

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 4 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710227

研究課題名（和文） 光反応性アミノ酸を利用した生理活性低分子化合物の標的タンパク質同定法の開発

研究課題名（英文） Detection of the direct interaction between bioactive small molecule and its target protein using photoreactive amino acid

研究代表者

中栄 功一（NAKAE KOICHI）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：20390776

研究成果の概要（和文）：

細胞に対して様々な表現系を誘導する生理活性低分子化合物の作用機構を解析することは新たな生命現象の解明及び創薬研究の基礎研究にも寄与する。そこで本研究では、作用機構解析に重要である生理活性低分子化合物の直接的な標的分子同定研究法の新たな選択肢の開発を目的とし、光反応基を持つアミノ酸を用いることにより生理活性低分子化合物と相互作用している標的蛋白質を検出した。その結果、本手法により相互作用蛋白質の検出感度が上昇することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

The analysis of the biological mechanism of small bioactive molecules in cells contributes to not only the basic research but also drug discovery research. For analyzing the mechanism of bioactive molecules, one of their approaches is to detect the direct interaction between small molecules and its target protein. Although this approach is quite effective and conducted breakthrough results, success probability is still not enough. In this research, in addition to the existing technique, it aims to provide one of the alternative methods for the direct detection technique. In detail, after preparing the cells incorporated the photoreactive amino acids in their protein and bioactive molecules attached to detecting moiety, we mixed these materials and induced covalent cross-linking between bioactive molecule and its target protein by radiating ultraviolet. Finally this approach appeared to improve the detection sensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

多様な表現形を誘導する生理活性低分子

化合物はこれまで様々な疾患の治療に用いられるのみならず、生命現象を解明するツールとして重要な役割を果たしてきた。その中で低分子化合物がどのような標的に作用しているかを明らかにすることは非常に重要な研究課題となっており、その直接的な研究手法の一つは低分子化合物の標的タンパク質を単離精製し、同定することである。これまでの主な手法としては低分子化合物をビオチン化し細胞溶解液中にて標的タンパク質と相互作用させ、ストレプトアビジンアガロース担体等により標的タンパク質を精製する手法、光反応性標識法として低分子化合物に光反応官能基を導入し、標的タンパク質とクロスリンクさせ検出する方法、または放射性同位元素を用い、高感度に検出する手法が用いられている。しかしながら上記に挙げた手法による標的タンパク質の生化学的な単離精製は一般に困難を伴う研究手法として知られており、新たな選択肢を与える手法の開発はその障壁を乗り越える一助となることが期待されていた。

2. 研究の目的

これまでも低分子化合物の標的蛋白質同定法の開発は多く試みられている。その中で特に多くの工夫が試みられてきたのは主に以下の二点であった。一点目は、低分子の標識化である。主な手法としてはビオチン化誘導体の作製、光標識ラベル化誘導体、ラジオアイソトープ標識化誘導体、また近年ではクリックケミストリーを用いた誘導体作成も開発されている。もう一点は標識化低分子化合物と標的蛋白質の複合体を単離するための単離手段としての担体カラムの作製や、アガロースや磁気ビーズ等に工夫を凝らして単離を試みるものであった。本研究計画ではこれまで検討されていない、標的となる蛋白質に焦点を当て、光反応性アミノ酸を細胞培養液に加えることにより蛋白質自身を標識し、低分子化合物と標的蛋白質を共有結合させる手法について検討することとした。また既存の方法と比較するため、検出感度及び関連蛋白質等の検出についても検討し、新たな選択肢の一つとなりうるか検証することとした。

3. 研究の方法

通常の細胞培養液構成成分からロイシン、メチオニンを取り除いたものにジアジリン基の導入された光反応性ロイシン (L-2-amino-4, 4-azi-pentanoic acid) 及び光反応性メチオニン (L-2-amino-5, 5-azi-hexanoic acid) を加え、透析済 FBS を用いることにより、効率的な細胞構成成分の蛋白質標識化を図った。また検出用低分子化合物としてビオチン化マイグラスタチン、

ビオチン化 FK506、ビオチン化プロンコジンを作製した。これらの検出用低分子化合物及び市販のビオチン化ゲルダナマイシン誘導体をそれぞれ生細胞に処理後、光クロスリンク (345 nm) を行い、細胞を溶解後、電気泳動後に銀染色またはウエスタンブロッティング等を行うと共に ELISA による検出感度の定量を行った。

4. 研究成果

(1)

ヒト滑膜肉腫細胞 SW982 にヒト FK506 結合タンパク質を安定的に強制発現させた細胞を構築したのち、光標識メチオニンを取り込ませ一晩培養後、生細胞を回収し、ビオチン化 FK506 を処理後光反応を行った。その後、細胞を溶解し、NeutrAvidin アガロースビーズを用いて精製後、回収したサンプルを電気泳動し、標的蛋白質である FK506 結合蛋白質の検出を行った。その結果、ビオチン化 FK506 による FK506 結合蛋白質の検出は光クロスリンクを行うことにより、その検出シグナルが増すことが明らかとなった (図 1)。また FK506 結合タンパク質と複合体を形成している calcineurin A, calcineurin B 及び、calcalmodulin との共有結合に伴う複合体は検出されなかった。

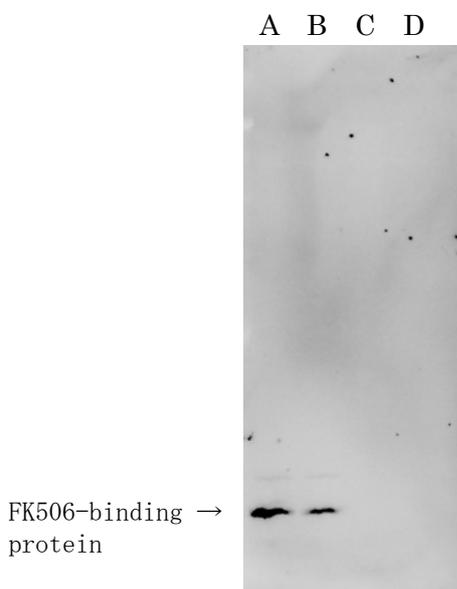


図 1 ウエスタンブロッティングによる検出
lane A: ビオチン化 FK506 処理 (+)、光反応クロスリンク (+), lane B: ビオチン化 FK506 処理 (+)、光反応クロスリンク (-), lane C: ビオチン化 FK506 処理 (-)、光反応クロスリンク (+), lane D: ビオチン化 FK506 処理 (-)、光反応クロスリンク (-)

(2)

ヒト滑膜肉腫細胞 SW982 にヒト FK506 結合タンパク質を安定的に強制発現させた細胞を使い、光標識メチオニンを取り込ませ一晩培養後、生細胞を回収したのちビオチン化 FK506 を処理し、光クロスリンク反応を行った。細胞を溶解後、得られた溶解液を各種濃度で 96 ウェルプレートに吸着させ、Streptavidin-HRP を用いて化学発光により検出を行った。その結果、ビオチン化 FK506 による FK506 結合蛋白質の検出は光クロスリンクを行うことにより検出限界が向上した。またいずれの検出ポイントにおいても光クロスリンクを行うと S/N が高く (A/C>B/D) なることが明らかとなった (図 2)。

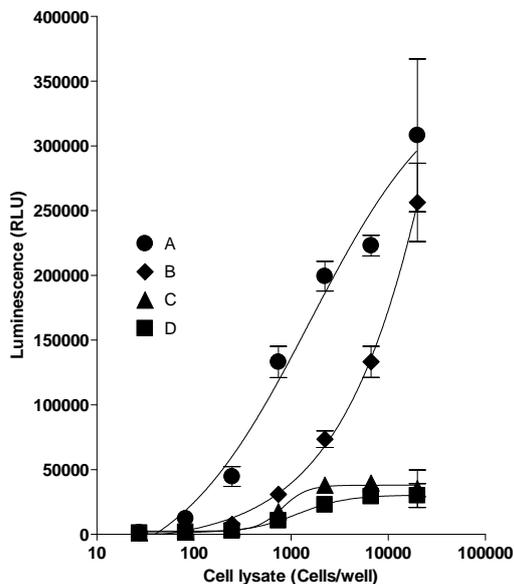


図 2 ELISA 法による検出

lane A: ビオチン化 FK506 処理 (+)、光反応クロスリンク (+), lane B: ビオチン化 FK506 処理 (+)、光反応クロスリンク (-), lane C: ビオチン化 FK506 処理 (-)、光反応クロスリンク (+), lane D: ビオチン化 FK506 処理 (-)、光反応クロスリンク (-)

(3)

ゲルダナマイシンの標的である HSP90、マイグラストチン誘導体の標的である fascin、プロンコジン、サッカスリジン、プロンコリンの標的である NQ01 についても、ビオチン化ゲルダナマイシン、ビオチン化マイグラストチン、ビオチン化プロンコジンやサッカスリジン、プロンコリンをバイオプローブとして用い、標的蛋白質の検出を試みた。しかしながら標的蛋白質の検出には至らなかった。

本手法の有用性については今後もより多くの低分子化合物を用いてその評価を行うことが必要である。しかしながら一部の使用

プローブでは高感度検出が可能となったことから、本手法は低分子化合物の標的蛋白質検出法の新たな選択肢の一つとなりうることが示唆された。

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 2 件)

① Nakae K, Adachi H, Sawa R, Hosokawa N, Hatano M, Igarashi M, Nishimura Y, Akamatsu Y and Nomoto A. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQ01)-bioactivated pronquodine A regulates prostaglandin release from human synovial sarcoma cells J. Natural Products, 2013, 76: 510-515 DOI:10.1021/np300643f 査読あり

② Nakae K, Kurata I, Kojima F, Igarashi M, Hatano M, Sawa R, Kubota Y, Adachi H, Nomoto A. Sacchathridine A, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix* sp. J. Natural Products, 2013, 76: 720-722 DOI: 10.1021/np3006327 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

① 中栄功一、倉田育子、細川信夫、波多野和樹、五十嵐雅之、久保田由美子、澤 竜一、西村吉雄、安達勇光、野本明男；放線菌代謝産物から得られた新規プロスタグランジン放出阻害物質 pronquoline に関する研究：日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 25 日 (仙台)

② 中栄功一、安達勇光、細川信夫、五十嵐雅之、波多野和樹、澤 竜一、久保田由美子、倉田育子、西村吉雄、赤松穰、野本明男；新規天然化合物 pronquodine A は生体内の NQ01 により活性化され、プロスタグランジンの産生を抑制する：日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会、2012 年 6 月 8 日 (京都)

③ 中栄功一、倉田育子、小島露子、五十嵐雅之、波多野和樹、澤 竜一、久保田由美子、安達勇光、野本明男；放線菌代謝産物から得られた新規プロスタグランジン放出阻害物質 sacchathridine A に関する研究：日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日 (京都)

④ 中栄功一、細川信夫、小島露子、五十嵐雅之、木下直子、澤 竜一、久保田由美子、増田 徹、大庭俊一、安達勇光、西村吉雄、

赤松 穰、野本明男；放線菌代謝産物から得られた新規プロスタグランジン放出阻害物質 pronodine A に関する研究：日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 月 26 日（京都）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中栄 功一 (NAKAE KOICHI)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：20390776