

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19193

研究課題名(和文)生物個体の特定環境部位での代謝反応解析を目指した分子プローブの開発

研究課題名(英文) Development of molecular probes for metabolic reaction analysis at specific environmental sites in vivo

研究代表者

野中 洋 (Nonaka, Hiroshi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師

研究者番号：80579269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：特定の環境での代謝反応を高選択的に得ることを目指した分子設計コンセプトに基づき、本研究では生体内での疾患関連環境として過酸化水素、疾患関連代謝酵素としてグルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)を選択し、それら両者が揃った条件でシグナルを生じる分子プローブBCGAを設計・合成・評価した。BCGAは過酸化水素とGGTの共存条件においてのみOFF/ON型の蛍光シグナルを発し、どちらか一方でも存在しない条件では蛍光は見られなかった。以上より、BCGAがANDロジックゲート型プローブとして機能する事を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、化学的な工夫を埋め込んだ人工的な代謝物を利用して、特定の環境での代謝反応を高選択的に得る手法の開発を目指した。生物内での特定の環境での代謝反応を解析できることは、特定代謝反応の理解・未知メカニズムの解明への貢献や、病気から起こる特定代謝異常を察知する早期診断・治療法選択への応用が期待される。本研究では、コンセプトモデルとして、過酸化水素とGGTという酵素が存在する条件で蛍光を発する分子センサーを提案した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to obtain the information about metabolic reactions in a specific environment high selectively. Hydrogen peroxide was selected as the disease-related environment in vivo, and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) was selected as the disease-related metabolic enzyme. We designed, synthesized, and evaluated a molecular probe BCGA that showed a signal under the condition that both of them were aligned. BCGA showed OFF/ON type fluorescence signal only in the coexistence condition of hydrogen peroxide and GGT, and no fluorescence was observed in the condition where either one did not exist. From these results, it has been confirmed that BCGA functions as an AND logic gate type probe.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：人工代謝物 分子プローブ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体は分子が集まり、細胞や組織を構成し、機能を発現している。その生体では代謝と呼ばれる酵素・化学反応によって、エネルギー産生・シグナル伝達などの恒常性を維持している。代謝反応は、私たち生体機能と密接に関わっているため、代謝異常により疾患になることもあれば、疾患の結果として代謝に変動が生じる事もある。こういった代謝反応を血や尿を利用して解析する液体生検検査からは、生体機能の異常からくる代謝物の変動を知る上で重要な情報を得ることができる。しかし、この代謝物の変動は異常部位からでなく正常な部位からの通常の代謝物も含んでいるため、全体としての代謝物変動は小さいものが多い。また、変動がこういった部位・環境の異常に由来するものか、解析することは困難という問題があった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、化学的な工夫を埋め込んだ人工的な代謝物を利用して、特定の部位（環境）での代謝反応を高選択的に得る手法の開発である。生物個体における特定の環境での代謝反応を解析できることは、特定代謝反応の理解・未知メカニズムの解明への貢献や、疾患に起因する特定代謝異常を察知する早期診断・治療法選択への応用が期待される。また、特定の部位（環境）での代謝反応に応答する仕組みは、薬剤の放出系への応用などの展開も期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究では、特定の部位（環境）での代謝反応を高選択的に得ることを目指した。具体的には、どのような部位（環境）で起こった代謝反応なのかを明らかにできる工夫として、分子ロジックゲートを用いることにした。ロジックゲートの選択条件には、特定の環境（腫瘍の低酸素・低 pH、活性酸素種、発現に部位局在がみられる酵素、濃度勾配が生じる箇所）と、特定代謝酵素などの2条件以上を用い、複数条件が満たされるときのみ代謝される AND 型ロジックゲート人工代謝物（分子プローブ）を目指した。

### 4. 研究成果

特定の部位（環境）での代謝反応を検出するために本研究では AND ロジックゲートを分子に組み込む戦略を取った(図1)。AND ロジックゲートとは、2つの条件が満たされる時にシグナルを発する論理演算子である。これに基づき、生体内で局在化や発現量の変化が見られる疾患関連代謝酵素と疾患関連環境の、この両者が共存する条件でのみ反応が進行する分子の設計を試みた。

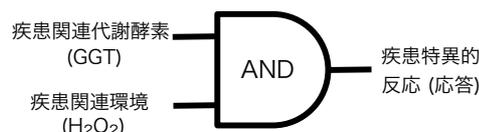


図1. 本研究での AND ロジックゲート 疾患関連代謝酵素 (GGT) と疾患関連環境 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) が両者とも存在する際に応答する。

今回、分子設計にあたり、疾患環境として

炎症やがんなどに関連する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を設定した。またある種のがんで発現量の増加が見られる酵素として、 $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) を設定した。GGT は  $\gamma$ -グルタミル部位を認識し、特に  $\alpha$  アミノ基と  $\alpha$  カルボキシ基を強く認識することが知られている。このことから、 $\gamma$ -グルタミル部位の  $\alpha$  アミノ基を保護 (マスク) し、保護基に疾患環境に応答した脱保護機構を組み込むことで、疾患環境に応答した GGT 酵素反応の OFF/ON 調節が可能であると考えた。

今回の疾患環境標的である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に応答する保護基として、フェニルボロン酸誘導体を保護基に選択した。<sup>1,2</sup> この基は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応すると、ヒドロホウ素化、キノンメチド開裂反応、脱炭酸脱離することが知られている。以上をもとに、Boronate caged Glu-AMC (BCGA) を設計した(図2)。BCGA はグルタミン酸  $\alpha$  アミノ基が保護されているため GGT に認識されないが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下で脱離反応すると、 $\alpha$  アミノ基が露出するため GGT に認識される。<sup>3</sup> そして GGT がグルタミン酸  $\gamma$  位のアミド結合を加水分解し、蛍光分子である 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) が放出される。これを解析することで、疾患関連環境 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> がある部位での疾患関連代謝酵素 GGT の活性を検出できると期待した。

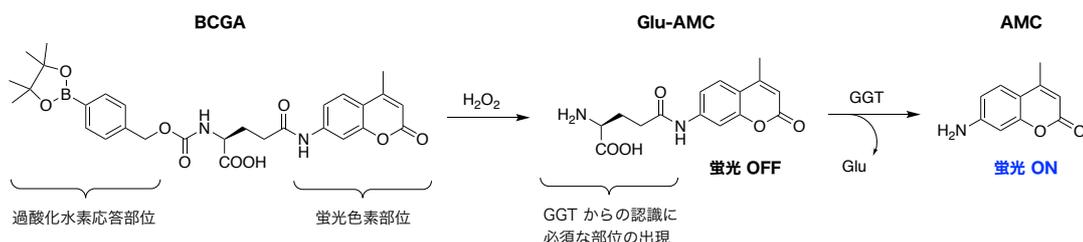


図2. 過酸化水素応答部位を N 末保護基にもつ GGT 蛍光プローブ (BCGA) の概要

BCGA に対し  $\text{H}_2\text{O}_2$ ・GGT 共存下で蛍光スペクトル (励起波長 = 380 nm) を測定すると、AMC の極大蛍光波長である 440 nm の蛍光強度が大幅に増大することを確認した (図 3)。評価後のサンプルを HPLC により解析し、生成物は確かに AMC であることを確認した。一方、 $\text{H}_2\text{O}_2$ ・GGT の両者、あるいは、どちらか一方でも存在しない条件では蛍光増大は見られなかった。したがって BCGA は  $\text{H}_2\text{O}_2$  と GGT の共存状態の検出を可能にすることが分かった。

次に、BCGA の反応速度に関する知見を得るために速度定数の解析を行なった。BCGA に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加した際の UV-Vis スペクトル測定と、GGT と Glu-AMC の蛍光スペクトルの経時変化測定により行った。その結果、BCGA から AMC が生成するまでの二段階の反応のうち、一段階目の速度定数は  $7.7 \times 10^{-2} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ 、二段階目は  $9.8 \times 10^3 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$  であった。これより一段階目が律速であることが分かった。第一段階が律速であるため、 $\text{H}_2\text{O}_2$ ・GGT 共存下で Glu-AMC は速やかに AMC へ加水分解されることが期待される。

特定の部位 (環境) での代謝反応を高選択的に得ることを目指した分子設計コンセプトに基づき、本研究では生体内での疾患関連環境として  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、疾患関連代謝酵素として GGT を選択し、それら両者が揃った条件でシグナルを生じる分子プローブ BCGA を設計・合成・評価した。BCGA は  $\text{H}_2\text{O}_2$  と GGT の共存条件においてのみ OFF/ON 型の蛍光シグナルを発生し、どちらか一方でも存在しない条件では蛍光は見られなかった。以上より、BCGA が AND ロジックゲート型プローブとして機能する事を確認できた。

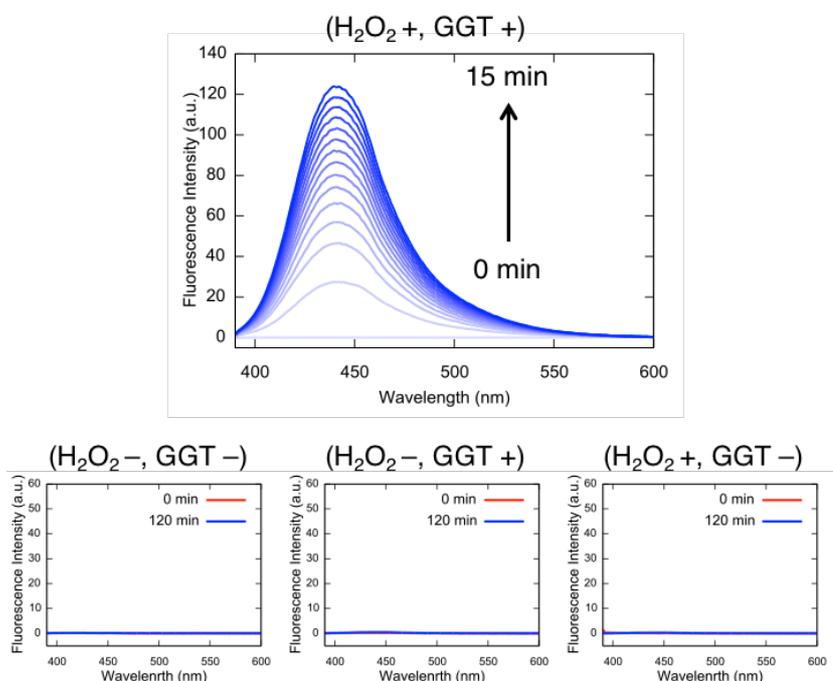


図 3. 過酸化水素や GGT 共存条件下での BCGA の蛍光スペクトル変化  
BCGA 1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ , GGT 0.4 Unit, 100 mM リン酸緩衝液,  
37  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  との事前インキュベート 10 min, 励起波長 = 380 nm

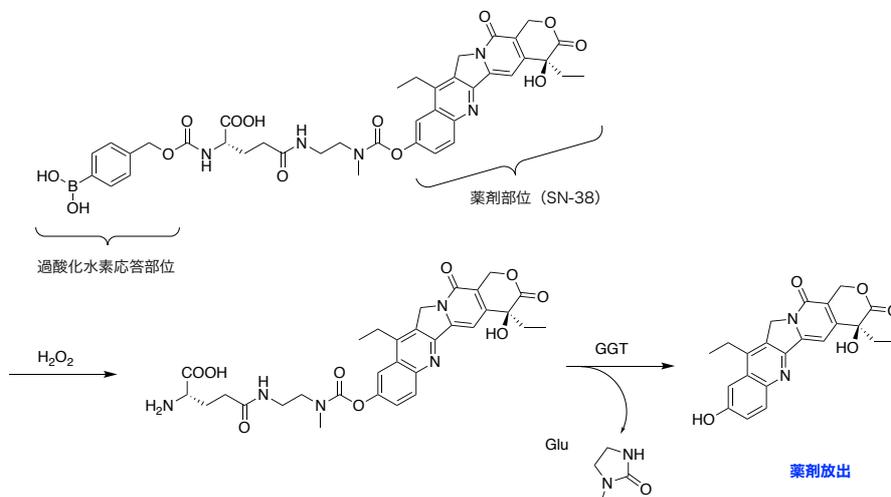


図 4. 蛍光色素の代わりに薬剤部位を導入したロジックゲート型プローブ

この検出に関する成果を元に、AND ロジックゲート型プローブの応用として、蛍光色素部位の代わりに薬剤部位 SN-38 (トポイソメラーゼ I 阻害剤：抗悪性腫瘍薬) を含む分子の開発を目指した (図 4)。疾患関連環境と疾患関連酵素の両者が存在する際に、機能を発揮するプロドラッグとしての応用を期待した。BCGA の際と同様に、GGT の基質認識に重要なグルタミン酸のアミノ基を酸化刺激応答性のフェニルボロン酸を含む官能基によりマスクし、GGT の反応前後で細胞毒性を発揮することが期待できる薬剤 (SN-38) を放出するように設計した。

合成は、SN-38 を出発原料に 2 ステップで合成した活性カーボネートと、Fmoc-Glu-OtBu を出発原料に 4 ステップで合成したものとを混ぜ合成した。(図 5)。

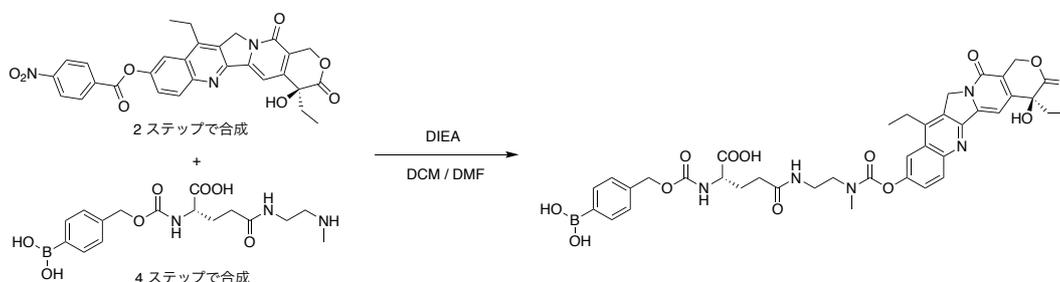


図 5. 薬剤部位を導入したロジックゲート型プローブの合成概略

実際に、GGT 発現量の多いがん細胞に対して、過酸化酸素の有無で酸化刺激を加えたものの、十分な応答差を確認できなかった。過酸化水素を分解する酵素カタラーゼを添加した条件では、過酸化酸素の有で酸化刺激を加えた細胞とで、細胞生存率に差が見られたことから、細胞が定常的に産生している過酸化水素に反応しているものと考察している。

グルタミン酸の N 末を保護することは、代謝酵素 GGT の基質認識の抑制に有効に作用していることから、将来的に N 末を適切な官能基で保護することで、本分子設計戦略は有効に作用する可能性はあると考えている。

#### 参考文献

- (1) Dickinson, B. C.; Chang, C. J. *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 504–511.
- (2) Lo, L.-C.; Chu, C.-Y. *Chem. Commun.* 2003, 39, 2728–2729.
- (3) Terzyan, S. S. et al. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 17576–17586.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sandolab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：山東信介

ローマ字氏名：SHINSUKE SANDO

※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。