

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05925

研究課題名(和文) 蛍光分子の2段階成熟による環境応答性センサー型分子の取得

研究課題名(英文) Development of environment-responsive targeted molecules from fluorophore library via 2-step maturation

研究代表者

瀧 真清 (Taki, Masumi)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号：70362952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： Schiff塩基型の蛍光性低分子化合物ライブラリーを作製してセレクション(標的との結合試験)を行うことで、標的蛋白質と結合して疎水環境下に入ったときだけ蛍光を保持し、結合しなかった時には水中で加水分解すること蛍光を失う「keep-on型」結合体の概念を確立した。従来、Schiff塩基型の蛍光物質は「水中」で容易に加水分解して蛍光性を示さなくなるため、生体物質のセンシングには不向きと言われていたが、この性質を逆手に取ってこれを行い、速報論文としてまとめ、報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の環境応答性蛍光センサー型分子は、標的蛋白質に結合することで蛍光色が変わったり蛍光強度が上がったりする(Turn-onする)原理で作用していた。今回、センサー型分子に水分子と化学反応して蛍光を失うという性質を持たせ、標的蛋白質に結合しているときだけ水分子と反応せず蛍光性を保つ(Keep-onする)原理を着想した。本原理にて標的の蛍光検出を行うという発想はこれまでに無く、学術的に新しい。

研究成果の概要(英文)： A low-molecular-weight pharmacophore, as a targeted fluorophore, was selected from a dynamic combinatorial library of Schiff bases by using size-exclusion chromatography. The identified pharmacophore retained its fluorescence when bound to the hydrophobic site of the target, whereas it lost because of hydrolysis when unbound. We defined it as keep-on type fluorescence probe because the fluorescent pharmacophore is only kept intact when bound to the target (Y. Tabuchi, M. Taki, Anal. Bioanal. Chem. 410, 6713 (2018)).

研究分野：進化分子工学

キーワード： 蛍光センサー型分子 標的結合体 加水分解 ダイナミックコンビナトリアルライブラリー サイズ排除クロマトグラフィー ヒト血清アルブミン セレクション Schiff塩基

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。

1. 研究開始当初の背景

近年、進化分子工学的手法を用いて、治療 / 診断等の医療応用が可能な有用分子を創成する研究が盛んになっている (総説: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2015, 34 など)。申請者は、T7 フェージ上に提示させたランダム化させたライブラリーペプチドに人工分子を結合させ分子進化させる手法を開発し、人工分子の機能とペプチドの分子標的能とを併せ持たせたハイブリッド型分子の取得を行ってきた。このとき人工分子には、標的結合に関わり、なおかつ環境応答性蛍光を示すなどの人工機能を併せ持つよう分子設計しておく。これにより、人工機能を生かしつつ高い標的特異性を新たに付与させた分子を選択することが可能となる。具体例として、我々はこれまでに環境応答性の蛍光分子 Prodan (*JACS*, 1979, 3075) を人工分子として使い、その周辺ペプチド構造を分子進化により最適化することで、標的蛋白質 (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ; GST) に結合したときだけ蛍光色が黄色から青色に変わりつつ蛍光強度が顕著に増大する Turn-on 型蛍光センサー分子の取得を行ってきた (*Anal. Chem.*, 2016)。しかしながら、取得された何れの分子においても標的への結合力はそれほど強くないため ($K_D = \sim \mu\text{M}$)、応用に向けては更なる改善を要していた。センサー型分子の結合力が向上しない理由として、既存骨格の環境応答性蛍光分子では、その形や電荷が標的蛋白質に対して最適化されていない (実測 $K_D = \sim \text{mM}$) ため、ライブラリーペプチド部分を分子進化させても結合力がまだ不十分なためと考えた。

2. 研究の目的

高い標的特異性と強い結合力とを併せ持ち標的の即時検出が可能である環境応答性蛍光分子 (センサー型分子) を創成する技術を確認することを目的として、研究を行った。具体的にはまず、コンビナトリアル合成した蛍光分子ライブラリーの中から標的蛋白質と相互作用して蛍光変化するものを選択し、次に同蛍光分子を結合させた T7 フェージ提示ペプチドライブラリーを用いて蛍光分子の周辺構造を最適化することで、強固な結合力を持たせる ($K_D = \sim \text{nM}$)。つまり、スクリーニングによる「弱い」結合体の取得 (step 1) を行ったあと、ペプチド部分の分子進化によって「強い」結合体を取得する (step 2)。このことによって、強く特異的な結合に伴う色調変化がおこる Turn-on 型蛍光センサー分子へと分子進化させる。

3. 研究の方法

(1) 新規環境応答性蛍光分子のコンビナトリアル合成と標的に対するスクリーニング (step 1)

新規環境応答性蛍光分子ライブラリーを網羅的に迅速合成する。

各化合物における環境応答性の有無を確認する。

上記スクリーニングにおいて、明確な応答性が確認された化合物をプレパラティブスケールにて合成・精製し、同定する。

標的蛋白質に対して弱いながらも相互作用する環境応答性蛍光分子を、上記で精製したライブラリーの中からスクリーニングする。

(2) 選択された最適分子周辺ペプチドの分子進化 (step 2)

人工分子との反応点であるシステインを持つライブラリーペプチドと、上記 A) にて取得した蛍光分子とを結合させ、ハイブリッド分子ライブラリーとし、フェージディスプレイの要領で標的蛋白質 (GST) に対する蛍光センサー型分子の取得を試みる。

4. 研究成果

(1) Turn-on 型蛍光センサー分子取得の試み

ねじれ型分子内電荷移動 (TICT; twisted intramolecular charge transfer) 型の新規環

環境応答性蛍光分子ライブラリーをスズキカップリング反応にて網羅的に迅速合成した。次に、各化合物における環境応答性の有無を、緩衝溶液中で有機溶媒存在の有無にて蛍光応答性を示すかどうかスクリーニングすることで確認した。さらに上記スクリーニングにおいて明確な応答性が確認された化合物群を合成し、この中から標的蛋白質に対して弱いながらも相互作用する環境応答性蛍光分子を選択した。具体的には、標的に対してライブラリー化合物をそれぞれ作用させて、標的結合に伴う蛍光強度の増加や変色が見られる化合物を決定して最適分子（ヒット化合物）とした。

次に、上記ヒット化合物分子の持つカルボニル炭素に対して隣の位置（= α 位）を反応起点として Br 基を導入して誘導体化したのち、T7 フェージ上に提示させたライブラリーペプチドと混合してハイブリッド分子ライブラリーとした。これを磁性ビーズ上に固定化した標的蛋白質に作用させ、フェージディスプレイ法の要領にて 5 ラウンドのバイオパニングを行って標的結合分子を濃縮させたのち、DNA シーケンサーにて遺伝情報を解読した。このことで、ランダム化させているペプチド部分のアミノ酸配列を決定した。

さらに、上記ペプチドを化学合成したのち、システイン残基特異的に上記ヒット化合物を共有結合させたものを精製し、LC-MS/MS 測定等により同定した。これを用いて蛍光測定を行うことで、上記の化合物が標的以外の蛋白質には結合せず、標的蛋白質に結合する際にのみ蛍光応答するかどうかを検討した。その結果、予期していた蛍光応答自体は観察できたものの、結合特異性および結合力の両面において当初期待していた数値をクリアすることができなかつたため、ここまでの知見をもとに以下のアプローチに切り替えて研究を行った。

(2) Keep-on 型蛍光センサー分子取得の試み

新規環境応答性蛍光分子ライブラリーのコンビナトリアル合成および標的に対するスクリーニングを次のように改めて行った。まず、標的結合性蛍光分子の構造にシッフ塩基を採用することにより、あえて加水分解するように設計をした蛍光分子ライブラリーを作製した。これにより蛍光分子が標的蛋白質と結合する時のみ疎水性環境下に入ることにより加水分解から逃れ蛍光性を維持(Keep-on)し、結合しない時には加水分解され蛍光を失う特性を持たせた。次に、本ライブラリーをモデル標的蛋白質であるヒト血清アルブミン（HSA）と混合したのち、サイズ排除クロマトグラフィーにより、HSA と結合した蛍光分子群を選択した。更に、各々の化合物をフォトダイオードアレイ付き LC-MS/MS にて分離・同定したのち、HSA と結合したときのみ Keep-on 蛍光性をもつ結合体を得ることに成功し、速報誌にまとめて発表を行った (*Anal. Bioanal. Chem.* (2018))。本結合体は、ウシ血清アルブミン（BSA）にも結合可能であるが、蛍光色調の違いにより HSA と BSA との区別が可能である。

現状での蛍光センサー分子取得の課題：

上記シッフ塩基構造を有する Keep-on 型蛍光分子ライブラリーを用いて、HSA 以外の数種類の蛋白質および核酸（具体的には種々の tRNA やアプタマー）に対してそれぞれサイズ排除クロマトグラフィーに（SEC）による選択実験（セレクション）を同様に行ったところ、濃縮は認められなかった。ライブラリー化合物の基本構造および多様性に問題があると考え、分子構造を 3 次元的に拡張したシッフ塩基型ライブラリーを作製し直して同じ実験を行った。その結果、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を標的蛋白質として用いたときに、frequent hitter 型の分子構造 (*J. Med. Chem.*, 1205 (2015)) を持つ化合物が優先的に濃縮されることを、LC-MS/MS 測定により確認した。また別の課題として、一連のライブラリーを蛋白質に作用させたときに蛋白質の変性や凝集沈殿を起こす場合があることも実験的にしばしば認められた。従って現時点では、疎水性の高い分子ライブラリーを中心構造として用いて分子進化を行うことを断念し、代わりに親水性構造をライブラリーとして使用し、その骨格延長を行う方向性での分子進化に注力している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tabuchi Yudai, Taki Masumi	4. 巻 410
2. 論文標題 Fluorescent "keep-on" type pharmacophore obtained from dynamic combinatorial library of Schiff bases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6713 ~ 6717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00216-018-1303-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田淵 雄大・谷田部 和貴・瀧 真清
2. 発表標題 加水分解型蛍光分子を用いた蛋白質検出法の開発
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masumi Taki
2. 発表標題 Turn-on / keep-on fluorescent molecules as targeted binders
3. 学会等名 The third international workshop on symbiosis of biology and nanodevices (JSPS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yudai Tabuchi and Masumi Taki
2. 発表標題 Fluorescent "keep-on" type pharmacophore obtained from dynamic combinatorial library of Schiff bases
3. 学会等名 International Symposium on Dyes & Pigments (Elsevier) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----