

平成22年 5月16日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19685015

研究課題名（和文）

新奇構造を有する機能選択的タンパク質迅速検出・標識・分離解析システムの構築

研究課題名（英文） Development of novel compound of function selective labeling reagent for proteins and its systematic use

研究代表者

比能 洋（HINO HIROSHI）

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

研究者番号：70333333

研究成果の概要（和文）：シアリダーゼをモデルタンパク質とし、酵素の機能選択的に共有結合を形成可能な自殺基質によるラベル化情報を用いた新規阻害剤の開発を行った。構造変化が予測されたループ構造と相互作用できるよう Focused library を設計し、その阻害能を評価した結果、特異的かつ強力な阻害剤が見出された。さらに、既知の非特異的阻害剤と本研究で見出された特異的阻害剤の構造を組み合わせた結果、最強( $K_i = 73 \text{ nM}$ )の阻害剤を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：I have tried to develop a novel method of inhibitor design of such enzymes exemplified to a neuraminidase *Vibrio cholerae* neuraminidase (VCNA) of which crystal structure was reported in 1994 and most potent inhibitor was reported in 1971. As a result, a potent inhibitor for *Vibrio cholerae* neuraminidase was developed using mechanism-based labeling information of key amino acid residues, design of a skeleton of focused library based on labeling information, screening of the focused library, and elimination of promiscuous inhibitor by detergent-based assay to afford potent ( $K_i = 73 \text{ nM}$ ) and selective inhibitor among viral, bacterial, and mammal neuraminidases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：自殺基質、機能選択的、特異的阻害、触媒部位の同定、ラベル化、非特異的阻害、活性化速度

## 1. 研究開始当初の背景

生体高分子は産生・完成品の利用・分解の流れの中でその機能を発揮しているため、その産生・分解を司る酵素は重要なバイオプローブである。従って、その機能の迅速検出・制御できる化合物群は診断薬・治療薬の創薬

シードとなりうる。生体高分子の中でも糖鎖はその生産・分解様式が非常に複雑であると共に、主に細胞表層物質または分泌物として産生されることから、分化・免疫・癌・感染など、多細胞生物独特の生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかにさ

れつつある。申請者はこれまでこれらの糖鎖機能を探索・利用するための基礎研究を一貫して展開しており、糖鎖・複合糖質プローブ作成技術 (*Organic Lett.*, **2005.**; *Tetrahedron Lett.*, **2005.**; *J. Org. Chem.*, **2006.** 他7報) の開発とこれらの技術を用いた糖質関連プローブのコンビナトリアル合成 (*J. Am. Chem. Soc.*, **2005.**; *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2005.**; *J. Org. Chem.*, **2006.** in press.) に成功し、さらに、二基質型誘導体による糖転移酵素の高選択的阻害剤の開発とコンビナトリアル合成による機能探索 (*Tetrahedron Lett.*, **2002.**; *J. Org. Chem.*, **2003.**) および生体中の糖鎖の迅速捕捉・分析技術の開発 (*Angew.Chem.Int.Ed.*, **2005.**) に成功している。これらの成果は分化・免疫・癌などの細胞機能や異常に関連する糖鎖の探索と創薬にむけた応用研究に利用され、産学一体となった実用化研究プロジェクトが複数立ち上がっている。一方、糖分解機能の探索に関しては糖分解酵素に対する自殺基質型糖誘導体を作成し、糖分解酵素の標識および活性部位の探索 (*biochemistry*, **2005.**) に成功しているが、糖分解酵素は細胞内で産生される酵素に加え、インフルエンザノイラミダーゼなど、感染症などに関わる生体外由来の酵素の迅速検出・同定、阻害剤の設計等への応用研究を強く意識する必要があるため、本申請課題のような新奇プローブとその利用法を開発する必要がある。すなわち、外来の(遺伝子解析だけでは予測できない)酵素および酵素作用機構の迅速検出・同定を行うためには、その酵素機能の迅速検出と迅速分離を両立する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、自殺基質型酵素プローブを用いることにより機能選択的酵素の迅速抽出、機能解析、阻害剤設計等に利用することを目的としている。特に、自殺基質によるラベル化の位置が特定の場所に限られる場合は活性化した分子と酵素ラベル化部位の相互作用が存在することを示しており、その部位は新たな創薬設計の対象となりうる。現在、阻害剤などの設計は結晶の静的な構造情報と計算による仮想的動的情報に基づいて設計されているものが多い。一方、酵素などは活性部位周辺に様々なループ構造を有し、従来の研究ではその動的作用の正確な予測や、その動的変化に基づく分子認識の予測は困難であった。本研究では実際の相互作用に基づいた自殺基質型プローブによるラベル化を行うことにより実際に最も強く相互作用する活性部位周辺構造の抽出を行ない、新規阻害剤の設計を行うことを目的とする。また、自殺基質によるラベル化効率の改良や酵素特異性の向上(または平滑化)などに必要な修飾技術についても検討する。

## 3. 研究の方法

まず、自殺基質を用いた酵素のラベル化情報に基づき新規阻害剤を設計する。設計において、ラベル化の位置情報と標的酵素の結晶構造情報を用い、その動的変化しうる方向を予測する。その予測した部位周辺のみにも多様性を与えた化合物のフォーカスライブラリを構築する。フォーカスライブラリ作製においてはClick反応を使用する。得られたフォーカスライブラリの評価を行い、リード化合物の構造を決定後、既知阻害剤との比較や他のシアリダーゼに対する阻害能などを評価し、阻害機構を検証する。さらに、得られた阻害機構に基づいてさらなる阻害剤の改良について検討する。

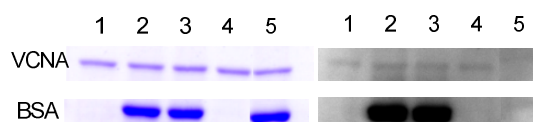
自殺基質の改良に関しては、まず酵素に認識される糖骨格は変化させず、アグリコン部位に多様性を与える。アグリコン部位への多様性の付与はクリック反応を利用し、迅速なライブラリ構築を行う。ライブラリの阻害能の変化や阻害機構を評価し、さらなる自殺基質型阻害剤の構造について検討する。

また、自殺基質に関しては様々なシアリダーゼに対する阻害能およびラベル化パターンの解析を行い、新規阻害剤設計に向けた標的の調査を行うとともに、自殺基質そのものが創薬候補化合物となりうるかについても検討を行う。

## 4. 研究成果

まず、BSAなどの依雑タンパク質の影響を調査した結果、本研究で用いている自殺基質が夾雑タンパク質にも結合し、現状の設計では混合系から標的タンパク質を機能選択的に検出することが困難であることが判明した。

Entry	1	2	3	4	5
Inhibitor	CHF <sub>2</sub>				
VCNA	○	○	○	○	○
Triron	×	×	○	○	×
BSA	×	○	○	×	○



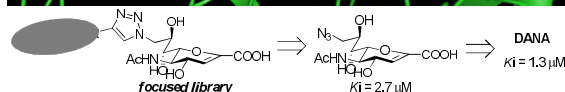
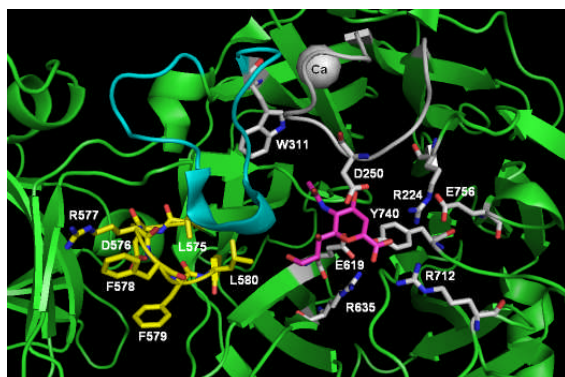
これまで、*Science*誌を含め、difluoromethylphenyl誘導体を用いたタンパク質の選択的検出が報告されていたが、少なくともBSA共存下では標的酵素よりもBSAの方がより優先的にラベル化されていることが明らかとなった。これは、自殺基質のラベル化機能部位が酵素の作用により分解された後、活性部位近傍

のアミノ酸残基と共有結合を形成する前に活性部位から遊離し、疎水性相互作用に基づき系内のタンパク質と共有結合を系せいていると思われる。従って、2005年に報告したような特異的ラベル化は、反応メカニズムに基づく結合形成、および、ラベル化機能部位と強い疎水性相互作用を示す部位との結合形成、の2種のラベル化機構が存在しうることが予想された。特に後者は本プロジェクトの前提を覆すものであるため、本研究の方針を修正し、以下の2点を中心とした検討を行うこととした。

- (1) ラベル化情報に基づく新規阻害剤の開発
- (2) ラベル化機能部位の遊離を防ぐ構造を有する新規自殺基質の開発

以下にこれらの検討の結果を示す。

(1) ラベル化情報に基づく新規阻害剤の開発  
自殺基質によるラベル化は少なくとも一定の特異性を示しており、この特異性は反応機構または特異的相互作用によるものである。また、自殺基質によるラベル化に伴い酵素が失活していることから、このラベル化部位は阻害剤開発の標的となることが予想される。そこで、シアリダーゼをモデルタンパク質とし、酵素の機能選択的に共有結合を形成可能な自殺基質の改良と利用技術に関して検討を行った。まず、自殺基質のアグリコン部位を1,2,3-triazol形成反応 (Click反応) により修飾し、Focused libraryを作成した。このFocused libraryを *Vibrio cholerae* 由来シアリダーゼおよびヒトシアリダーゼに作用させた結果、アグリコン構造の変化に基づく阻害能の変化が確認された。

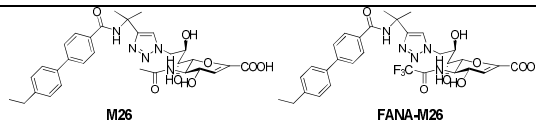


さらに、自殺基質を用いた機能選択的酵素修飾、修飾部位の解析、および解析結果に基づく阻害剤開発を行った。 *Vibrio cholerae* 由来シアリダーゼに自殺基質を作用させた結果2ヶ

所のアミノ酸残基がラベル化されていることが判明した。結晶構造ではラベル化されたアミノ酸残基は活性部位から20Å離れており、基質認識に伴う活性部位周辺ループ構造の変化が示唆された。そこで、構造変化が予測されたループ構造と相互作用できるよう

Focused libraryを設計し、その阻害能を評価した結果、特異的かつ強力な阻害剤が見出された。さらに、既知の非特異的阻害剤と本研究で見出された特異的阻害剤の構造を組み合わせた結果、現時点で最強(Ki = 73 nM)の阻害剤を得ることに成功した。

compounds	Ki (μM)		
	VCNA	FluB NA	Neu2
4-MU-NANA (Km)	41	10	540
DANA	1.3	0.93	114
9-N <sub>3</sub> DANA	2.7	-	-
M7	0.99	-	-
M26	0.19	> 1000	874
M27	0.52	-	-
FANA	0.15	0.46	43
9-N <sub>3</sub> FANA 6	0.37	-	-
FANA-M26	0.073	> 1000	161

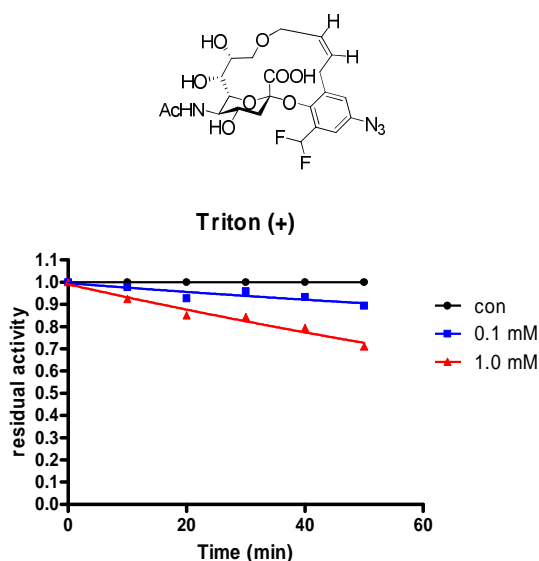


また、シアリダーゼ自殺基質を用い *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase TcTS に対して阻害能を有すること、ラベル化位置がVCNAと全く異なること、比較的高濃度を要するもののトリパノソーマクルジ原虫の細胞侵入抑制効果を示すことが確認された。また、自殺基質による非特異的ラベル化が観察されたことから、ラベル化の特異性を向上させるため、環状自殺基質の設計と合成についても検討した。

- (2) ラベル化機能部位の遊離を防ぐ構造を有した新規自殺基質の開発

自殺基質による非特異的相互作用がラベル化部位の遊離に基づくものであることから、これを防ぐため、酵素による開裂部位と別に基質と共有結合を有する環状自殺基質の設計と合成を行った。環化反応はolefin metathesis反応により行い、自殺基質のラベル化機能部位とシアル酸の9位水酸基が共有結合した誘導体を得た。本化合物を界面活性剤の存在下ラベル化反応を行ったところ、酵素の活性低下が確認され、活性部位内において特異的に自殺基質によるラベル化および阻害が進行し

ていることが示唆された。今後、(1)の検討結果の知見と融合することにより、本環状化合物の改良を行う予定である。



#### 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2件)

- 1) Sebastião T Carvalho, Mauro Sola-Penna, Isadora A Oliveira, Samuel Pita, Arlan S Gonçalves, Bianca C Neves, Francisco R Sousa, Leonardo Freire-de-Lima, Masaki Kuroguchi, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura, Lucia Mendonça-Previato, Jose O Previato, Adriane R Todeschini "A new class of mechanism-based inhibitors for *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and their influence on parasite virulence", *Glycobiology*, in press (2010).
- 2) Hiroshi Hinou, Hirokazu Kai, Shin-Ichiro Nishimura "Mechanism-based Probing, Characterization, and Inhibitor Design of Glycosidases and Glycosyltransferases", *Methods in Molecular Biology*, in press.
- 3) Shingo Arioka, Masahiro Sakagami, Rie Uematsu, Hiroto Yamaguchi, Hiroko Togame, Hiroshi Takemoto, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "Potent inhibitor scaffold against *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, **18**, 1633-1640, 2010.
- 4) Hiroshi Hinou, Naohiro Saito, Masato Ogawa, Takahiko Maeda, Shin-Ichiro Nishimura "Microwave Effect for Glycosylation Promoted by Solid Super Acid in Supercritical Carbon Dioxide" *International Journal of Molecular Science* **10**, 5285-5295, 2009.
- 5) Takahiko Matsushita, Reiko Sadamoto, Naoki Oyabu, Hideki Nakata, Masataka Fumoto, Naoki Fujitani, Yasuhiro Takegawa, Takashi Sakamoto, Masaki Kuroguchi, Hiroshi Hinou, Hiroki Shimizu, Takaomi Ito, Kentaro Naruchi, Hiroko Togame, Hiroshi Takemoto, Hirosato Kondo, Shin-Ichiro Nishimura "Functional Neoglycopeptides: Synthesis and Characterization of New Class MUC1 Glycoprotein Models Having Core 2-based O-Glycan and Complex-type N-Glycan Chains", *Biochemistry*, **48**, 11117-11133, 2009.
- 6) Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "Mechanism-Based Probing, Characterization, and Inhibitor Design of Glycosidases and Glycosyltransferases", *Curr. Top. Med. Chem.*, **9**, 106-116, 2009.
- 7) Naoki Ohyabu, Hiroshi Hinou, Takahiko Matsushita, Ryuko Izumi, Hiroki Shimizu, Keiko Kawamoto, Yoshito Numata, Hiroko Togame, Hiroshi Takemoto, Hirosato Kondo, Shin-Ichiro Nishimura "An Essential Epitope of Anti-MUC1 Monoclonal Antibody KL-6 Revealed by Focused Glycopeptide Library", *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 17102-17109, 2009.
- 8) Kensaku Hosoguchi, Takahiro Maeda, Jun-ichi Furukawa, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "An Efficient Strategy for the Exploration of Specific Inhibitors of Sialyltransferases" *Proceeding of Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development*, *Springer*, 294-301, 2009.
- 9) Masakazu Hachisu, Hiroshi Hinou, Manabu Takamichi, Sakae Tsuda, Shuhei Koshida, Shin-Ichiro Nishimura "One-pot synthesis of cyclic antifreeze glycopeptides", *Chem. Commun.*, 1641-1643, 2009.
- 10) Hiroki Shimizu, Yayoi Yoshimura, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "A new glycosylation method part 3: study of microwave effects at low temperatures to control reaction pathways and reduce byproducts", *Tetrahedron*, **64**, 10091-10096, 2008.
- 11) Ken Shimawaki, Yoshinori Fujisawa, Fumihiro Sato, Naoki Fujitani, Masaki Kuroguchi, Hiroko Hoshi, Hiroshi Hinou, and Shin-Ichiro Nishimura "Highly efficient synthesis of versatile proteoglycan core structures from 1,6-anhydro- $\beta$ -lactose as a key starting material", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 3074-3079, 2007.
- 12) Hideyuki Shimamoka, Hiromitsu Kuramoto, Jun-ichi Furukawa, Yoshiaki Miura, Masaki Kuroguchi, Yoko Kita, Hiroshi Hinou, Yasuro Shinohara, and Shin-Ichiro Nishimura



“One-pot solid phase glycoblotting and probing by trans-oximization for high-throughput glycomics and glycoproteomics” *Chemistry-A European Journal*, **13**, 1664-1673, 2007.

- 13) Kisaburo Deguchi, Hiroki Ito, Takashi Baba, Atsushi Hirabayashi, Hiroaki Nakagawa, Masataka Fumoto, Hiroshi Hinou, and Shin-Ichiro Nishimura “Structural analysis of O-glycopeptides employing negative- and positive-ion MSn spectra obtained by collision-induced and electron-capture dissociations in linear ion trap time-of-flight mass spectrometry”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 691-698, 2007.

[学会発表] (計 15 件)

- 1) Hiroshi Hinou, Risho Miyoshi, Yasuaki Takasu, Hirokazu Kai, Masaki Kurogochi, Xiao-Dong Gao, Shin-Ichiro Nishimura “Novel Strategy for Neuraminidase Inhibitors Using Mechanism-based probe” American Chemical Society Spring 2010 National Meeting & Exposition, San Francisco (CA), USA, Mar. 21th-25th, 2010.
- 2) 比能洋, 三好利尚, 高須康明, 甲斐宏一、西村紳一郎、自殺基質型酵素プローブを用いた *Vibrio cholerae* neuraminidase 阻害剤の開発、2009 年 8 月 25 日、GFRG シンポジウム、札幌 (ポスター)
- 3) Hirokazu Kai, Yasuaki Takasu, Risho Miyoshi, Masaki Kurogochi, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura, Design and Synthesis, and Evaluation of Sialidase Inhibitors Based on Enzymatic Dynamism, 2009/3/13, The 6th Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, Sapporo (Poster).
- 4) Kiminori Sato, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura, Research on the development of novel structure-based sialidase inhibitors, 2009/3/13, The 6th Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, Sapporo (Poster).
- 5) Takahiro Maeda, Jun-ichi Furukawa, Kenji Takaya, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura, Novel inhibitor development for fucosyltransferases using simple donor analog as a scaffold, 2009/3/13, The 6th Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, Sapporo (Poster).
- 6) Kensaku Hosoguchi, Takahiro Maeda, Jun-ichi Furukawa, Hiroshi Hinou, Shin-ichiro Nishimura, An efficient strategy for the exploration of specific inhibitors of sialyltransferases, 2009/3/13, The 6th Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, Sapporo (Poster).
- 7) Takayuki Hurukawa, Hiroshi Hinou, Fei Feng, Shin-Ichiro Nishimura, Mechanism-based fluorescent labeling of BSA using suicide substrate, 2009/3/13, The 6th Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, Sapporo (Poster).
- 8) 阿部皓基, 比能洋, 古川潤一, 前田哲宏, 細口健作, 西村紳一郎, ppGalNAcT 阻害剤に関する研究、2009 年 3 月 27-30 日, 日本化学会第 89 春季年会, 船橋 (口頭)
- 9) 古川貴之, 比能洋, 馮飛, 西村紳一郎, 新規自殺基質を用いた蛋白質のラベル化, 2009 年 3 月 27-30 日, 日本化学会第 89 春季年会, 船橋 (ポスター) .
- 10) 佐藤公法, 比能洋, 高須康明, 黒河内政樹, 西村紳一郎, 新規骨格をベースとしたシアリダーゼ阻害剤の開発研究, 2009 年 3 月 27-30 日, 日本化学会第 89 春季年会, 船橋 (ポスター)
- 11) Hiroshi Hinou, Yasuaki Takasu, Kiminori Sato, Hirokazu Kai, Masaki Kurogochi, Nobuaki Miura, Taku Nakahara, Xiao-Dong Gao, Shin-Ichiro Nishimura, Mechanism-based Strategy Toward Novel Inhibitor of Sialidases, 2008/7/21~8/1, XXIV International Carbohydrate Symposium, Oslo, Norway (Poster).
- 12) 甲斐宏一, 比能洋, 西村紳一郎, シアリダーゼ自殺基質におけるアグリコンフォーカスライブラリーの作成と評価, 2008 年 1 月 29 日, 第 42 回高分子学会北海道支部研究発表会, 札幌 (ポスター) .
- 13) 細口健作, 古川潤一, 前田哲宏, 比能洋, 西村紳一郎, フォーカスライブラリーを用いた特異的シアル酸転移酵素阻害剤の探索, 2008 年 1 月 29 日, 第 42 回高分子学会北海道支部研究発表会, 札幌 (口頭) .
- 14) Yasuaki Takasu, Masaki Kurogochi, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura, Design and synthesis and evaluation of sialidase inhibitors based on enzymatic dynamism, Annual Meeting of the Society for Glycobiology, 2007/11/11~14, Boston, USA (Poster).
- 15) Kensaku Hosoguchi, Junichi Furukawa, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura, An Efficient Strategy for the Exploration of Specific Inhibitors of Sialyltransferases, Annual Meeting of the Society for Glycobiology, 2007/11/11~14, Boston, USA (Poster).

[産業財産権]

- 1) 出願状況 (計 2 件)

名称: シアリダーゼ阻害剤  
発明者: 西村紳一郎, 比能洋  
権利者: 北海道大学

種類：特願  
番号：2007-133705  
出願年月日：2007/05/21  
国内外の別：国内

名称：シアリダーゼ阻害剤  
発明者：西村紳一郎、比能 洋  
権利者：北海道大学  
種類：特願  
番号：2007-158635  
出願年月日：2007/06/15  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/search/jouhou/hino.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

比能 洋 (HINOU HIROSHI)  
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教  
研究者番号：70333333

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし