

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19331

研究課題名(和文) タンパク質間の特異的相互作用を活用する高選択的バイオコンジュゲーション法の開発

研究課題名(英文) Development of a highly selective bioconjugation method using protein interactions

研究代表者

国嶋 崇隆(Kunishima, Munetaka)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10214975

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)：タンパク質の化学修飾は、創薬や生命科学研究において重要な役割を担っており、タンパク質の特定の位置を自在に化学修飾する技術の開発が求められている。本課題では、標的認識能をもつタンパク質の標的認識サイト付近に触媒機能を導入した「タンパク質触媒」の開発を目標として研究を行った。その結果、特定の抗体をモデルに用いて、抗原認識部位の近傍を特異的に化学修飾し、その修飾後も抗原結合能が保持されるような新規方法論の開発に成功した。今後この技術を広く展開することで、タンパク質触媒開発はもろんな様々な用途への活用も期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発を目指したタンパク質の修飾技術は、ケミカルバイオロジー分野から、疾患の基礎的なメカニズム解明、さらにその診断、治療まで、非常に幅広い分野で高い需要がありながら未だ発展途上の技術である。今回代表者らが開発した技術は、現在、他の研究グループによって進められている取り組みとは全く異なるアプローチによるものであり、他の手法が抱える課題を解決できる可能性をもっている。よって、新規技術開発という点から高い学術的意義をもち、同時にその成果は生命科学研究の推進から医療の発展にまで繋がり得る点で高い社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Chemical modification of proteins plays an important role in the elucidation of protein functions and the development of protein based drugs such as antibody-drug conjugates. Therefore, techniques for chemical modification of specific positions of proteins have been demanded. In this project, we conducted research with the goal of developing "protein catalysts" by introducing a catalytic function near the target recognition site of a protein with target recognition ability. As a result, using a specific antibody as a model, we have succeeded in developing a novel methodology in which the vicinity of the antigen-recognition site is specifically modified, and the antigen-binding ability is retained even after the chemical modification. By expanding this technology, it can be expected to be used for various applications as well as the development of protein catalyst in the future.

研究分野：有機化学 ケミカルバイオロジー

キーワード：抗体 バイオコンジュゲーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の化学修飾はタンパク質の機能解明、抗体薬物複合体などの抗体医薬品開発に重要な役割をもつ。本課題では、高度な分子認識能を示すタンパク質間相互作用に着目し、これを利用した選択的なタンパク質修飾法の開発を目指して研究を行った。本研究で鍵となるのは、標的認識能をもつタンパク質の標的認識サイト付近に触媒機能を導入した「タンパク質触媒」の開発である。このために、タンパク質の標的認識サイト付近を特異的に化学修飾し、かつ、化学修飾後も標的認識能が保持される技術が必要であるが、これまで一般的な化学的手法は確立されていなかった。抗体は低分子、ペプチド、タンパク質等様々な分子に高い親和性をもつものが作製可能であり、その会合は自然界に存在する分子間相互作用の中でも最も強固で特異性が高いものの一つとして知られている。そのため、抗体の適切な位置に触媒サイトを導入できれば有用なタンパク質触媒としてはたらくと期待できる。本課題ではそのための基盤技術開発を目標に、抗体の新規修飾法の開発を行った。

2. 研究の目的

抗体の基質認識能を利用する触媒の開発では、抗体の抗原認識部(パラトープ)周辺に触媒構造を特異的に導入する技術が必要である。一方、パラトープ周辺の構造変換は抗体本来の抗原認識能を低下させる懸念がある。そのため、パラトープ周辺への特異的修飾、及び抗体の抗原への親和性の保持を両立可能な反応剤の開発、さらに反応条件、精製条件の確立を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

抗体、反応剤の調製：抗体への触媒構造導入のための基礎検討として、抗体に触媒の代わりに色素を導入するモデル実験を行った。抗体としては比較的安価に入手可能な抗フルオレセインモノクローナル抗体を用いた。抗フルオレセイン抗体修飾のための反応剤として、抗原であるフルオレセイン構造、及び、修飾率を評価するための蛍光色素として 7-ヒドロキシマリニン構造をもつチオエステルを設計し、有機合成により反応剤を調製した。

抗体の化学修飾：抗体と複数の反応剤を混合し、一定時間経過後、化学修飾の進行を SDS-PAGE 及び UV-vis スペクトルによって修飾部位及び修飾率を評価した。

抗体からの反応剤の除去：抗原由来の反応剤を除去するため種々の溶質を含む水溶液を修飾反応後の抗体に加え、限外ろ過及びサイズ排除クロマトグラフィにより反応剤の除去を行った。反応剤の除去効率は UV-vis スペクトルによって評価した。

抗原結合能の確認：フルオレセインと抗体が結合した際に蛍光の消光が起こることを利用して、蛍光光度計により結合能の評価を行った。また、今回申請者が開発した手法で修飾した抗体がフルオレセインを導入したアルブミンと複合体を形成するかを、サイズ排除カラムと蛍光検出器をセットした HPLC によって解析した。

反応触媒部位導入のための基本的技術の開発：抗体を始めとするタンパク質を触媒化するために必要な触媒部位の導入反応について検討した。

4. 研究成果

(1) 抗体の選択的化学修飾の達成

(1)-反応剤の開発： 複数合成した反応剤の内、図1に示す反応剤を用いた際に、抗体の修飾が高效率で進行した。修飾はフルオレセイン結合能を持たない抗体では起きず、抗フルオレセイン抗体への修飾は阻害剤として過剰量のフルオレセインを共存下させた条件では阻害された。よって、反応剤は抗フルオレセイン

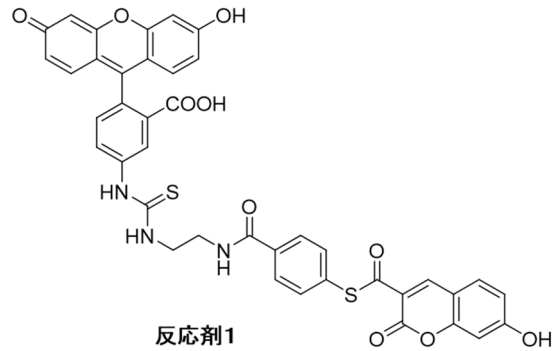
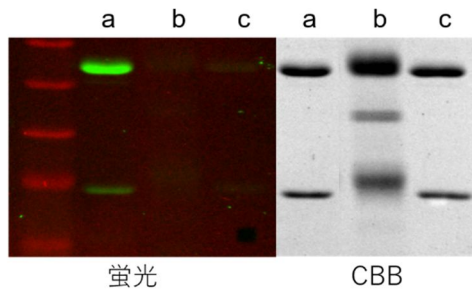


図1. 反応剤1の構造

抗体への特異的な結合による近接効果で効率的な修飾が起こっていることがわかった(図2)。反応条件の最適化を行った結果、抗体一分子に対しておよそ二分子の色素を導入できることがわかった。また、修飾後の抗体をパパインで消化し、修飾部位の解析を行った結果、抗体の可変域付近が特異的に化学修飾されており、狙い通りパラトープ周辺の選択的修飾が起こることが示唆された(図3)。



a. 抗FL抗体+反応剤1
b. FL親和性がない抗体+反応剤1
c. 抗FL抗体+反応剤1+FL(1000 eq.)による競合阻害

図2. 抗体修飾反応の電気泳動による解析

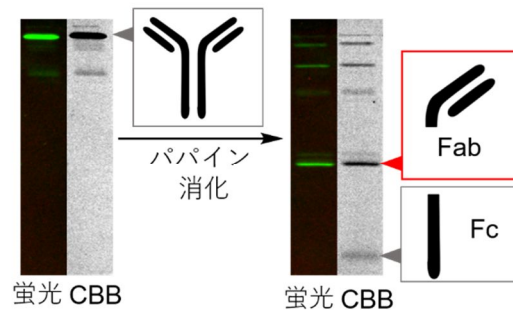


図3. パパイン消化による修飾位置の推定

(1)-ii 抗体の精製条件の確立： 本研究で用いた手法では反応後に抗体のパラトープ部分に反応剤由来の抗原構造が残存するため、その除去を行う必要があった。プロテイン A からの抗体の解離などで一般的に用いられる酸性のグリシン緩衝液を用いると、抗原の除去は行えるものの、抗体の大部分が不可逆的に凝集を起し、回収率が大幅に低下してしまう問題が起こった。抗原除去に関して、抗原を効率よく除去しつつ、抗体の変性を起こさない精製条件の探索を行った結果、弱酸性のアルギニン溶液を用いた際に高效率で抗原の除去が可能で、高い回収率で修飾抗体が得られることが分かった。

(1)-iii 抗体の親和性評価： 修飾後の抗体の親和性の評価をフルオレセインの蛍光消光実験により行った結果、修飾後の抗体も抗原に対して非常に高い親和性を維持していることが分かった。また、フルオレセインを結合させたアルブミンと複合体を形成できるかの確認を行った結果、サイズ排除 HPLC にて修飾後の抗体とアルブミン誘導体の複合体が観測され、抗体-アルブミン複合体から、抗体に導入した色素由来の蛍光が観測された。

(1)-総括： 以上の結果より、今回申請者らが開発した手法により、抗体のパラトープ周辺の特異的修飾が可能であり、更に、修飾後の抗体が抗原への高い親和性を維持できることが分かった。本研究成果は、タンパク質の選択的修飾を行うタンパク質触媒の開発に繋がり、生命科学、創薬分野の発展に寄与すると期待できる。これらの成果について、プレプリントサーバー-ChemRxiv にて公開を行った。

(2)本研究に関連して行った反応剤及び技術開発

タンパク質触媒開発を行うにあたって、触媒構造導入のための反応剤の開発、効率的にタンパク質修飾反応を行うための技術開発が必要となる。それに関連して、「触媒サイト導入のための反応剤開発」及び「界面での局所濃縮効果および分子配向性制御を利用した反応加速技術開発」に取り組み下記の研究成果をあげた。

(2)-i 触媒サイト導入のための反応剤開発： 求核触媒は水中での反応でも効率的にはたらく、多様な反応を触媒することからタンパク質触媒の触媒サイトとして有望である。触媒サイトを生体分子に導入するにあたり、活性エステルは水中でアミンと効率的に反応するため、求核触媒サイトをもつ活性エステルはタンパク質触媒の合成において有用な反応剤として期待できる。しかしながら一般に活性エステルは求核触媒により分解を受けるため、それらが共存した反応剤の開発はこれまで行われていなかった。

合成、精製プロセスを検討することにより、触媒サイト導入のための反応剤 2 を安定な固体として得ることに成功した。本反応剤は水溶液中で様々なアミンに触媒サイトを導入できるため、タンパク質触媒の開発にも有用と期待できる (図 4)。本研究成果は国際誌

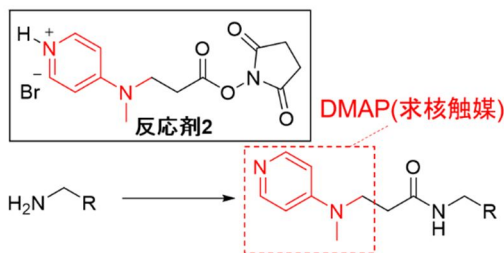


図 4. 反応剤2を用いた触媒サイト導入反応

(Tetrahedron Letters 2021, 153343)にて論文発表を行った。

(2)- 界面での局所濃縮効果および分子配向性制御を利用した反応加速技術の開発： 本研究で目指す、低濃度の生体分子の修飾技術開発に関連する研究として、界面活性剤からなる分子集合体内への局所的な基質の濃縮現象、かつ基質反応点である極性官能基がいずれも界面に配向することで発現する反応加速効果を活用した基質選択的反応の開発に成功し、国際誌 (Asian Journal of Organic Chemistry, 2023, e202200602)にて論文発表を行った。本技術開発で得られた知見はタンパク質触媒等を用いる基質特異的な反応にも応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Horie Saki, Fujita Hikaru, Yamashita Rina, Kunishima Munetaka	4. 巻 81
2. 論文標題 Conjugation of 4-(dimethylamino)pyridine to primary amines in aqueous buffer solutions using an N-hydroxysuccinimide ester reagent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153343 ~ 153343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.153343	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 Matsumoto Takuya, Hirata Eri, Zhang Hanlin, Hioki Kazuhito, Kunishima Munetaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Hydrophobic Substrate Selective Dehydrative Condensations at the Emulsion Interface under Conditions where Competitive Reactions Proceed in the Bulk Aqueous Phase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 e202200602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajoc.202200602	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 Horie Saki, Mishihiro Kenji, Nishino Mio, Domae Inori, Wakasugi Mitsuo, Matsunaga Tsukasa, Kunishima Munetaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Epitope-Based Specific Antibody Modification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26434/chemrxiv-2023-c0k4n	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Saki Horie, Hikaru Fujita, Rina Yamashita, Munetaka Kunishima
2. 発表標題 Conjugation of an aminopyridine-based nucleophilic catalyst to aliphatic primary amines in aqueous media using an N-hydroxysuccinimide ester reagent
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江彩紀, 三代憲司, 西野未桜, 堂前いのり, 若杉光生, 松永司, 国嶋崇隆
2. 発表標題 抗体の新規化学修飾法の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀江彩紀、三代憲司、西野未桜、堂前いのり、若杉光生、松永司、国嶋崇隆
2. 発表標題 エピトープ構造を利用する抗体のFab領域修飾法の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第17回年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	三代 憲司 (Mishiro Kenji) (60776079)	金沢大学・新学術創成研究機構・准教授 (13301)	
研究分担者	藤田 光 (Fujita Hikaru) (40782850)	金沢大学・薬学系・助教 (13301)	
研究分担者	松本 拓也 (Matsumoto Takuya) (40800214)	金沢大学・薬学系・助教 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	松永 司 (Matsunaga Tsukasa) (60192340)	金沢大学・薬学系・教授 (13301)	

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