

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02861

研究課題名(和文)細胞代謝のケミカルバイオロジー研究の開拓

研究課題名(英文)Chemical biology researches for elucidation of cell metabolism

研究代表者

王子田 彰夫(Ojida, Akio)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10343328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞代謝に関わる様々なケミカルバイオロジー研究を行った結果、脂肪酸のベータ酸化に関わる研究テーマにおいて高い成果を得た。具体的には、まず、脂肪酸のベータ酸化を検出できる蛍光プローブの開発に成功した。この蛍光プローブはマウス肝細胞におけるベータ酸化の活性化状態を蛍光で検出することに世界で初めて成功した。また、脂肪酸のベータ酸化活性を指標した反応性化合物(コバレントリガンド)の細胞系スクリーニングを行うことで、ベータ酸化阻害分子CFA-457を発見した。CFA-457は、細胞中のプロテインXを不可逆的に強く阻害する化合物であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した蛍光プローブは細胞や肝細胞のベータ酸化を簡便に感度よく検出できる優れた機能を有する。今後このプローブは、様々な生物研究に使われることで代謝に関わる様々な現象を明らかにすることに貢献することができる。一方で細胞代謝を指標したスクリーニングから見出した新規なコバレント阻害剤は、さらに活性を上げることで、プロテインXを高発現するがん幹細胞の増殖を阻害できる創薬へと発展することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we carried out various chemical biology studies related to cellular metabolism. As the results, we obtained the good data relating to the beta-oxidation of fatty acids. First, we developed a fluorescent probe that can detect the beta-oxidation of fatty acids. This fluorescent probe successfully detected the activation state of beta-oxidation in mouse hepatocytes by fluorescence. In another research project, we screened the reactive compounds (covalent ligands) that inhibit the cellular beta-oxidation activity and found CFA-457 as a potent inhibitor. Further study revealed CFA-457 serves as a covalent ligand that strongly and irreversibly inhibits protein X in cells.

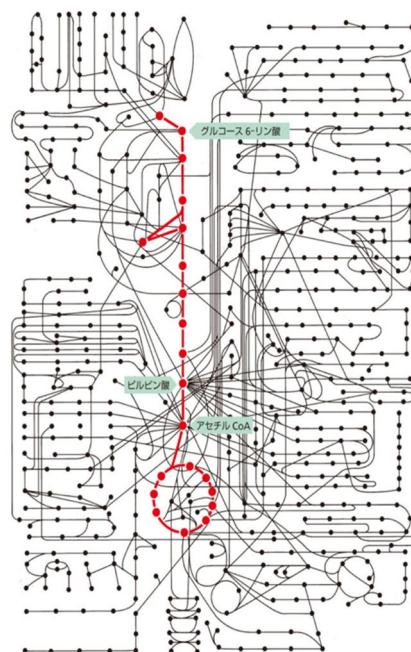
研究分野：ケミカルバイオロジー、創薬化学

キーワード：細胞代謝 ベータ酸化 蛍光イメージング ミトコンドリア ペルオキシソーム コバレントリガンド

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

代謝は生体が恒常性を保ちつつ生命活動を維持するための重要な生体システムの一つである。細胞代謝の反応経路は多様であり、複数の経路がクロストークすることで極めて複雑な代謝ネットワークを形成している(右図)。細胞は、この代謝ネットワークを制御された形で変動させることで、細胞活動を維持するために必要な糖、脂質、アミノ酸、ATPなどの生体分子を生産あるいは消費し、自立した生命単位として機能している。一方で、これらの代謝経路のいずれかに異常が生じ、生体分子の供給と消費のバランスが崩れた場合、細胞や生物個体は機能不全に陥る。例えば、フェニルケトン尿症などに代表される多くの先天性の代謝異常疾患は、代謝酵素の欠損や変異が原因となって生じる。また、がん細胞は正常細胞とは異なる特異な代謝活性状態を持つ。例えば、がん細胞が好氣的条件においても解糖系を亢進させ増殖



主要代謝経路の概略図

に必要な ATP を産生しているというウォールブルグ効果(好氣的解糖)は、その最も代表的なものとして広く知られている。現在の細胞代謝研究は、質量分析を用いたメタボローム解析が主流となっている。しかし本手法では、個々の細胞の異なる代謝状態、すなわち異種性(ヘテロジェネイティ)をリアルタイムかつ一細胞ごとに検出することは現時点において困難である。また、メタボローム解析は代謝反応により生成する「代謝物を定量する」解析法であり、必ずしも「代謝の活性化状態」そのものを検出する手法ではない。このことは実際にメタボローム解析の問題点として広く認知されている(Cell, 2018, 173, 822)。一方、タンパク質を対象とするプロテオーム研究においては、ABPP (activity-based protein profiling) が、細胞における酵素の活性状態そのものを評価する手法として広く用いられている。以上の背景の中で申請者は、「代謝の活性化状態」を直接的に評価するための新たな化学的手法の開拓が、今後の代謝解析研究の発展に重要であると考えた。

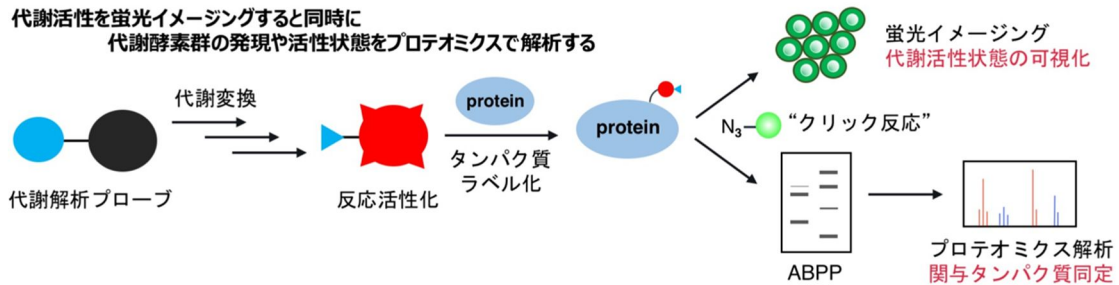
2. 研究の目的

本申請研究の目的は、小分子プローブを用いた蛍光イメージングやケミカルプロテオミクスを用いた細胞代謝の解析技術および代謝制御分子を新たに開発し、現状において未開拓の状態にある代謝のケミカルバイオロジー研究を進展させることである。これらの手法を駆使して、生細胞の代謝活性化状態や、細胞集団内の代謝異種性について新たな知見を得ることを目指した。さらに、これらの基礎研究から得られた知見を集約し、がん代謝制御を目指した創薬研究を展開することを目指した。

3. 研究の方法

本研究課題では、脂肪酸ベータ酸化の活性化状態を蛍光イメージングとケミカルプロテオミクスを用いて両解析できる新たな小分子プローブの開発を目指して、分子プローブのデザインと

機能評価を行った。デザインした分子プローブがベータ酸化により反応活性化されて細胞タンパク質と反応することを蛍光プローブとクリック反応後にゲル電気泳動解析、あるいは蛍光顕微鏡によるイメージングで検出、また、ケミカルプロテオミクス解析によりプローブと反応した細胞タンパク質の同定する複数の手法を駆使してすることで、開発する小分子プローブの機能を評価した。

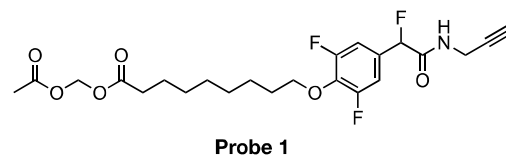


4. 研究成果

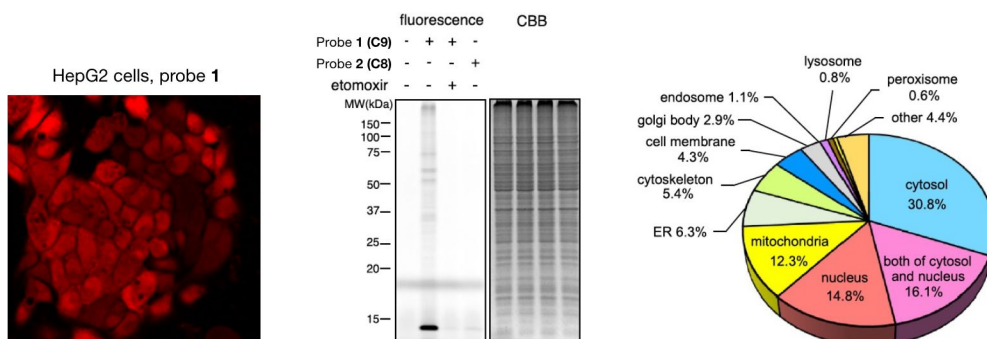
(1) 脂肪酸ベータ酸化を検出するプローブの開発

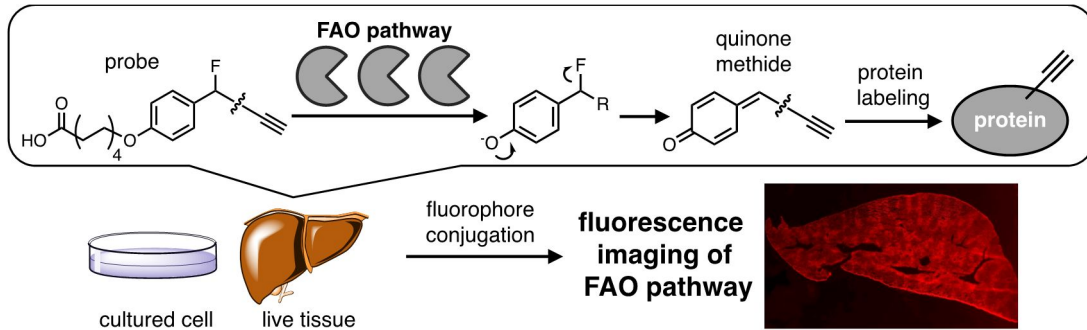
代謝経路は複数の酵素反応から構成されているため、単一の蛍光プローブを用いて、ある代謝経路のフロー全体の活性を明らかにすることは困難である。この事を実現するために我々は、脂肪酸酸化 (FAO) 代謝経路の活性化状態を蛍光イメージングできるプローブの開発することを目指した。FAO は、脂肪酸を分解してアセチル CoA を生成し、ATP を産生する重要な代謝経路である。FAO の蛍光イメージングのために、我々は、FAO によって代謝分解され、アルキン部位を有する反応性キノンメチド (QM) を放出する脂肪酸部位を有する化学プローブを設計した。QM は細胞内タンパク質に共有結合で捕捉され、標識タンパク質に蛍光色素を導入することで FAO の蛍光検出が可能となる。

肝細胞がん HepG2 細胞を開発したプローブ 1 で処理し、固定した後、CuAAC 反応によりアジド基を有する蛍光色素 (TAMRA-azide) とコンジュゲートした。共焦点顕微鏡で観察したところ、細胞内



に明るい蛍光が観察されました。一方、FAO 阻害剤であるエトモキシルで前処理した細胞では、ごくわずかな蛍光が観察された。また、ABPP 後のゲル電気泳動解析においてもプローブ処理群でラベル化されたタンパク質が蛍光検出される一方で、エトモキシルで前処理した細胞では有りにバンド強度が現象した。一方でプローブ 1 の C9 アルキル鎖が一炭素短いプローブ 2 ではラベル化されたタンパク質のバンドは検出されなかった。プローブ 2 では FAO により代謝されても QM は形成されないことから、本結果は我々のプローブ設計の正しさを裏付けるものである。プロテオミクス解析を行うとミトコンドリア以外に細胞質や核に局在するタンパク質がプローブ

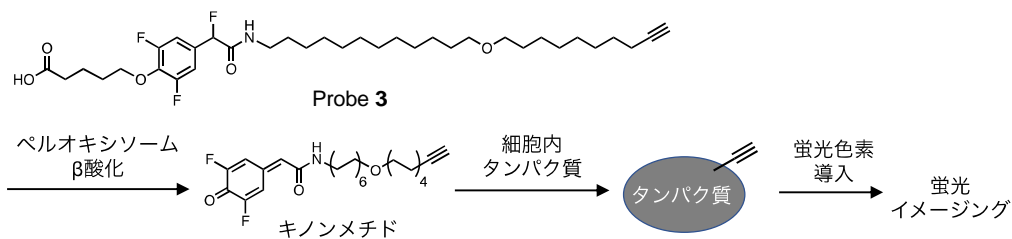




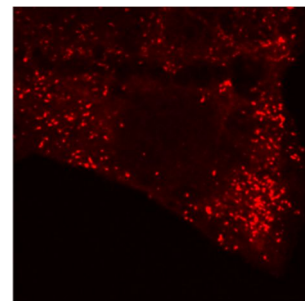
プローブ 1 によりラベル化されていることが明らかとなった。FAO 代謝がミトコドリアで機能していることを考えると、この結果は矛盾してように思えた。しかし、FAO 代謝によりプローブ 1 から生じた QM の寿命は ($t_{21} = 38.5 \text{ sec}$) と予想以上に長いことから、この間に QM が細胞内で拡散したためであると考察している。

次にプローブ 1 をマウス肝組織における FAO の蛍光イメージングに応用した。マウスにプローブ 1 を腹腔内投与しマウスの肝臓を単離した。肝切片を TAMRA-azide で処理し、共焦点顕微鏡で観察した。肝臓スライスに TAMRA の明るい蛍光が観察された。一方、エトモキシルで前処理したマウスの肝臓スライスでは蛍光は効果的に抑制された。これらのデータから、プローブ 1 は培養細胞のみならず、マウス肝組織においても FAO 検出が可能であることが明らかとなった。

ペルオキシソームは脂質一重膜で覆われた球状のオルガネラであり ROS 代謝や脂肪酸分解など様々な代謝反応を担っているが、その機能解析はミトコドリアなどのオルガネラと比べて大幅に遅れている。これはケミカルバイオロジー分野でも同様であり、ペルオキシソーム内の酵素反応を検出するプローブ開発は他のオルガネラと比べて非常に少ない。一方、最近の研究でペルオキシソームの機能異常はガンや老化など様々な疾患に関与することが明らかになりつつある。¹⁾ そのため、ペルオキシソーム内の酵素反応を標的としたケミカルプローブ開発はペルオキシソーム機能に関する研究を大きく加速させると期待できる。そこで本研究では、ペルオキシソームの中心的な代謝反応である FAO を蛍光イメージングする新規ケミカルプローブの開発に取り組んだ。



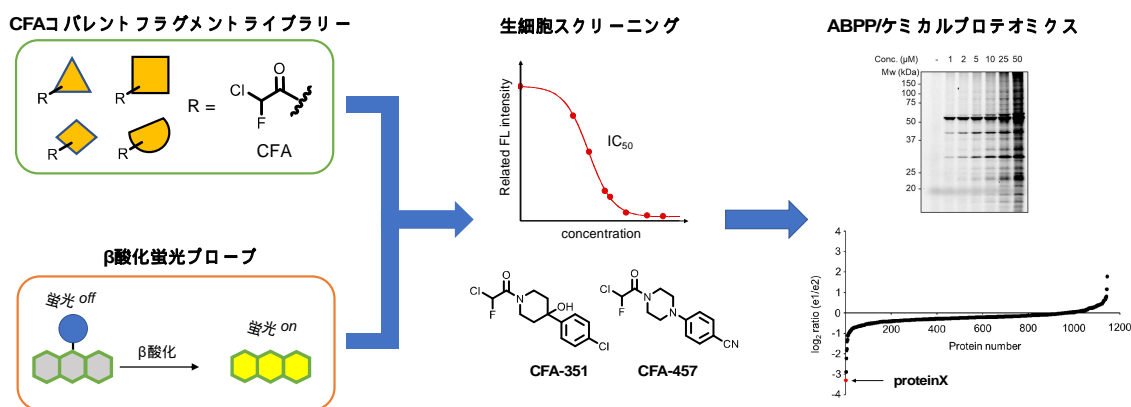
ペルオキシソームの FAO では極長鎖 (> C22) または分岐鎖脂肪酸を分解し脂肪毒性を軽減する役割を果たしている。上記のプローブ 1 の分子設計を参考にアルキン有する QM 前駆体を導入した極長鎖脂肪酸プローブ 3 を設計した。本プローブを HepG2 細胞とインキュベートした後に、TAMRA-azide とクリック反応すると細胞内に輝点が観察された。免疫染色の結果、この輝点は細胞内のペルオキシソームと局在が一致する結果を得た。本研究については今後も継続して進め、プローブ 3 のペルオキシソーム機能解析への応用について検討していく予定である。



(2) 脂肪酸ベータ酸化を阻害するコバレントリガンドの探索

FBDD (fragment-based drug discovery)はフラグメントと呼ばれる分子量 300 以下からなるから化合物を用いてスクリーニングを行い、構造の最適化により標的タンパク質に対して相互作用をするリード化合物を開発するための創薬方法である。FBDD はスクリーニング時に標的タンパク質と相互作用する化合物を効率的に見出すことができる利点を有する一方で、標的タンパク質との結合親和性が低いという問題点がある。本研究ではフラグメント化合物に標的の求核性アミノ酸残基と反応するための求電子的反応基 (Warhead) を導入したコバレント型フラグメントを用いたリガンド探索を行った。

当研究室ではこれまでに穏やかな反応性を有する反応基として α -クロロフルオロアセトアミド基 (CFA 基) を見出した。CFA 基は標的システインと反応し共有結合を形成する一方で、タンパク質表面のシステイン残基と反応した場合には加水分解するという可逆性も有していることから、細胞内での標的タンパク質を高選択的に阻害することができる。生細胞を用いたフェノタイプスクリーニングにおいては、高い標的選択性は擬陽性や細胞毒性の低下につながるため、スループット性の観点からも非常に重要である。我々は CFA を反応基として有するフラグメント化合物を約 160 種類合成し、チオールとの *in vitro* 反応性と細胞内タンパク質との反応性の関連を詳細に解析した。続いて CFA ライブラリーを用いた生細胞での β 酸化阻害剤スクリーニングを行った。当研究室で開発した β 酸化を検出する蛍光プローブを用いて、生細胞中で蛍光強度を抑制するライブラリー化合物を探索したところ、ピペラジン・ピペリジン骨格を有する CFA-351/457 をヒット化合物として得た。続いてこれらの化合物にアルキンを導入した 351 Alkyne/457 Alkyne を合成し、ヒット化合物の細胞内ラベル化挙動を ABPP によって評価した結果、351/457 Alkyne 化合物はいずれも低濃度 (~10 μ M) で 50 kDa 付近のタンパク質を選択的にラベル化することが分かった。さらに、ケミカルプロテオミクス解析により標的タンパク質 X の同定に成功した。CFA-457 の標的タンパク質 X の精製酵素に対する阻害活性を調べたところ、短い反応時間 (30 min) で高い阻害活性を示すことが分かった ($IC_{50} = 40$ nM)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Anna Kanegae, Yusuke Takata, Ippei Takashima, Shohei Uchinomiya, Ryosuke Kawagoe, Kazuteru Usui, Akira Yamashita, Jirarut Wongkongkatep, Manabu Sugimoto, Akio Ojida	4. 巻 4
2. 論文標題 A multicolor and ratiometric fluorescent sensing platform for metal ions based on arene metal-ion contact	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-021-00541-y	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 Shohei Uchinomiya, Tomoki Nagaura, Mark Weber, Yuya Matsuo, Naoki Zenmyo, Yuya Yoshida, Akito Tsuruta, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo, Naoya Matsunaga, Akio Ojida	4. 巻 145
2. 論文標題 Fluorescence-Based Detection of Fatty Acid Oxidation in Cells and Tissues Using Quinone Methide-Releasing Probes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 8248-8260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.3c02043	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10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上和哉, Yin Ruikang, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 蛍光プローブを用いた脂肪酸 酸化阻害剤の探索, 生体機能関連化学部会
3. 学会等名 生体機能関連化学部会 若手の会 第32回サマースクール
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上和哉, Yin Ruikang, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 蛍光プローブを用いた脂肪酸 酸化阻害剤の探索
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村拓哉, 末次春花, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 光反応を用いた迅速な細胞表層受容体の選択的ラベリング
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤大輔, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 生体直交的脱シリル化反応を用いたケミカルプローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村拓哉, 末次春花, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 光反応基によるHisタグ導入膜タンパク質の選択的ラベル化
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内之宮祥平, 永浦智樹, 松永直哉, 鶴田朗人, 井上和哉, 大戸茂弘, 王子田彰夫
2. 発表標題 Activity-Based Probeによる生体組織での脂肪酸分解経路の蛍光イメージング
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾祐治, 永浦智樹, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 ケミカルプローブによるペルオキシソーム内脂肪酸分解経路の検出
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾祐治, 永浦智樹, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 キノンメチド放出プローブによるペルオキシソーム 酸化の蛍光イメージング
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 末次春花, 今村拓哉, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 光反応を利用したHisタグ導入受容体の標識と近位ラベル化への応用
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 234. Shohei UCHINOMIYA, Tomoki NAGaura, Yuya MATSUO, Akito TSURUTA, Naoya MATSUNAGA, Shigehiro OHDO, Akio OJIDA
2. 発表標題 Fluorescence imaging of fatty acid beta oxidation pathways in cells and tissues with chemical probes
3. 学会等名 日本薬学会第143年会次世代薬学アジアシンポジウム3 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

王子田研究室 ホームページ
<https://bunseki.phar.kyushu-u.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
---------	---------