比色分析法との比較を行った。AQ と CI を含有しない PDA リポソーム (PDALS) を PLABD と同様に調製し、各薬物を添加した後の色相を視覚的に確認した。最も広い濃度範囲で色相変化が見られた LCN について、吸収スペクトルを用いた比色分析法では、0.25–6.25 mM の濃度範囲で、直線で近似した場合の相関係数は  $r=0.89$  であった。一方、あらかじめ一定量の  $\text{CaCl}_2$  水溶液と混合した PLABD 懸濁液に各薬物の水溶液を添加した際には、薬物濃度の増加に応じて AQ の発光強度の増大が見られ、LCN の 10 nM–10 mM、PCN の 10 nM–100  $\mu\text{M}$ 、PCA の 100 nM–100  $\mu\text{M}$  の濃度範囲において、直線で近似した場合の相関係数はそれぞれ  $r=0.89$ 、 $r=0.66$ 、 $r=0.74$  であった。以上の結果より、PLABD を用いた分析法は、PDALS を用いた比色分析法と比較して大幅にダイナミックレンジが広く、感度もより高いことが明らかとなり、PLABD の signal generator としての有用性が示された。

上記の PLABD の実験において、LCN と他の薬物との間では応答性に差が見られたため、この要因について考察を行った。前述の PLABD の実験は pH11.0 条件下で行ったものであり、3種の薬物はほとんどが分子型として存在している。また、LCN、PCN、PCA の  $\log P$  値はそれぞれ 2.26、0.88、1.92 であり、LCN は他の薬物よりも疎水性の高い化合物であるため、各薬物と PLABD 膜との疎水性相互作用の大きさが応答性の違いに関与していると考えた。そこでこの考察を実証するため、LCN の  $\text{pK}_a$  値が 7.9 であることを利用して、分子型の存在比率がより小さい pH9.0 条件下で同様の実験を行った。その結果、pH9.0 条件下では LCN の 100 nM–10 mM の濃度範囲で、直線で近似した場合の相関係数は  $r=0.77$  であった。pH11.0 条件下と pH9.0 条件下の両実験結果を比較すると、分子型の存在比率がより大きい pH11.0 条件下で、より高感度に LCN を検出することができた。この結果より、PLABD の物質応答性には、PLABD 膜と分析対象物との疎水性相互作用が大きな役割を果たすことが示された。

以上、本研究で PLABD の物質検出メカニズムの妥当性および signal generator としての有用性を明らかにすることにより、物質検出のための新たな素子となる PLABD を構築することができた。PLABD は、PDA の色相変化を利用した従来の比色分析法では困難な高感度分析を可能とし、また PLABD を用いた分析法は測定が簡便かつ迅速である。今後は、抗原抗体反応など分析対象物に特異的な反応を PLABD 膜表面で捉え、それに応答する PLABD の構築により、臨床現場で求められる薬物やバイオマーカーの PLABD を用いた新規高感度分析法の開発へと、更なる展開が期待できる。

## 審査の結果の要旨

臨床現場における血中や尿中の薬物やバイオマーカーの挙動のモニタリングは、種々の疾患の病態解明および診断に有用な情報を与える。しかし、これらの分析対象物を高感度に検出する分析法として、現在用いられている酵素免疫測定法や LC/MS/MS などは前処理や機器の操作が煩雑であり、さらに高額な設備投資を必要とするという問題点がある。したがって、より簡便で迅速、低コストで高感度な分析法の開発は、臨床現場における重要な課題の一つである。

本研究において著者は、物質検出のための素子を用いた高感度分析法を確立するための基盤の構築として、新規な物質検出メカニズムに基づいた signal generator を開発するにあたり、 $\pi$  共役系ポリマーであるポリジアセチレン (PDA) に着目した。PDA は外部刺激によってコンホメーション変化を生じ、その色相が変化するという特性から、これまで比色分析法における素子として多く研究されてきた。しかし、PDA を用いた比色分析法は操作が簡便である一方で、感度が低いという問題点がある。そこで著者は PDA 膜を有するリポソームと、発光タンパク質であるイクオリン (AQ) による生物発光を組み合わせたポリジアセチレンリポソーム型イクオリン発光デバイス (PLABD) を考案した。本研究では PLABD の構築を行い、疎水性アミン化合物を分析対象物として、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性および signal generator としての有用性の検討を行った。

第1章では、PLABD の物質検出メカニズムの仮説を提唱し、それに基づいて PLABD の構築を行い、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性について検討した。ジアセチレン構造を有する脂質を用いて作製したジアセチレンリポソーム (DALS) に UV を照射して調製した PLABD は、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンの添加によって生じる AQ の発光強度が DALS と比較して低く、重合によって CI の運動が抑制され、それに伴って AQ の発光が抑制されていることが示された。また、 $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下の PLABD に超純水を添加した場合には AQ の発光はほとんど観測されなかった一方、分析対象物としてリドカイン (LCN) を添加すると AQ の発光が観測され、LCN 濃度と発光強度の間に相関が見られた。以上から、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性を示し、物質応答性を有する PLABD を構築することができた。

第2章では、高感度分析における PLABD の signal generator としての有用性について検討し、さらに分析対象物と PLABD の相互作用について疎水性相互作用が影響するという仮説を立て検証した。LCN およびプロカイン (PCN)、プロカインアミド (PCA) の3種の薬物を分析対象物として、PLABD の応答性と感度を、PDA リポソーム (PDALS) を用いた従来の比色分析法と比較した。その結果、PLABD を用いた分析法は、PDALS を用いた比色分析法と比較して大幅にダイナミックレンジが広く、感度もより高いことが明らかになり、PLABD の signal generator としての有用性が示された。さらに、薬物と PLABD 膜の相互作用に疎水性相互作用が関与するという仮説を立て、LCN、PCN および PCA

の中で最も応答性が高かった LCN について、LCN の分子型比率の異なる pH 条件下での応答性と感度を比較検討した。その結果、分子型の存在比率がより大きい pH 条件下で、より高感度に LCN を検出した。したがって、PLABD の物質応答性に、PLABD と分析対象物との疎水性相互作用が影響することが示された。

以上、本研究結果は、物質検出のための素子を用いた高感度分析法を確立するための、新規な物質検出メカニズムに基づいた **signal generator** の開発に新たな知見を加え、臨床現場で求められる薬物やバイオマーカーの新規高感度分析法の開発につながる重要な成果であると考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。