

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310140

研究課題名（和文） 標的タンパク及び糖鎖を光分解する光感受性生体機能分子の創製と応用

研究課題名（英文） Development of designed agents that selectively photo-degrade certain proteins and oligosaccharides

研究代表者

戸嶋 一敦 (TOSHIMA KAZUNOBU)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：60217502

研究成果の概要(和文):本研究課題において、疾病に関連するさまざまなタンパク及び糖鎖を、特定波長の光照射によって、標的選択的に分解する新しい生体機能分子を創製した。さらに、これら生体機能分子が、疾病に関連する細胞内で機能し、これら細胞の機能を制御可能なことを見出した。これらのことにより、光照射によって生理活性の発現が制御可能な、これまでに類例のない分子標的薬の開発に向けた新たな指針を確立した。

研究成果の概要（英文）: Several agents, that target-selectively photo-degrade certain disease-related proteins and oligosaccharides, were designed and synthesized. Furthermore, it was found the agents thus developed work not only in test tube but also in disease-related cells. From these studies, a new approach for the design of light-activated and molecular-targeted medicines has been established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：分子生命化学、有機合成化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生物活性分子、分子設計、合成、タンパク、糖、光分解、細胞、分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、生体高分子としてのタンパク及び糖鎖を、選択的に光分解する生体機能分子の創製を主目的としたが、申請時においては、タンパクの光分解を指向した生体機能分

子の創製研究は、国内外を通じて数例あるのみであり、端緒についたばかりであった。この時点において、著者らは、すでに、標的とするタンパク（転写因子：エストロゲンレセプター $\alpha$ ）のみを選択的に光分解する光感受

性生体機能分子の創製に、世界に先駆けて成功していた。一方、糖鎖を光分解する生体機能分子の創製に関する研究は類例がなく、著者らが、標的とする糖鎖（T-抗原糖鎖：Gal(β-1, 3)GalNAc)のみを選択的に光分解する光感受性生体機能分子の創製に成功したのが、世界で最初の例となっていた。これらことから、標的とするタンパク及び糖鎖を、特定の光照射をトリガーとして、選択的に光分解する生体機能分子の創製を主目的とする本研究は、極めて新しい研究領域であり、申請時まで、著者らの先駆的な研究成果が、この新領域をリードしていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、生命現象を司り、多様かつ複雑な生体高分子であるタンパク及び糖鎖をターゲットとし、特定波長の光照射をトリガーとして、標的とする望みの生体高分子のみを選択的に光分解し、その機能発現を特異的に制御する新たな光感受性の生体機能分子の創製と細胞内機能制御を指向した応用を目的とした。また、タンパク及び糖鎖をランダム（非特異的）に光分解する万能バサミとなる光感受性分子と標的分子（標的生体高分子）が未知の薬剤とのハイブリッド分子を作製し、このハイブリッド分子によって光分解されるタンパクや糖鎖を網羅的に解析・同定することで、標的が未知の薬剤の標的分子（標的生体高分子）を同定するケミカルバイオロジーとしての新手法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、生体高分子を光分解する光感受性分子（小分子）と、目的の生体高分子を認識する分子（小分子及び高分子）から構成されるさまざまなハイブリッド分子（光感受性生体機能分子）の創製と応用研究を目的とし、以下の研究方法で行った。

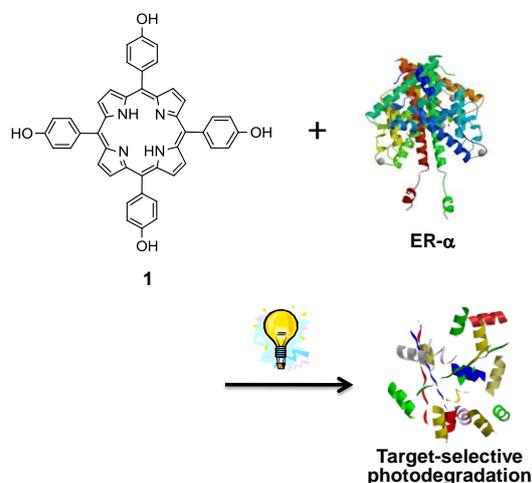
- (1) タンパク及び糖鎖の光分解に適した高機能な光感受性分子のデザインと合成
- (2) 光感受性分子の特定波長の光照射による光機能発現制御法の確立
- (3) 標的のタンパク及び糖鎖を認識する分子の選定及び開発
- (4) 生体高分子を光分解する光感受性分子（小分子）と生体高分子を認識する分子（小分子及び高分子）のハイブリッド法の開発と合成
- (5) 合成した光感受性生体機能分子の光分解効率及び選択性を指標にした機能評価
- (6) 合成した光感受性生体機能分子の細胞内生体高分子への応用と機能制御
- (7) 生体高分子（タンパク及び糖鎖）をランダムに光分解する光感受性分子（小分子）と標的分子が未知の薬剤とのハイブリッド

分子を作成と、この分子によるタンパク及び糖鎖の分解挙動の解析と同定を利用したケミカルバイオロジーでの新たな標的分子同定法の確立

尚、上記において、活性酸素種の同定や効率を、ESRを用いて評価した。さらに、合成したハイブリッド型生体機能分子の標的生体高分子との相互作用を、蛍光法などを用いて評価し、また、生体高分子の光分解の効率及び選択性を、SDS-PAGE 及び HPLC を用いて定量的に解析した。さらに、細胞内での標的とする生体高分子の光分解の挙動を、ウェスタンブロットングなどの手法を用いて解析し、細胞内での標的生体高分子の選択的分解による細胞機能制御とフェノタイプの変化について検討した。

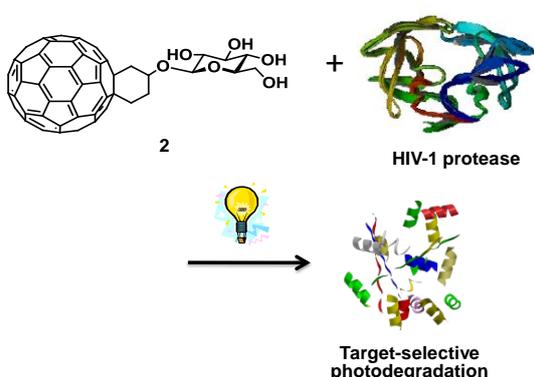
## 4. 研究成果

(1) ポルフィリン型タンパク光分解用人工生体機能分子の創製：本研究では、当研究室において、これまでに見出された、DNA 及びタンパクを光分解する光感受性物質の知見を基に、タンパクをより効果的に光分解することが期待される新規物質として、アントラセン類、アントラキノン類、キノリン類、及びキノキサリン類、さらには、DNA を光分解することが知られているポルフィリン類の中から、合計 37 種類の化合物を選択し、ケミカルライブラリーを作製した。次に、これら化合物の、ブラックライト (365 nm) 照射下での、タンパク（ウシ血清アルブミン (BSA)）に対する光分解活性を評価した。その結果、アントラキノン類から 2 種類及びポルフィリン類から 4 種類の計 6 種類の化合物が、優れた光分解活性を有することが確認された。また、これらポルフィリン類は、その吸収スペクトルが可視光領域にも存在する事から、次に、可視光（太陽光）照射下におけるタンパク (BSA、鶏卵リゾチーム (Lyso)) の光分解活性を評価した。その結果、これらポルフィリン類は、紫外線照射下のみならず、可視光照



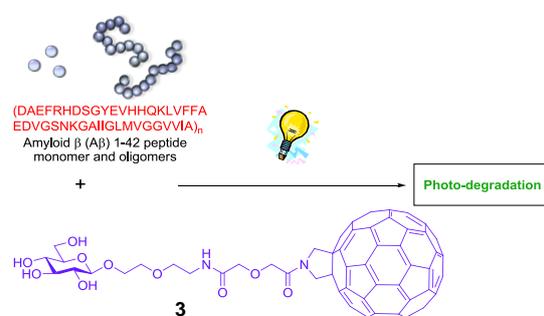
射下においても優れたタンパク光分解活性を示すことが初めて見出された。また、フェノール残基を有するポルフィリン誘導体、5, 10, 15, 20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)-21*H*, 23*H*-porphine (**1**)は、転写因子タンパクであるエストロゲンレセプター(ER)- $\alpha$ に対し、高い親和性を有し、可視光照射下、選択的かつ高い ER- $\alpha$  光分解活性を示すことを見出した。

(2) フラーレン誘導体による HIV-1 プロテアーゼ選択的光分解: 本研究では、HIV-1 プロテアーゼを、光照射を機能発現のスイッチとして、選択的に光分解する人工生体機能分子を創製した。HIV-1 プロテアーゼは、HIV の増殖に不可欠であることから、HIV-1 プロテアーゼを、選択的に光分解可能な低分子化合物は、HIV の治療を目的とした光線力学療法における分子標的薬剤として期待される。これまでに、HIV-1 プロテアーゼは、種々のフラレン誘導体と高い結合能を持つこと、また、ある種のフラレンは、長波長の紫外光および可視光を照射することにより光励起されることが知られていた。そこで本研究では、フラレンが疎水性の化合物であり一部の有機溶媒にしか溶解しないため、フラレンに親水基を多く持つ糖をハイブリッドさせた化合物 **2** を、分子計算ソフト MOE により分子デザイン、化学合成した。さらに、合成した化合物 **2** が、HIV-1 プロテアーゼに対して高い結合能を有することを見出した。また、化合物 **2** を用いて HIV-1 プロテアーゼを、標的タンパクとした光照射によるタンパク分解について検討結果、フラレン-糖ハイブリッド分子 **2** は、紫外光および可視光の光照射下、タンパクを光分解することを初めて明らかにした。さらに、**2** は他のタンパク(牛血清アルブミン(BSA)、鶏卵リゾチーム(Lyso))の共存下において、HIV-1 プロテアーゼのみを選択的に光分解することを見出した。

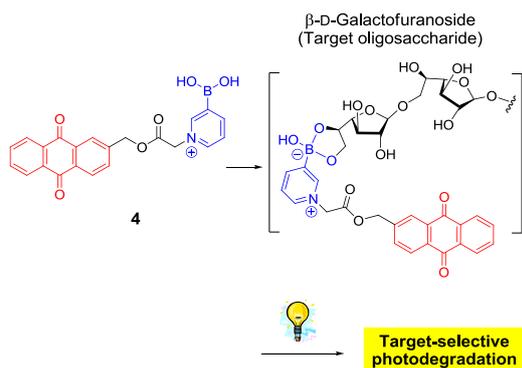


(3) フラーレン-糖ハイブリッドの創製とアミロイド  $\beta$  光分解: アルツハイマー病は、難治性疾患の一つであり、この疾患の発症には、アミロイド  $\beta$  が深く関与している。本

研究では、アミロイド  $\beta$  の凝集を阻害するだけでなく、アミロイド  $\beta$  モノマー及びそのオリゴマーを、光照射下、効果的に分解する生体機能性分子を創製した。これまでに、ある種のフラレン誘導体は、アミロイド  $\beta$  に対して親和性を有し、その凝集を阻害することが報告されていた。そこで、アミロイド  $\beta$  に対する更なる親和性と親水性の向上を指向し、グルコースを付与したフラレン-糖ハイブリッド **3** をデザイン、化学合成した。さらに、**3** がアミロイド  $\beta$  に対して強い親和性及び凝集阻害活性を有し、かつ、ブラックライト (365 nm) の光照射下、その凝集阻害活性が著しく向上することを見出した。さらに、ウェスタン・ブロッティング法によりアミロイド  $\beta$  の光分解を評価した結果、**3** は光照射下、アミロイド  $\beta$  のモノマー及びオリゴマーを効果的に光分解することを見出した。



(4) アントラキノーン-ボロン酸ハイブリッドの創製と結核菌糖鎖光分解: 第三の生命鎖としての糖鎖の生命現象における多様性と重要性が次第に明らかになるにつれ、この生体高分子の機能を人為的に制御するための技術の開発と応用は極めて重要である。本研究では、糖鎖の機能を人為的に制御可能な一つの手法として、標的とする糖鎖を、特定波長の光照射下で、選択的に光分解する生体機能分子を創製した。すなわち、当研究室において、糖鎖を、特定波長の光照射下において光分解する機能を有することを見出された小分子有機化合物であるアントラキノーン誘導体に、糖鎖が有する特異なジオールを選択的に認識するボロン酸を付与したアントラキノーン-ボロン酸ハイブリッド分子 **4** を分子デザイン、化学合成した。さらに、**4** が糖の中でも、ガラクトフラノシド残基が有する 5, 6 位のジオールを選択的に認識すること、また、**4** がブラックライト (365 nm) の光照射下、ガラクトフラノシド残基を有する糖鎖を選択的に光分解することを見出した。さらに、**4** がガラクトフラノシド残基を有する病原菌である結核菌の増殖を、光照射選択的かつ効果的に抑制することを見出した。



## 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 11 件)

- (1) D. Takahashi, S. Hirono, C. Hayashi, M. Igarashi, Y. Nishimura, K. Toshima, Photodegradation of target oligosaccharides by light-activated small molecules, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 10096-10100 (2010). (査読有り)
- (2) Y. Ishida, S. Tanimoto, D. Takahashi, K. Toshima, Photo-degradation of amyloid  $\beta$  by a designed fullerene-sugar hybrid, *Med. Chem. Commun.*, **1**, 212-215 (2010). (査読有り)
- (3) 戸嶋一敦, 光感受性分子標的薬の創製研究、日本発ブロックバスターを目指して一創薬研究の最前線一、シーエムシー出版、pp. 118-125 (2010). (査読有り)
- (4) 高橋大介、戸嶋一敦、糖鎖を認識する超分子、*バイオインダストリー*、シーエムシー出版、Vol. 27, No. 2, pp. 12-17 (2010). (査読無し)
- (5) 戸嶋一敦、標的糖鎖を光分解する生体機能分子の創製、*バイオインダストリー*、シーエムシー出版、Vol. 27, No. 2, pp. 43-48 (2010). (査読無し)
- (6) K. Toshima, Target-selective degradation of proteins and oligosaccharides by light-activated hybrid molecules for molecular-targeted photodynamic therapy, *Future Med. Chem.*, **1**, 1113-1124 (2009). (査読有り)
- (7) K. Toshima, S. Tanimoto, K. Tsumura, K. Umezawa, D. Takahashi, Target-selective degradation of cancer-related proteins by novel photo-sensitizers for molecular-targeted photodynamic therapy, *Cancer Sci.*, **100**, 1581-1584 (2009). (査読有り)
- (8) 戸嶋一敦、新しい分子標的薬とその設

計：光感受性分子標的薬、腎と透析、東京医学社、Vol. 67, No. 5, pp. 577-582 (2009). (査読無し)

- (9) 津村加奈、鈴木あかね、続木武男、松村秀一、梅澤一夫、戸嶋一敦、2-フェニルキノリン-ステロイドホルモンハイブリッド分子による標的タンパク選択的光分解と抗細胞活性、*Chemical Biology*, **2**, 1-4 (2009). (査読無し)
- (10) S. Tanimoto, S. Sakai, S. Matsumura, D. Takahashi, K. Toshima, Target-selective photo-degradation of HIV-1 protease by a fullerene-sugar hybrid, *Chem. Commun.*, 5767-5769 (2008). (査読有り)
- (11) S. Tanimoto, S. Matsumura, K. Toshima, Target-selective degradation of proteins by porphyrins upon visible photo-irradiation, *Chem. Commun.*, 3678-3680 (2008). (査読有り)

[学会発表] (計 33 件)

- (1) 石田泰則、藤井智彦、岡浩太郎、高橋大介、戸嶋一敦、フラーレン誘導体によるアミロイド $\beta$ の光分解と神経様細胞に対する効果、日本化学会第91春季年会、平成23年3月28日、神奈川大学
- (2) 今井ゆかり、廣野信悟、松葉悠、小林夕香、河岸洋和、高橋大介、戸嶋一敦、アントラキノ-レクチンハイブリッドの創製と標的糖鎖選択的光分解、日本化学会第91春季年会、平成23年3月27日、神奈川大学
- (3) 谷本周穂、高橋大介、戸嶋一敦、HIV-1プロテアーゼを選択的に光分解する人工生体機能分子の創製、日本化学会第91春季年会、平成23年3月27日、神奈川大学
- (4) 廣野信悟、高橋大介、戸嶋一敦、フラーレン-ボロン酸ハイブリッドによる標的糖鎖の選択的光分解、日本化学会第91春季年会、平成23年3月27日、神奈川大学
- (5) S. Tanimoto, S. Sakai, Y. Ishida, D. Takahashi, K. Toshima, Development of HIV-1 protease-selective photo-degrading molecules, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 19, 2010, Honolulu, Hawaii.
- (6) K. Toshima, Target-selective photo-degradation of oligosaccharides by designed organic molecules, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 17, 2010, Honolulu, Hawaii.
- (7) 高橋大介、廣野信吾、林千草、五十嵐雅之、西村吉雄、戸嶋一敦、結核菌の構成糖鎖を選択的に光分解する光感受性人工

- 生体機能分子の創製、GlycoTOKYO 2010 シンポジウム、平成 22 年 11 月 27 日、東京大学薬学部
- (8) K. Toshima, S. Hirono, D. Takahashi, Target-selective photodegradation of oligosaccharides by light-activated anthraquinone-boronic acid hybrid, 6<sup>th</sup> Keio LCC-Yonsei CBMH Joint Symposium, Kinugawa, October 22, 2010.
- (9) K. Toshima, Synthetic and chemical biological studies in Toshima's group at Keio University, Workshop on Organic Chemistry and Synthetic Biology, Japan-Netherlands, October 4, 2010, Netherlands Embassy Tokyo.
- (10) D. Takahashi, S. Hirono, C. Hayashi, M. Igarashi, Y. Nishimura, K. Toshima, Target-selective photodegradation of oligosaccharides by light-activated small molecules, 25<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium, August 2, 2010, Tokyo, Makuhari.
- (11) 高橋大介、廣野信吾、戸嶋一敦、標的糖鎖を選択的に分解する生体機能分子の有機合成化学的創製—アントラキノ—ボロン酸ハイブリッドによる結核菌糖鎖の光分解、第97回有機合成シンポジウム、平成22年6月18日、慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス
- (12) 谷本周穂、酒井聡史、石田泰則、高橋大介、戸嶋一敦、HIV-1 プロテアーゼを選択的に光分解するフラレン—糖ハイブリッド分子の有機合成化学的創製、第59回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、平成22年5月22日、東京農工大小金井キャンパス
- (13) 石田泰則、高橋大介、戸嶋一敦、フラレン—糖ハイブリッド分子によるアミロイドβの光分解、日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会、平成22年5月18日、慶應義塾大学日吉キャンパス
- (14) 廣野信吾、林千草、五十嵐雅之、西村吉雄、高橋大介、戸嶋一敦、アントラキノ—ボロン酸ハイブリッドによる標的糖鎖の選択的分解と抗結核菌作用、日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会、平成22年5月18日、慶應義塾大学日吉キャンパス
- (15) 廣野信吾、高橋大介、戸嶋一敦、アントラキノ—ボロン酸ハイブリッド分子による標的糖鎖の選択的分解、日本化学会第90春季年会、平成22年3月28日、近畿大学
- (16) 石田泰則、高橋大介、戸嶋一敦、フラレン—糖ハイブリッド分子によるアミロイドβの光分解、日本化学会第90春季年会、平成22年3月28日、近畿大学
- (17) 津村加奈、梅澤一夫、高橋大介、戸嶋一敦、エストロゲンレセプターαを選択的に光分解する小分子の創製と乳がん細胞の増殖抑制、日本化学会第90春季年会、平成22年3月28日、近畿大学
- (18) 戸嶋一敦、標的糖鎖を光分解する生体機能分子の創製、理研シンポジウム、第13回「生体分子の化学」、平成22年1月29日、理化学研究所
- (19) D. Takahashi, S. Tanimoto, S. Sakai, K. Toshima, The 25<sup>th</sup> Naito Conference on Chemical Biology [II], September 9, 2009, Sapporo.
- (20) 戸嶋一敦、疾患関連タンパクを選択的に光分解する生体機能分子の創製と応用、第3回慶應義塾大学理工学部ハイテクリサーチセンターシンポジウム—機能性分子 その医療への応用—、平成21年7月14日、横浜情報文化センター
- (21) 谷本周穂、酒井聡史、石田泰則、高橋大介、戸嶋一敦、フラレン—誘導体によるHIV-1プロテアーゼ選択的分解、日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、平成21年5月18日、神戸
- (22) 谷本周穂、松村秀一、戸嶋一敦、ポルフィリン誘導体によるエストロゲン受容体タンパクの選択的分解、日本化学会第89春季年会、平成21年3月27日、日本大学
- (23) 高橋大介、酒井聡史、谷本周穂、戸嶋一敦、フラレン—糖ハイブリッドによるHIV-1 プロテアーゼの選択的分解、日本化学会第89春季年会、平成21年3月27日、日本大学
- (24) K. Toshima, Target-selective degradation of proteins by designed and light-activated small molecules, 2008 RIKEN Conference on Chemical Biology, November 13, 2008, Narita.
- (25) 谷本周穂、松村秀一、戸嶋一敦、ポルフィリン誘導体によるエストロゲン受容体タンパク選択的分解、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、平成20年9月20日、東京工業大学
- (26) 酒井聡史、谷本周穂、松村秀一、高橋大介、戸嶋一敦、フラレン—糖鎖ハイブリッド分子によるHIV-1 プロテアーゼ選択的分解、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、平成20年9月18日、東京工業大学
- (27) 津村加奈、続木武男、松村秀一、梅澤一夫、戸嶋一敦、2-フェニルキノリン—エストラジオールハイブリッド人工分子による細胞内標的タンパク光分解と細胞増殖抑制、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、平成20年9月18日、東京工業大学
- (28) K. Toshima, Target-selective degradation of

- oligosaccharides by a light-activated small molecule-lection hybrid, The 4<sup>th</sup> Keio LCC-Yonsei CBMH Joint Symposium, September 16, 2008, Keio University.
- (29) K. Toshima, Target-selective degradation of oligosaccharides by a light-activated small anthraquinone-lection hybrid, 24<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium, July 29, 2008, Oslo.
- (30) 谷本周穂、松村秀一、戸嶋一敦、ポルフィリン系化合物による標的タンパク選択的光分解、第12回がん分子標的治療研究会総会、平成20年6月27日、学術総合センター（東京）
- (31) 酒井聡史、谷本周穂、松村秀一、戸嶋一敦、フラレン誘導体による標的タンパク選択的光分解、第12回がん分子標的治療研究会総会、平成20年6月27日、学術総合センター（東京）
- (32) 戸嶋一敦、標的タンパクを選択的に光分解する光感受性分子の創製と応用、第12回がん分子標的治療研究会総会、平成20年6月26日、学術総合センター（東京）
- (33) 津村加奈、鈴木あかね、続木武男、松村秀一、梅澤一夫、戸嶋一敦、2-フェニルキノリンスステロイドホルモンハイブリッド分子による標的タンパク選択的光分解と抗細胞活性、日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会、平成20年5月19日、学術総合センター（東京）

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ノイラミダーゼに対する酵素阻害剤  
発明者：戸嶋一敦、高橋大介、青木優介  
権利者：清家篤  
種類：特願  
番号：2010-022168  
出願年月日：平成 22 年 2 月 3 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ：

<http://www.applc.keio.ac.jp/~toshima/>

新聞掲載：

- 2011 年 1 月 4 日掲載 日刊工業新聞  
朝刊 「慶大 光で結核菌だけ攻撃 分子標的薬特定「糖鎖」を分解」
- 2009 年 12 月 25 日掲載 日刊工業新聞  
朝刊 「慶大 患部をピンポイント治療 がん細胞光で分解」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸嶋 一敦 (TOSHIMA KAZUNOBU)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号：60217502

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし