

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05352

研究課題名（和文）糖鎖受容体のturn-on型蛍光プローブの開発手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of development method for fluorescent turn-on probes for lectins

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、糖鎖受容体を始めとする受容体などの非酵素タンパク質へ適用可能なturn-on型蛍光プローブの効率的探索法の開発を行った。鍵となる蛍光色素として、GFPを構成するGFP色素に着目した。このものは、励起状態でねじれて消光する性質があるが、ねじれないように拘束されると蛍光シグナルを得られる。種々の標的タンパク質に適用可能な蛍光プローブを開発するため、本研究では系統的に構造を変化させた多数のGFP色素誘導体の開発を行った。さらに、ドッキングシミュレーションと組み合わせることで、標的タンパク質との結合能を向上させ高い蛍光応答を示す誘導体を探索することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞同士のコミュニケーションに関わる受容体や細胞内外への物質輸送に関わる輸送体タンパク質を、細胞に振りかけて光を当てただけで簡単に検出できる、turn-on型蛍光プローブの開発を行った。とくに、コンピュータシミュレーションの手法も取り入れ、がん細胞に過剰に存在するグルコースを輸送するタンパク質を簡単に蛍光検出できるturn-on型蛍光プローブの開発に成功した。今後は本手法を適用して他の受容体タンパク質等を検出できる蛍光プローブ開発を進めていく予定である。これらの技術は、受容体等の関わる生命現象を調べるツールとしての応用や、疾患の診断法への応用、医薬品開発の加速が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed an efficient search method for turn-on type fluorescent probes that can be applied to non-enzyme proteins such as glycan receptors and other receptors. As a key fluorescent dye, we focused on the GFP dye that constitutes GFP. The GFP dye has a quenching property in the excited state with twisting motion, but can produce a fluorescent signal by constraining the twisting. In order to develop fluorescent probes applicable to various target proteins, we have developed a number of GFP dye derivatives with systematically altered structures. In addition, by combining docking simulations, we succeeded in searching for derivatives with enhanced binding to the target protein and high fluorescence response.

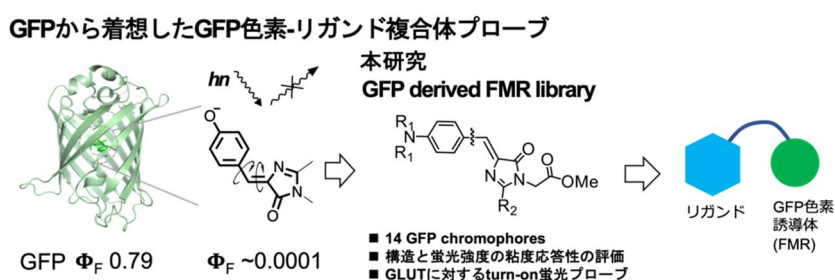
研究分野：生物有機化学

キーワード：蛍光プローブ turn-on 受容体 GFP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は細胞膜上の受容体やトランスポーター等を介して外界との情報伝達や物質のやりとりを行っている。その中でも、糖鎖と糖鎖受容体を介した細胞間相互作用は、様々な生命現象に関わっているが、糖鎖の複雑さや結合力の弱さ等の要因から未解明の点が多く残されている。また、これらの相互作用は疾患にも関わることから、これらの簡便な検出法は、その機能解明や疾患の治療薬開発、診断法等への応用が期待される。これまでに、その相互作用を調べる様々な手法が開発されてきたが、最近簡便な手法として、糖鎖受容体に結合して蛍光性に変化する単糖修飾 turn-on 型蛍光プローブが報告されている (Chem. Sci. 2016, 7, 6325-6329)。しかし、先行研究では蛍光応答の際に凝集体形成を必要とするなど、標的タンパク質に依存しない汎用性の高いプローブとは言い難い状況であった。一方、申請者は汎用性の高い turn-on 型蛍光プローブ開発を目指し、図に示すように、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の色素誘導体を用い、糖鎖受容体等のタンパク質に結合して蛍光性に変化するシンプルな turn-on 型蛍光プローブの開発を進めてきた。GFP 色素誘導体は、単量体で存在する場合は励起されても二重結合の異性化などの分子内回転運動などによって無輻射失活するが、GFP 内部のように分子内運動が抑制される環境下では蛍光としてエネルギーを放出する性質が知られている。このような環境は、高粘度環境やタンパク質に結合した状態でも再現できることから、標的タンパク質に対して、そのリガンドと GFP 色素のコンジュゲート型のプローブを適切に設計できれば、GFP 構造体の中で GFP 色素が拘束され蛍光を示すように、標的タンパク質へプローブが結合した際に turn-on 蛍光シグナルを得ることができると考えられる。



このコンセプトのもと、申請者は標的タンパク質として糖鎖受容体的一种であるコンカナバリン A (ConA) を選び、標的タンパク質に結合して蛍光強度が増加する turn-on 型蛍光プローブの開発を行ってきた。さらに、蛍光プローブと標的タンパク質との蛍光応答性の向上のため、種々のアミノ酸を導入した蛍光プローブライブラリーを合成し、デコンボリューション法による蛍光応答の優れたプローブの探索法を開発してきた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者の先行研究を発展させ、細胞イメージングに使用可能なレベルの高い蛍光応答を示す turn-on 型蛍光プローブ開発を行うため、以下の6つの研究を実施した。

まず(1) 標的タンパク質の構造に適合でき、かつ turn-on 蛍光特性に優れた色素を見出すため、種々の GFP 色素誘導体を合成し、構造-蛍光特性相関研究を行う。

(2) 色素の合理的な設計を目指し、種々の GFP 色素の励起状態計算を行い、構造と励起状態でのねじれやすさの関係を調べる。

(3) モデル糖鎖受容体として ConA を用いた検証実験を行う。

(4) 標的タンパク質への結合時に、より効果的に GFP 色素を拘束させるため、光親和性残基を導入した GFP 色素を合成し、標的タンパク質への共有結合形成による分子内回転の抑制を試みる。以上のアプローチで、糖鎖受容体を始めとする標的タンパク質へ適用可能な turn-on 型蛍光プローブ開発を行う。

また、研究を進める中で、グルコース修飾 turn-on 型蛍光プローブがグルコーストランスポーター (GLUT) に結合して蛍光を示す結果を得た。GLUT は種々のがん細胞において発現が亢進していることが知られており、バイオマーカーとしても期待されるタンパク質である。そこで(5) GLUT を標的とした turn-on 型蛍光プローブについても詳細に評価を行った。

また、以前から開発を行っていた電子供与基と吸引基を有するビフェニル化合物について、これらを用いた turn-on 型蛍光プローブ開発の際に、GLUT を経由してがん細胞にプローブが取り込まれることが明らかになった。そこで(6) ビフェニル-単糖複合体による GLUT を介した細胞取り込み特性についても詳細に評価した。

3. 研究の方法

前項目で記載した6つの項目に取り組むため、まず(1)については、過去の知見を取り入れた分子設計を行い、GFP 色素誘導体を合成し、グリセロールとメタノールの混合溶媒中での蛍光ス

ペクトルを測定し、蛍光強度の粘度応答性を評価した。

(2) 励起状態計算に関して、合成した GFP 色素誘導体について、東工大スパコン TSUBAME 3.0 上にて gaussian を用いて TD-DFT 計算を実施し、 S_0 および S_1 のねじれのポテンシャルエネルギー曲面を調べた。

(3) モデルタンパク質を用いた実験では、開発した GFP 色素誘導体を ConA のリガンドであるマンノースとコンジュゲートさせたプローブを合成し、蛍光プレートリーダーにて蛍光応答を評価した。

(4) 光親和性標識可能な残基を導入した GFP 色素の開発では、フェニルアジド骨格を導入した種々の GFP 色素誘導体を、モデル標的タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) を用いて蛍光応答を評価した。

(5) GLUT を標的にした turn-on 型蛍光プローブ開発では、種々の GFP 色素誘導体とグルコースとをペプチド鎖を用いてコンジュゲートさせ、合成した蛍光プローブをがん細胞に添加して蛍光顕微鏡にて観察した。

(6) ビフェニル骨格の色素を用いた GLUT 標的蛍光プローブ開発では、後述する粘度応答性の蛍光ビフェニル化合物とグルコース等の種々のコンジュゲート体を合成し、がん細胞に添加して蛍光顕微鏡にて細胞取り込みを調べた。

4. 研究成果

(1) GFP 色素誘導体の合成と蛍光強度の粘度応答性

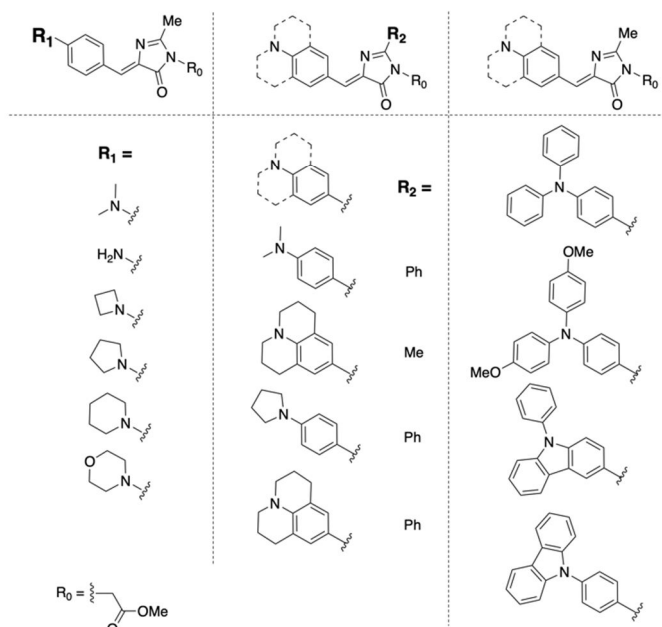
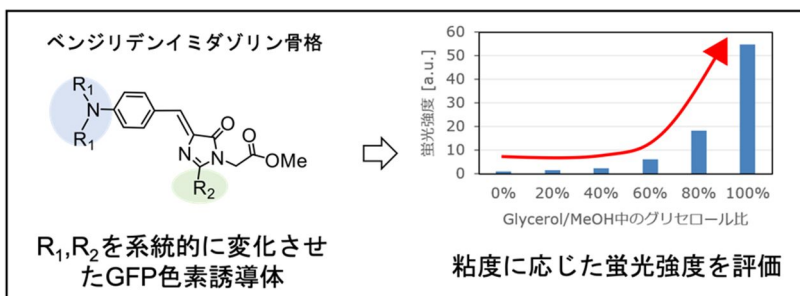
GFP 色素誘導体については、これまで多数の研究例がある。Baranov らの報告 (Chem. Eur. J., 2014, 20, 13234-13241) を参考に、アミノ基がねじれないよう固定された GFP 色素誘導体を合成し、蛍光強度の粘度応答性を調べた。

また、アミノ基を有する種々の蛍光分子について、そのアミノ基上の置換基をジメチル基やジエチル基から、種々の環状構造にすることで、大幅に蛍光量子収率 (Φ_F) が改善することが知られており (Nat. Methods, 2015, 12, 244-250)、一部の GFP 色素誘導体についても、蛍光量子収率の改善に成功している (Eur. J. Org. Chem. 2017, 5219-5224)。そこで、これらの知見を踏まえ、一連の GFP 色素誘導体を合成し、蛍光強度の粘度応答性を詳細に調べた。その結果、いずれの誘導体も低粘度溶媒であるメタノール中では Φ_F が 1% 未満であったが、高粘度溶媒であるグリセロール中では、ジメチルアミノ基を含む誘導体 (Φ_F 3%) から種々のアミノ基誘導体に変更することで、蛍光量子収率の系統的な上昇が見られた。特に、アミノ基と Ph 基間の回転を固定したジュロリジン骨格の GFP 色素誘導体では、図中 $R_2 = \text{Me}$ の場合で Φ_F 11% まで増加した。さらに、 R_2 に Ph 基を導入したジュロリジン誘導体においては、今回

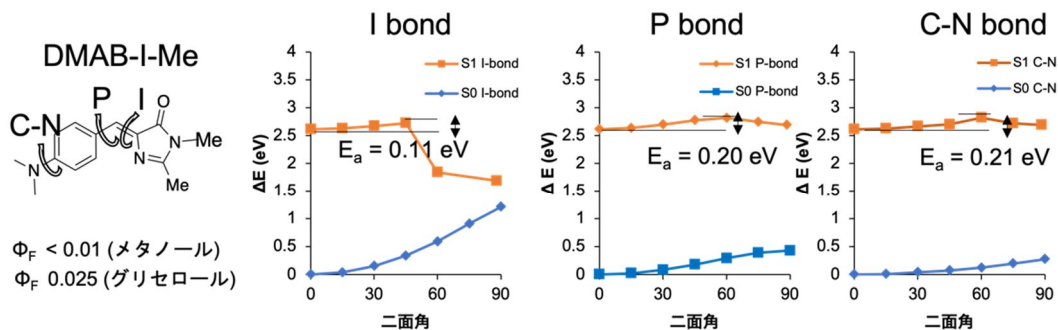
の化合物の中で最大の Φ_F 17% を示した。

(2) 励起状態計算の結果

合成した種々の GFP 色素誘導体の turn-on 蛍光特性と構造の関係を理解し更なる分子設計につなげるため、励起状態計算を行い GFP 色素誘導体の構造と励起状態でのねじれの関係を調べた。その結果、種々の誘導体の励起状態でのねじれの活性化障壁の違いや、GFP 色素誘導体のこれまで知られているねじれ位置 (二重結合部位) 以外でのねじれを示唆する結果も得た。代表的

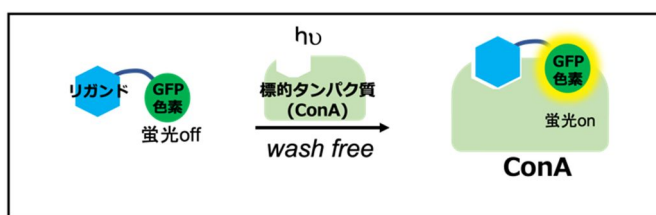


な結果として、ジメチルアミノ基誘導体についての結果を次頁に示す。これらの知見は、標的タンパク質結合時や非特異的な蛍光応答を調整する際の分子設計に重要である。

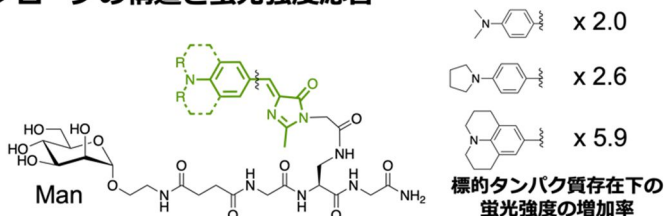


(3) ConA に対する turn-on 蛍光プローブ

申請者はこれまでに、標的レクチンに結合して蛍光応答を示す蛍光プローブを探索する手法として、プローブライブラリーから探索する手法の開発に成功している。一方で、これまでの標的レクチン存在下での蛍光応答比は種々のアミノ酸残基を導入したプローブを用いても最大で約6倍程度にとどまっていた。そこで蛍光応答比の向上を目指し、GFP色素本体の構造を変更することとした。これまで用いていたジメチルアミノ基誘導体から、上記(1)にて見出した種々の GFP 色素誘導体に変更し蛍光応答を調べた。その結果、GFP 色素に導入するアルキルアミノ基として、これまでのジメチルアミンをピロリジンやジュロリジン骨格に変更すると、レクチン添加時の蛍光応答比が大幅に向上することが分かった。



プローブの構造と蛍光強度応答



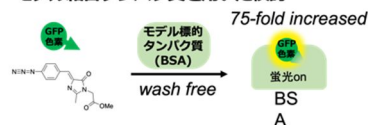
(4) 光親和性標識 turn-on 型蛍光プローブの基礎検討

光親和性残基を導入したタンパク質と共有結合させて強固に分子内運動を拘束させるアジド修飾 GFP 色素誘導体を合成し、モデルタンパク質として BSA を用いた検討を行った。その結果、BSA 存在下にて光照射を行った際に特異的な色素の吸収スペクトルに変化が見られ、共有結合を形成していることを示唆する結果が得られた。さらに、蛍光強度を調べると、最大で75倍程度の蛍光強度の上昇を達成した。この技術を種々の標的タンパク質への適用を進めている。

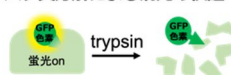
光親和性標識型GFP色素



モデル結合タンパク質を用いた検討



タンパク質分解による消光の検証

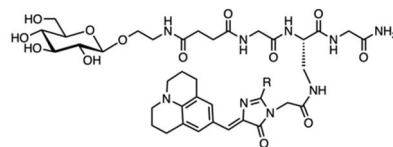


(5) GLUT に対する turn-on 蛍光プローブ

前項にてマンノースと GFP 色素誘導体のコンジュゲートからなる蛍光プローブについて示したが、種々の単糖ユニットと GFP 色素誘導体のコンジュゲートのうち、コントロールとして合成したグルコース誘導体と GFP 色素誘導体を用いて実験を行っている際に、このものががん細胞の膜上の GLUT に結合して turn-on 蛍光を示していることを示唆する結果を得た。そこで GLUT を標的とした turn-on 型蛍光プローブを目指し、詳細に蛍光イメージングを試みた。その結果、GFP 色素を探索したところ細胞膜上から強い蛍光シグナルが観察され、さらに GLUT の阻害剤であるフロレチンを用いた競合阻害において消光を示したことから、細胞膜上で GLUT に結合して蛍光を示したことが分かった。GLUT は種々のがんが発現が亢進しており、バイオマーカーとしても期待されている。そこで、種々の GFP 色素誘導体を用いて GLUT に対するドッキングシミュ

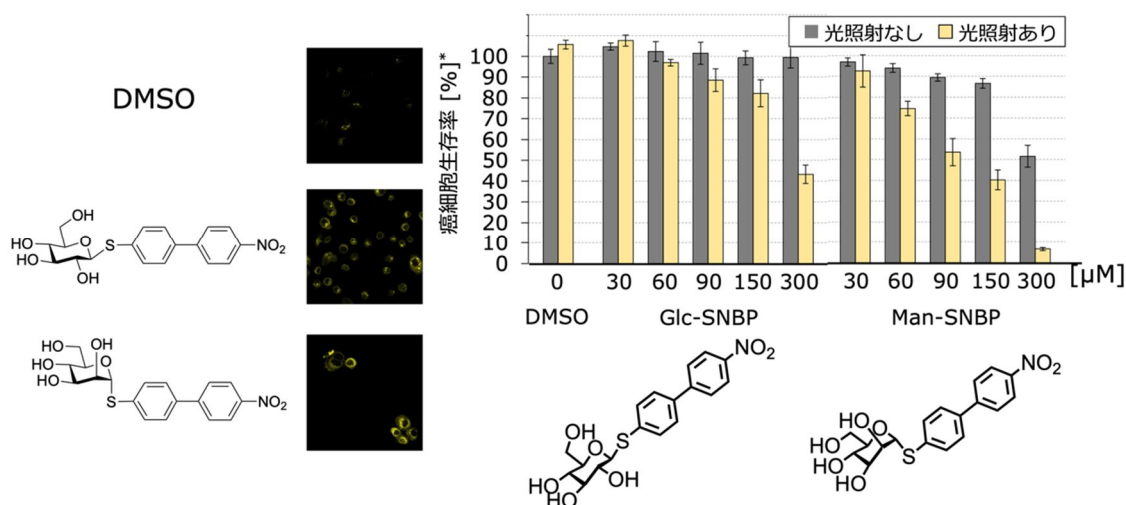
レーションを行ったところ、フェニル基を導入した GFP 色素誘導体が GLUT の基質結合サイトにぴったりと収まると予想された。そこでこのプローブを合成し、同様に無洗浄の細胞イメージングを行ったところ、プロトタイプのプロープよりも約 10 倍程度蛍光強度の向上に成功した。

GLUT 標的 turn-on 蛍光プローブ



(6) ビフェニル SNBP-Glc を用いた蛍光イメージング、光線力学治療の検討

単純な構造の色素として粘度依存的蛍光応答を示すビアリール化合物を用いた新規蛍光色素骨格の探索を行った。見出されたスルフィドとニトロ基を導入したビフェニル誘導体について検討を進めた。このものとグルコースまたはマンノースとのコンジュゲート体を、GLUT を過剰発現している PC-3 細胞に作用させたところ、細胞膜上からは蛍光シグナルは見られなかったが、細胞内から蛍光シグナルが観測された。グルコースやサイトカラシンを用いた GLUT の阻害実験において、一定の割合で阻害がかかったことから、GLUT を介して細胞内に集積可能な蛍光プローブであることを見出した。このビフェニル誘導体については、蛍光と光増感能の両方を有しており、実際に光照射によるがんの殺傷効果も確かめられ、がんの光線力学診断 (PDD) や光線力学治療 (PDT) への適用が期待されことを見出した (T. Kanamori, et al. Bioorg. Med. Chem., 2022, highlighted as front cover)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanamori Takashi, Miki Yuto, Katou Masataka, Ogura Shun-ichiro, Yuasa Hideya	4. 巻 61
2. 論文標題 4 -Nitrobiphenyl thioglucoside as the Smallest, fluorescent photosensitizer with cancer targeting ligand	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116737 ~ 116737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116737	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 -
1. 著者名 Tsuga Y, Katou M, Kuwabara S, Kanamori T, Ogura SI, Okazaki S, Ohtani H, Yuasa H.	4. 巻 14
2. 論文標題 A Twist Assisted Biphenyl Photosensitizer Passable Through Glucose Channel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Asian J.	6. 最初と最後の頁 2067-2071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201900378	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 -
1. 著者名 Yuasa Hideya, Yube Tomohiro, Kanamori Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Photoreaction of nitrobenzene derivatives with alkyl thiols giving sulfonamides and derivatives	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10426507.2023.2195651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanamori Takashi, Kaneko Shota, Hamamoto Koji, Yuasa Hideya	4. 巻 13
2. 論文標題 Mapping the diffusion pattern of 102 along DNA duplex by guanine photooxidation with an appended biphenyl photosensitizer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-27526-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飛田健司、湯浅英哉、金森功史
2. 発表標題 アミノ基修飾GFP色素誘導体の合成と粘度依存的Turn-On蛍光特性
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯浅英哉、金森功史
2. 発表標題 小さな光増感剤開発による癌細胞標的と核酸点変異への応用
3. 学会等名 LASER WEEK IN KOCHI
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金森功史、續木貴之、湯浅英哉
2. 発表標題 GFP色素ベンジリデンイミダゾリノン誘導体を用いた蛍光プローブ
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第31回サマースクール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 續木貴之、金森功史、稲田宏太郎、湯浅英哉
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KANAMORI Takashi, TSUZUKI Takayuki, YUASA Hideya
2. 発表標題 Synthesis and fluorescence properties of GFP dye derivatives, benzylidene imidazolinone derivatives
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Yuasa laboratory http://www.yuasa-lab.bio.titech.ac.jp/

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------