

令和元年6月13日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16640

研究課題名(和文)細胞間相互作用を可視化する糖修飾蛍光プローブのin silico探索と合成

研究課題名(英文)Development of fluorescent turn-on probes for lectins to study cell-cell interactions

研究代表者

金森 功史(Kanamori, Takashi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：90633446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖鎖を介した細胞同士の相互作用の解明ための簡便なツール開発を目指し、糖鎖受容体に結合した際のみ蛍光を示すプローブ開発を行った。本研究では、高粘度環境においてのみ分子内運動が抑制され蛍光を示す蛍光性分子ローターを用いた。蛍光性分子ローターを用いたプローブは無洗浄で使用できるため汎用プローブとなり得るが、タンパク質への結合に伴う微小な環境変化を蛍光応答に反映することが難しい。そこで、プローブをライブラリー化し、ライブラリーから高い蛍光応答を示すプローブを選別する手法を開発した。さらに得られたプローブの基本骨格に対して、in silicoスクリーニングを用いたプローブ探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間内において、蛍光応答を用いたスクリーニングによる標的レクチンに結合して蛍光を示すturn-on型蛍光プローブの探索法の開発に成功した。蛍光性分子ローターを用いたプローブは、標的結合時にのみ強い蛍光を示すため洗浄不要であり、原理的に細胞外のみならず細胞内のタンパク質検出にも使用可能な有用なプローブである。これまでの研究では、十分な蛍光応答を示す標的タンパク質は限られていたが、本手法を活用することで、リガンドとの結合力が弱いタンパク質に対してもプローブを設計できることが示された。さらなる手法の改善は必要であるが、今後生命現象に関わる多数のタンパク質の機能解析に応用可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：Interactions between lectins and saccharides play important roles during cell-cell interactions. For example, interactions between selectins and sialyl Lewis X (SLeX) participate in metastasis. Therefore, detection methods for these saccharides-related interactions are required.

We designed carbohydrate-modified fluorescent turn-on probes bearing green fluorescent protein (GFP) dye derivatives, which are known as fluorescent molecular rotor. One of the problems of development of fluorescent probe with fluorescent molecular rotor is low fluorescence response upon the binding to target protein. This is because microenvironmental changes upon the binding is too small to induce the fluorescence enhancement.

To overcome this limitation, we developed screening method of probes from probe library containing GFP dye derivatives. Further, to enhance the selectivity and affinity to the target protein, we performed docking simulations and selected the suitable residues to be installed to probes.

研究分野：生物有機化学、光化学

キーワード：蛍光プローブ 蛍光性分子ローター スクリーニング レクチン in silico ドッキングシミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

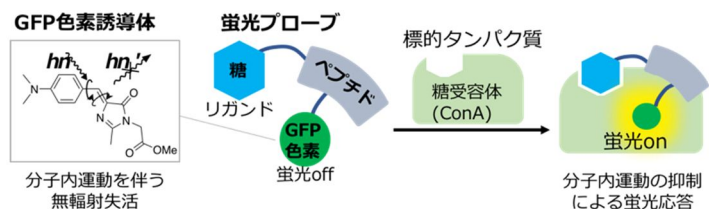
細胞表層の糖鎖は他の細胞と糖鎖受容体（レクチン）を介して相互作用しており、様々な生命現象に関わっていることが知られている。そのため、糖鎖とレクチンの相互作用が明らかになれば、疾患の原因解明や糖鎖受容体の阻害剤開発等につながると期待されている。近年では、特定のがん細胞の表層に高発現する糖鎖（Sialyl Lewis X、A など）が、がんの転移に関与することが明らかになりつつある。また、米国において糖鎖受容体の一つであるセレクチンの阻害剤（リビパンセル）が第3相臨床試験に進むなど、糖鎖-レクチン相互作用に基づく医薬品開発研究や基礎研究が進んでいる。このような研究を支える基盤技術として、これまでに糖鎖とレクチンの相互作用を調べる手法が多数報告されてきた。本研究では先述の研究を加速させるため、非常に簡便かつ汎用性の高いレクチン検出プローブの開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖鎖を介した細胞同士の相互作用（例えば、がん細胞の転移の際など）の解明のための簡便なツール開発を目指し、糖鎖受容体に結合すると蛍光を示し、離れると消光する蛍光プローブの開発を行った。これらのプローブを用いることで、細胞同士の相互作用の際の糖鎖-レクチン相互作用の追跡や、糖鎖受容体の阻害剤探索が容易になる。また、後述するように洗浄不要であるため、原理的に細胞内外問わず使用できる技術になると考えられる。

蛍光プローブに用いられる蛍光分子には、様々な環境に応答して蛍光波長や蛍光強度を変化させるものが知られている。これらの中でも、周囲の粘度環境に応答して蛍光強度を増大させる蛍光性分子ローターが知られている。これらの蛍光分子は、通常の水溶液などの環境下においては、励起状態において分子内回転などの無輻射失活等を経て蛍光を示さないが、高粘度環境において分子内運動が抑制されると蛍光を示す性質がある。これまでにいくつかの例において、蛍光性分子ローターを受容体などのタンパク質のリガンドに導入し、標的タンパク質との結合に伴って蛍光強度の増大を示すプローブが報告されている。これらのプローブは、サンプルに添加して蛍光測定するだけという非常に簡便な操作で検出できる。また、標的との結合前は無（弱）蛍光であるため、原理的には洗浄を必要とせず、リガンドとタンパク質の相互作用が弱い場合にも洗浄による流失の懸念がない。さらに、洗浄が困難な細胞内で検出が可能になるなどの利点があり、汎用性の高い有用なプローブとなり得る。しかし、リガンドとタンパク質の結合に伴う環境変化は微小である場合が多く、特に基質結合部位がタンパク質表面にある場合などは、蛍光応答比が小さい傾向にあり、蛍光応答に優れたプローブ開発の課題となっている。

そこで本研究では、この課題解決を目指した。すなわち、右図に示すように、蛍光性分子ローターとして GFP 色素誘導体を用い、この色素とリガンドとペプチドを含むプローブをライブラリー化し、ライブラリーの中から高い蛍光応答を示すプローブを選別することを考えた。さらに得られたプローブの基本骨格に対して、*in silico* スクリーニングを用いたプローブ探索を行って親和性を高めることで、蛍光応答の優れたプローブ開発を目指した。



今回標的とするレクチンについては多くの構造的知見があり、これらの糖認識ドメインに結合する糖修飾蛍光プローブの開発を行う。最終的にはセレクチンに対するプローブを開発し生細胞を用いてがんの転移機構解明を目指す。

今回標的とするレクチンについては多くの構造的知見があり、これらの糖認識ドメインに結合する糖修飾蛍光プローブの開発を行う。最終的にはセレクチンに対するプローブを開発し生細胞を用いてがんの転移機構解明を目指す。

## 3. 研究の方法

標的レクチンに結合して蛍光を示すプローブを開発するため、大きく以下の2つのアプローチに基づいて研究を行った。

(1) 蛍光応答を利用したプローブライブラリーからのプローブ探索

(2) *in silico* によるプローブ設計

まず(1)では、プローブライブラリーを合成し、蛍光プレートリーダーを用いた蛍光応答の評価により、標的に結合した際に強い蛍光応答を示すプローブの探索法の開発を試みた。

つづいて(2)では、標的レクチンに対する選択性ならびに結合力を向上させ蛍光応答を高めるため、(1)で得られた蛍光プローブに適切なフラグメント（低分子化合物）を導入することを目指した。導入するフラグメントの構造を決定するため、*in silico* による探索を行った。そこで、本研究の標的レクチンであるセレクチンの結晶構造に対して、トリペプチドやバッチャル化合物データベースの化合物のドッキングシミュレーションを行った。

最後に、プローブに用いる糖ユニットの基本骨格として有用な分子を探索するため、所属する研究室にて保有する糖誘導体の化合物群を用い、レクチンに結合する化合物の探索を行った。

#### 4. 研究成果

##### 【蛍光プローブライブラリーの探索法】

蛍光性分子ローターを用いた蛍光プローブの蛍光応答の向上を目指し、標的タンパク質のリガンドと蛍光性分子ローターを組み込んだプローブライブラリーの中から、良好な蛍光応答を示すプローブを探索する手法の開発に取り組んだ。

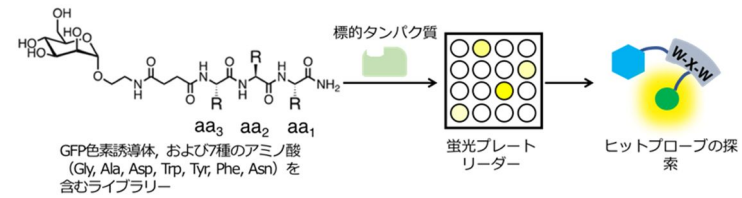
まず、モデル標的レクチンとしてコンカナバリン A (ConA) を用い、本コンセプトの実証を試みた。

まず、上図に示すように  $\alpha$ -マンドシドにリンカーを介してトリペプチドを導入したプローブを設計した。アミノ酸部位を種々変更し、ライブラリー化することとした。固相合成したプローブを切り出し、レクチンを添加した際の蛍光応答を調べ、高い蛍光応答を示すプローブを選択することとした。

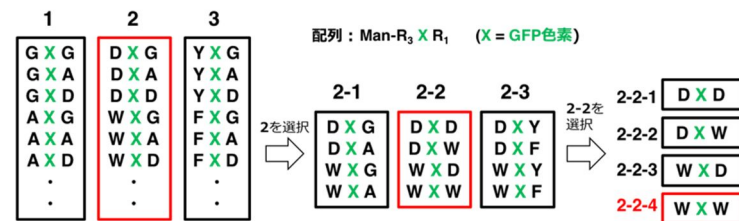
高い蛍光応答を示すプローブのアミノ酸配列を決定する方法として、右図に示すように、コンビナトリアルケミストリーにおけるリガンド探索に用いられるデコンボリューション法を応用した。例えば、 $R_3$  と  $R_1$  の位置に導入するアミノ酸配列を決定する場合、 $R_3$  を 2 種類に固定し、 $R_1$  を種々のアミノ酸の混合配列とした 3 つのグループを作成し、それぞれ 3 つのグループについて混合物のまま蛍光応答を測定し、高い蛍光応答を示すグループを選択する (上図ではグループ 2 を選択)。つづいて、 $R_3$  残基はそのまま、 $R_1$  残基を絞り込んだ 3 つのグループを作成し、蛍光応答を測定し、高い蛍光応答を示すグループを選択する (上図ではグループ 2-2 を選択)。最後に、絞り込まれた配列を全て合成し、配列を決定するという流れである。

このスクリーニングの際の蛍光応答評価の結果を右に示す。デコンボリューションを 3 回行ったところ、最終的に ConA 存在下で約 6 倍の蛍光強度の増大を示す Man-WXW (X は GFP 色素誘導体) を見出し、本コンセプトを実証することができた。

##### 蛍光応答によるプローブスクリーニング法



##### デコンボリューション法を用いた蛍光応答の優れたプローブの配列決定

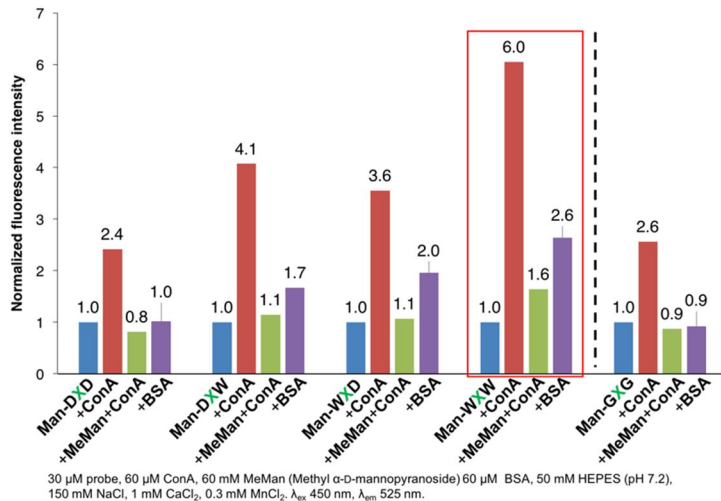


アミノ酸の混合配列とした 3 つのグループを作成し、それぞれ 3 つのグループについて混合物のまま蛍光応答を測定し、高い蛍光応答を示すグループを選択する (上図ではグループ 2 を選択)。

つづいて、 $R_3$  残基はそのまま、 $R_1$  残基を絞り込んだ 3 つのグループを作成し、蛍光応答を測定し、高い蛍光応答を示すグループを選択する (上図ではグループ 2-2 を選択)。

最後に、絞り込まれた配列を全て合成し、配列を決定するという流れである。

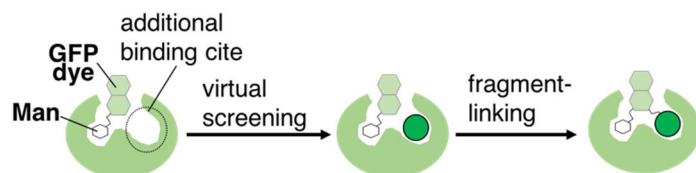
蛍光応答によるプローブのスクリーニング結果 (デコンボリューション3回目)



##### 【蛍光プローブの *in silico* 探索法】

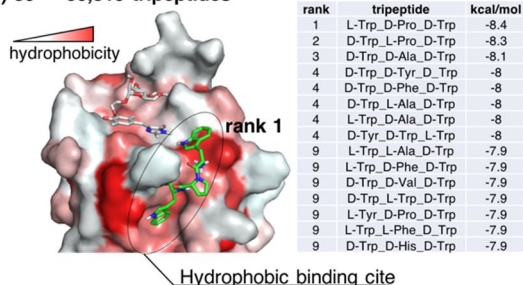
つづいて、セレクチンに結合して蛍光を示すプローブの開発を目指し、セレクチンとそのリガンドとなる糖鎖の共結晶構造の情報を用いてドッキングシミュレーションによるプローブ設計を試みた。本手法の概念を右上図に示す。過去のセレクチンに対する阻害剤の研究から、シアリルルイス X のフコース部位をマンノース誘導体に置換した阻害剤が良好な阻害能を示すことが知られている (Kogan et al, 1995, *J. Med. Chem.*, Wong et al. 1996, *J. Am. Chem. Soc.* など)。

そこで、本研究でも合成容易なマンノースを基質のコアとして用い、GFP 色素誘導体を

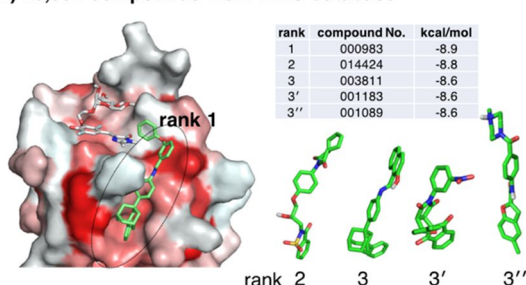




### 1) 39<sup>3</sup> = 59,319 tripeptides



### 2) 20,564 compounds from ZINC database



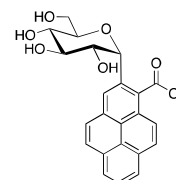
つないでプローブの基本骨格とした。さらに、セレクチンの糖認識ドメイン (CRD) 周辺においてドッキングシミュレーションを行い、プローブに導入する残基の探索を行った。ドッキングに用いたバーチャル化合物として、光学異性体を含む 39 種類のアミノ酸からなるトリペプチド約 6 万化合物を用意した。また、ZINC データベースから約 2 万化合物を用いた。

これらのバーチャル化合物を用いたドッキングの結果、上図に示すように、セレクチンの CRD 近傍において、疎水性の高いポケットに、トリプトファンやプロリンを含むトリペプチド等や芳香族性のフラグメント化合物が相互作用し得ることが示された。

今後は、マンノース-GFP 色素誘導体に対して (2) で得られたフラグメントを導入して結合能および選択性を高めたプローブを開発していく予定である。また、必要に応じて (1) のプローブライブラリーの探索法により、セレクチンに対する蛍光プローブの基本骨格を決定し、さらに (2) の手法を駆使してプローブ開発を進める予定である。

#### 【合成糖誘導体を用いたプローブ探索】

上述の 2 つのスクリーニング法に加え、所属する研究室で合成を行っている種々の糖誘導体についても、プローブの基本骨格になり得る分子の探索を行った。その結果、右図に示すピレンを導入した C-グルコシドが ConA に結合し得ることが分かった ( $K_d$  24  $\mu$ M)。これらの知見も合わせて、今後プローブの基本骨格の開発に活用していく予定である。



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kanamori, T.; Matsuyama, A.; Naito, H.; Tsuga, Y.; Ozako, Y.; Ogura, S. I.; Okazaki, S.; Yuasa, H., Water-Soluble Glucosyl Pyrene Photosensitizers: An Intramolecularly Synthesized 2-C-Glucoside and an O-Glucoside, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 13765-13775. 査読有 (DOI: 10.1021/acs.joc.8b0206).

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Takashi Kanamori, Takayuki Tsuzuki, Hideya Yuasa. Synthesis and fluorescence properties of GFP dye derivatives, benzylidene imidazolinone derivatives, 日本化学会 第 99 春季年会(2019), Mar. 2019.
2. 續木 貴之, 金森 功史, 稲田宏太郎, 湯浅 英哉. GFP 色素誘導体を用いたコンカナバリン A に対する turn-on 型蛍光センサーの合成と蛍光特性評価, 日本化学会 第 99 春季年会(2019), Mar. 2019.
3. 金森 功史. 緑色蛍光タンパク質の色素誘導体を用いた糖鎖受容体の turn-on 型蛍光プローブ, 第一回 糖化学フォーラム, Mar. 2018. (招待講演)
4. 稲田宏太郎, 金森功史, 大窪章寛, 小倉俊一郎, 湯浅英哉. GFP 色素誘導体を用いた糖鎖受容体の turn-on 型蛍光プローブの設計と合成, 日本化学会第 98 春季年会, Mar. 2018.
5. 金森功史, 松山央, 小倉俊一郎, 岡崎茂俊, 湯浅英哉. 光増感剤応用を指向した水溶性グルコシルピレン: 分子内グリコシル化反応を利用した 2-C-グルコシドおよび O-グルコシド, GlycoTOKYO2018 シンポジウム, Dec. 2018.
6. 金森功史, 松山央, 内藤秀則, 尾迫佳樹, 小倉俊一郎, 湯浅英哉. ピレン C-グリコシド誘導体の合成と光増感剤への応用, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, Sep. 2017.
7. 松山 央, 金森 功史, 湯浅 英哉. Synthesis of water soluble C-glycosylated pyrene complexes by intramolecular C-glycosylation, 日本化学会 第 97 春季年会(2017), Mar. 2017.
8. Takashi Kanamori, Satoshi Kuwabara, Shun-ichi Ogura, Akihiro Ohkubo, Hideya Yuasa.

In silico screening and synthesis of carbohydrate-modified fluorescent probes for the detection of selectins, 日本化学会 第 97 春季年会(2017), Mar. 2017.

〔その他〕

ホームページ等

[http://t2r2.star.titech.ac.jp/cgi-bin/researcherinfo.cgi?q\\_researcher\\_content\\_number=CTT100516778](http://t2r2.star.titech.ac.jp/cgi-bin/researcherinfo.cgi?q_researcher_content_number=CTT100516778)

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。