

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22710219

研究課題名（和文）リガンド結合タンパク質の網羅的解析を指向したタンパク質分離用樹脂の開発

研究課題名（英文）Development of the affinity matrix for comprehensive analysis of ligand-binding proteins

研究代表者

倉持 幸司（KURAMOCHI KOUJI）

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90408708

研究成果の概要（和文）：医薬品などの生物活性物質の多くは生体内の特定の受容体に結合して作用を発揮する。本研究では樹脂に生物活性物質を結合させ、(1) それに相互作用する受容体タンパク質を探索する研究、(2) 樹脂表面を化学修飾し、受容体タンパク質を高収率で回収する樹脂の開発を行った。その結果、環境汚染物質や植物フラボノイドの新規受容体タンパク質を明らかにし、受容体タンパク質を効率的に捕捉・回収する樹脂を開発することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Bioactive compounds such as drugs and toxins generally show their activities by interacting with their specific receptors. In this study, we explored the binding proteins of perfluorooctanesulfonic acid, which is a man-made fluorosurfactant and global pollutant, and apigenin, which is a natural product belonging to the flavone. We also developed a novel affinity matrix for purifying the binding proteins of bioactive compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ケミカルバイオロジー、アフィニティー精製、ファージディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

従来は結合親和性を利用した標的分子の探索では、リガンド（薬剤や生物活性物質など）と強く相互作用するタンパク質に注目が集まり、リガンド低親和性タンパク質は無視されている場合が多かった。しかしながら、リガンド低親和性タンパク質の中にはリガンドの作用・副作用などに深く関与するタンパク質も存在し、これら結合タンパク質群を解析する技術が必要とされていた。

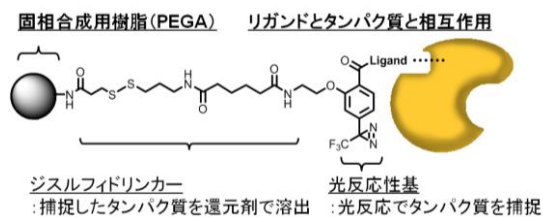
2. 研究の目的

本研究では、固相合成用樹脂に独自の設計で化学修飾を施し、リガンドに結合するタンパク質群を網羅的に捕捉・回収する分離用樹脂を開発することを目標にした。

分離用樹脂として、独自に設計した図1の樹脂を合成する。この樹脂は、固相合成用樹脂である PEGA にジスルフィド基を有する疎水性リンカーと光反応基としてのジアジリ

ンを導入したものである。この樹脂を用いてリガンドと相互作用するタンパク質を光反応により捕捉し、還元剤でリンカーを切断することで、結合タンパク質を回収する。

図 1. 分離用樹脂の設計・合成



3. 研究の方法

従来の固相合成用樹脂を用いたリガンド結合タンパク質の探索と新規分離用樹脂の合成と性能評価を同時並行で検討した。

(1) 従来法によるリガンド結合タンパク質の探索

① 環境汚染物質 ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) の新規結合タンパク質の探索

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) は強力な界面活性剤として、撥水剤、表面処理剤、消火剤等に用いられてきた。しかしながら近年 PFOS の環境残留性及び生体蓄積性が明らかとなり、環境中での分布や挙動、生体に対する毒性に関する研究が世界各国で行われている。我々は固相合成樹脂 PEGA 上に PFOS 誘導体を合成し、合成した PFOS 固定樹脂を用い、ファージディスプレイ法により PFOS 結合タンパク質を探索した。

② 植物フラボノイド アピゲニンの新規結合タンパク質の探索

アピゲニンは多くの植物に含まれるフラボンであり、抗酸化活性やアポトーシス誘導活性などの多様な生物活性を有する。我々は、アピゲニンを固相合成用樹脂 PEGA に固定し、次世代シークエンサーを用いたファージディスプレイ法によりアピゲニン結合タンパク質を探索した。

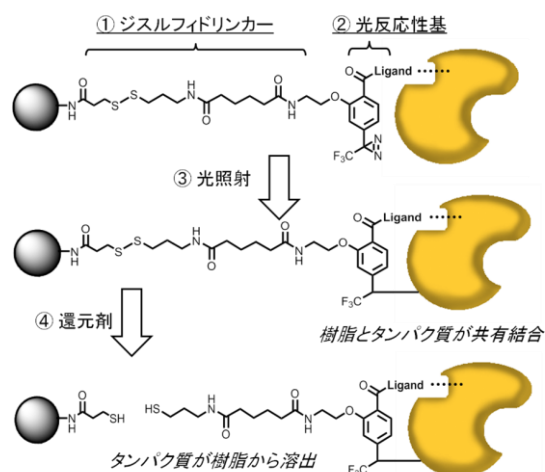
(2) 新規分離用樹脂の合成と性能評価

本分離用樹脂を用いたリガンド結合タンパク質のアフィニティー精製の概要を図 2 にまとめる。まず樹脂上のリガンドとタンパク質を相互作用させる。この際、特定波長の光を照射すると、樹脂表面の光反応性基が分解すると共に、結合タンパク質と共有結合する。夾雑物を洗浄除去した後、還元剤を添加すると、樹脂から結合タンパク質が遊離する。

このコンセプトを確認するために、標的タンパク質としてレクチンの一種である Concanavalin A (Con A) を選んだ。Con A はリ

ガンドであるマンノース単糖との相互作用が $K_d = 10^{-4} \text{ M}$ 程度であり、Con A とマンノース単糖の相互作用は非常に弱いことが知られている。本研究では、マンノースを樹脂に固定し、Con A を高収率で回収することを目標とした。その過程で、本樹脂によるリガンド低親和性タンパク質を捕捉・回収する技術基盤の確立を目指した。

図 2. 本樹脂を用いたアフィニティー精製の概要



4. 研究成果

(1) 従来法によるリガンド結合タンパク質の探索

① 環境汚染物質 ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) の新規結合タンパク質の探索

固相合成樹脂 PEGA 上に PFOS 誘導体を合成した (図 3)。市販の 1H,1H,10H,10H-ヘキサデカフルオロ-1,10-デカンジオールを出発原料として、液相合成にて化合物 1 を合成した。アミノ PEGA 樹脂と化合物 1 をカップリングさせ樹脂 2 を調製後、末端のメトキシベンジル基を脱保護して樹脂 3 を合成した。最後に末端の水酸基に三酸化硫黄を反応させて、PFOS 誘導体固定樹脂 4 を合成することに成功した。

合成した PFOS 誘導体固定樹脂を用い、ファージディスプレイ法により PFOS 結合タンパク質を探索した。その結果、CD14 を結合タンパク質として同定することに成功した。また PFOS / CD14 間相互作用は表面プラズモン共鳴装置 Biacore を用いて解析し、解離定数を $K_d = 5.83 \times 10^{-5} \text{ M}$ と算出した (図 3)。ヒト CD14 タンパク質はラットマクロファージ RAW264.7 細胞に炎症性サイトカイン TNF- α の産生を誘導するが、PFOS は CD14 の TNF- α の産生誘導を阻害することがわかった。この結果から CD14 は PFOS の標的タンパク質の一つであることを明らかにした。

図 3. PFOS 誘導体固定 PEGA 樹脂の合成

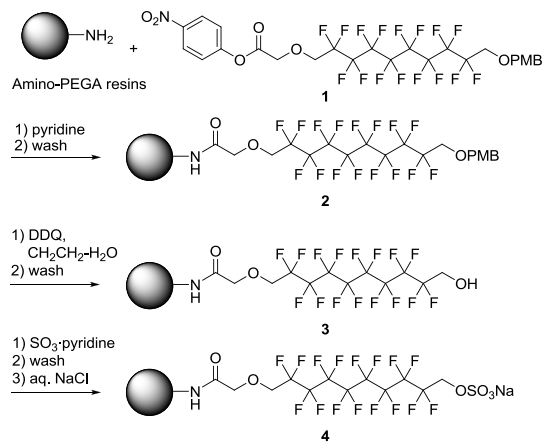
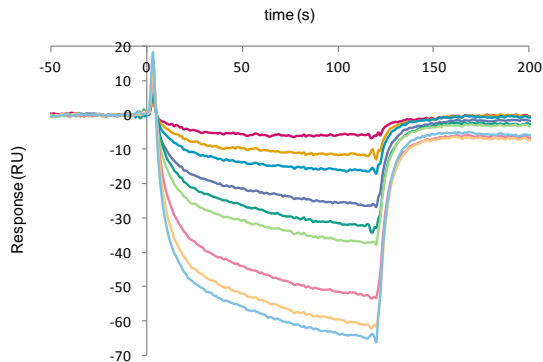


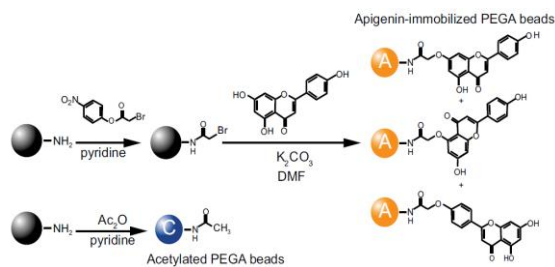
図 4. 表面プラズモン共鳴装置を用いた PFOS-CD14 間相互作用解析



② 植物フラボノイド アピゲニンの新規結合タンパク質の探索

市販のアミノ PEGA 樹脂にプロモ酢酸ユニットを導入した後、塩基性条件下アピゲニンを固定した (図 5)。アピゲニン分子には 3 つの水酸基が存在するため、アピゲニンは三か所の水酸基の位置で固定されたと推定される。このアピゲニン固定 PEGA 樹脂とヒト乳がん由来 cDNA ライブラリーを用いて、ファージディスプレイ法によるアピゲニン結合タンパク質を探索した。このスクリーニングでは、アピゲニンと相互作用するファージクローンが有する挿入 cDNA を次世代シーケンサーにより解析を行い、一挙に 160 種類のアピゲニン結合タンパク質を同定することに成功した。

図 5. アピゲニン固定樹脂の合成



(2) 新規分離用樹脂の合成と性能評価

図 5 に示す目的の分離用樹脂を合成することに成功した。実験には、蛍光標識化した Con A (FITC-Con A) を使用し、光照射後・還元剤処理後の樹脂を蛍光顕微鏡で観察した。タンパク質と樹脂の結合実験の手法は以下の通りである。

- ① FITC-Con A を樹脂と相互作用させた後、光 (波長: 365 nm) を 1 時間照射した。
- ② 樹脂を洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。
- ③ 2-メルカプトエタノール (2-ME) を加え、ジスルフィドリンカーを切断した。
- ④ 還元剤処理後の樹脂を洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

なお、コントロールとして、光非照射の樹脂を用意し、同様の操作を行った。

この実験結果を図 6 に示す。光照射した樹脂 (a) の蛍光は、光非照射の樹脂 (c) と比較し十分強かった。これは、樹脂が光照射により FITC-Con A を捕捉したことを表している。樹脂 (c) は光照射した樹脂 (a) を還元剤処理したもので、観察された蛍光は還元剤処理前より弱くなった。つまり、樹脂が光照射により捕捉した FITC-Con A は、還元剤処理により放出されたことを示す。実験の諸条件の最適化が必要だが、当初の目的である機能性樹脂の開発に成功した。

図 6. 合成した分離用樹脂

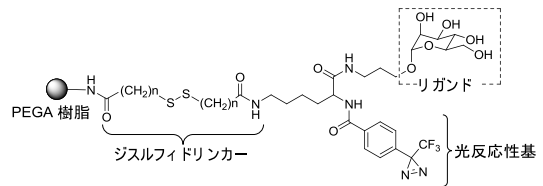
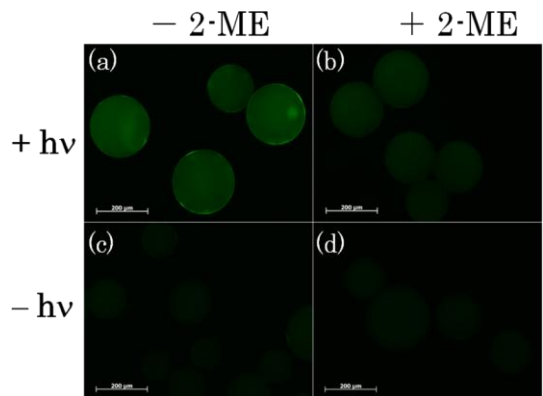


図 6. 樹脂と FITC-Con A の相互作用の蛍光顕微鏡写真



樹脂と FITC-Con A を相互作用させ、光照射後洗浄し (a)、続けて還元剤処理し洗浄した (b)。同様に、光を照射せずに洗浄し (c)、続けて還元剤処理し洗浄した (d)。

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 5 件)

- ① Daniel Arango, Kengo Morohashi, Alper Yilmaz, Kouji Kuramochi, Arti Parihar, Bledi Brahimaj, Erich Grotewold, and Andrea I. Doseff. Molecular basis for the action of a dietary flavonoid revealed by the comprehensive identification of apigenin human targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 審査有, Vol. 110, **2013**, E2153-2162. DOI: 10.1073/pnas.1303726110
- ② Tomoe Kusayanagi, Senko Tsukuda, Satomi Shimura, Daisuke Manita, Kanako Iwakiri, Shinji Kamisuki, Yoichi Takakusagi, Toshifumi Takeuchi, Kouji Kuramochi, Atsuo Nakazaki, Kengo Sakaguchi, Susumu Kobayashi, Fumio Sugawara, The antitumor agent doxorubicin binds to Fanconi anemia group F protein, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 審査有, Vol. 20, **2012**, 6248-6255. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.09.015
- ③ Yuka Miyano, Senko Tsukuda, Ipei Sakimoto, Ryo Takeuchi, Satomi Shimura, Noriyuki Takahashi, Tomoe Kusayanagi, Yoichi Takakusagi, Mami Okado, Yuki Matsumoto, Kaori Takakusagi, Toshifumi Takeuchi, Shinji Kamisuki, Atsuo Nakazaki, Keisuke Ohta, Masahiko Miura, Kouji Kuramochi, Yoshiyuki Mizushima, Susumu Kobayashi, Fumio Sugawara, Kengo Sakaguchi, Exploration of the binding proteins of perfluorooctane sulfonate by a T7 phage display screen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 審査有, Vol. 20, **2012**, 3985-3990. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.05.016
- ④ Mihoko Takami, Yoichi Takakusagi, Kouji Kuramochi, Senko Tsukuda, Satoko Aoki, Kengo Morohashi, Keisuke Ohta, Susumu Kobayashi, Kengo Sakaguchi, Fumio Sugawara, A screening of a library of T7 phage-displayed peptide identifies E2F-4 as an etoposide-binding protein, *Molecules*, 審査有, Vol. 16, **2011**, 4278-4294. DOI: 10.3390/molecules16054278
- ⑤ Kengo Morohashi, Hiroeki Sahara, Koichi Watashi, Kazuki Iwabata, Takashi Sunoki, Kouji Kuramochi, Kaori Takakusagi, Hiroki Miyashita, Noriyuki Sato, Atsushi Tanabe, Kunitada Shimotohno, Susumu Kobayashi, Kengo Sakaguchi, Fumio Sugawara, Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin

B, *PLoS ONE*, 審査有, Vol. 6, **2011**, e 18285. DOI: 10.1371/journal.pone.0018285

[学会発表] (計 4 件)

- ①宮野 友香、九十田 千子、崎元 一平、武内 亮、志村 聡美、高橋 德行、草柳 友恵、高草木 洋一、岡戸 真実、松本 勇記、高草木 香織、竹内 倫文、紙透 伸治、中崎 敦夫、太田 慶祐、三浦 雅彦、倉持 幸司、水品 善之、小林 進、菅原 二三男、坂口 謙吾、固相合成とファージディスプレイ法を組み合わせた PFOS 結合タンパク質の探索、日本農芸化学会関西支部大会、日本農芸化学会関西支部大会、平成 24 年 9 月 29 日、京都学園大学 (京都府)
- ②倉持 幸司、生物活性の探索と解明を指向した有用化合物の合成研究と化学生物学的研究、日本農芸化学会 関西支部 第 474 回講演会、平成 24 年 5 月 26 日、京都府立大学 (京都府) ; 招待講演
- ③倉持 幸司、生物活性の探索と解明を指向した有用化合物の合成研究と化学生物学的研究、日本農芸化学会 2012 年度大会、平成 24 年 3 月 22 日、ウェスティン都ホテル京都 (京都府) ; 招待講演
- ④倉持 幸司、光固定化とファージディスプレイ法を融合した薬剤結合タンパク質の探索、生物化学的測定法研究会、第 16 回学術シンポジウム、平成 23 年 11 月 2 日、京都高度技術研究所 (京都府) ; 招待講演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉持 幸司 (KURAMOCHI KOUJI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究・准教授

研究者番号 : 90408708