

令和 7 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H02217・23K23484

研究課題名（和文）酵素活性の網羅的解析（enzymomics）に基づく疾患診断基盤技術の開発

研究課題名（英文）Advance of enzymomics study for establishment of disease diagnosis platform

研究代表者

小松 徹（Komatsu, Toru）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：40599172

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：自動合成を用いたプローブ合成、規格化された計測条件の設定、バイアスをかけずに1分子計測データを解析することができる解析系の構築、をもって、安定してデータを蓄積していくことが可能な仕組みを整備することに成功した。開発した技術について研究期間中に6件の特許出願がおこなわれ、個別の実験系開発およびバイオマーカーの発見に係る研究成果が J. Am. Chem. Soc. 誌、Chem. Sci. 誌、Adv. Sci. 誌、Cell Rep. Methods 誌などに掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで 10^6 - 10^9 分子を集団として扱うことが通常であったタンパク質機能解析において、1分子レベルの網羅的解析をおこなうという概念を導入し、その実用性を示すことに成功したことで、新たなタンパク質機能解析の方法論の提案に繋がった（総説投稿中）。また、研究成果の実用化については、研究期間中に申請された特許6件のうち5件について、研究機関である東京大学と腫瘍がんをはじめとする疾患の早期診断技術の開発を目指す大学発スタートアップ企業の間でライセンス契約が締結され、成果の社会実装に向けた先鞭がつけられた。

研究成果の概要（英文）：We have established the enzymomics platform based on single-molecule enzyme activity assay by establishment of (1) automated probe synthesis platform, (2) standardized assay platform, and (3) non-biased data analysis method. During the research period, 6 patents were applied, and the individual results of biomarker discovery was reported in journals such as J. Am. Chem. Soc., Chem. Sci., Adv. Sci., and Cell Rep. Methods.

研究分野：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 創薬化学

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、酵素の生きた機能である活性の評価を可能とする方法論「enzymomics (enzyme の omics)」の方法論を提案し、これを用いた疾患関連タンパク質の機能異常の発見と理解を進めてきた。特に、タンパク質の機能異常を基盤とした疾患診断は activity-based diagnostics という言葉をもってその重要性が提唱されており、これに用いるバイオマーカーを発見し得る研究代表者らの方法論は、その発展が強く期待されるものであった。

本研究では、enzymomics の方法論の超高感度化、網羅化を達成する実験系を開発し、リキッドバイオプシー法を用いた血液中の酵素活性の異常の理解に基づく疾患の理解を実現する基盤技術構築を目指しておこなわれた。研究開発開始当初、1分子酵素活性計測を背景とした疾患診断の方法論の端緒となる成果が得られていたものの、血液中あるいは他の体液中でどのような酵素がどれくらい存在していて、どのような酵素が疾患と関わって異常をきたすかといった知見はほとんど得られておらず、本研究では1分子酵素活性計測系の網羅化と規格化した計測系による測定データの蓄積をもって、この理解を進めていくことが強く求められていた。

2. 研究の目的

研究代表者らが開発した生体サンプル中の1分子酵素活性の計測技術は、微細加工技術によって調整された多数のマイクロチャンバーを有するデバイスに十分に希釈したサンプルをロードすることによって酵素分子を確率的に1分子ずつ分画した状態で酵素の活性解析をおこなう1分子酵素活性計測法に基づいている。その概念実証 (S. Sakamoto et al. *Sci. Adv.* 2020) を受け、これを一般化するために以下の2点に注力した技術開発をおこなった。

(1) 合成系の一般化

従来の蛍光プローブの有機合成は、一般的な有機合成によって進められ、各ステップの反応、精製の過程はそれぞれ研究者の試行錯誤によって進められ、1つのプローブの合成に月~年の日時を要することも珍しくない。申請者らは、バイオマーカー酵素の活性探索、評価のプロセスを加速させるため、規格化された条件で多様なプローブ合成を可能とするため、Phos-tag を用いた固相抽出による synthesis-based on affinity separation (SAS) 法を利用した迅速な蛍光プローブの合成、精製法の確立を目指した研究をおこなった。

(2) 計測、データ解析の一般化

1分子アッセイに用いるマイクロデバイスは、現在自作のものを用いているが、市販のマイクロデバイスと分注装置を用いて大量のデータを再現性よく計測する仕組みを構築していることを目指した。これによって得られる大量の計測データに対し、その特徴量を抽出して群間比較をおこなう解析プラットフォームを研究分担者の水野忠快助教(東京大学)と共同で開発し、規格化された条件で計測された血液中、組織中の大量の酵素活性データの間の比較をおこなう仕組みを確立することを目指した。

3. 研究の方法

自動合成を用いたプローブ合成、規格化された計測条件の設定、バイアスをかけずに1分子計測データを解析することができる解析系の構築をもって、安定してデータを蓄積していくことが可能な基盤の整備をおこなった。これにより、各種バイオマーカーの発見の大幅な加速が期待される状況となった。

(1) 合成系の一般化

Phos-tag を用いた SAS 法を確立するため、各種条件検討を進め、1分子酵素活性計測に用いることができる蛍光プローブの並列合成を可能とする新たな合成法を確立し、100種類以上の新規の1分子酵素活性計測系の構築に繋げる成果を得た。これを用いて各種疾患に関係する血液サンプルの解析をおこない、疾患と関わる機能異常を多数見出すことに成功した。

(2) 計測、データ解析の一般化

市販のマイクロデバイスを用いたアッセイをおこなう仕組みを構築し、これに合わせた適切な測定条件の設定をおこなった。特に、マイクロデバイスへのサンプルのロードの過程を自動化する仕組みを構築し、測定間の誤差を大きく抑えて安定したデータを取得することができる仕組みを構築した。また、市販のデバイスを用いた際に紫外光の透過率が著しく低いなどの課題が生じたため、合成系の一般化の仕組みを更に拡張して、従来の紫外光励起の蛍光団から可視光励起可能な各種蛍光団を新規開発し、これらを使ったアッセイ系の構築をおこなった。

4. 研究成果

開発したアッセイ系を用いて、膵臓がん (S. Sakamoto et al. *Cell Rep. Methods* 2024)、大腸がん (N. Nagano et al. *Chem. Sci.* 2023)、脳腫瘍 (M. Minoda et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2025)、肝障害 (T. Ukegawa et al. *Adv. Sci.* 2023) の1分子酵素活性バイオマーカーの発見に繋げ、それぞれ論文発表をおこなった。また、これらの発見に繋がる各種プローブの基本設計について、特許出願をおこなった (特願 2023-527924, PCT/JP2023/017768, PCT/JP2023/007926, 特願 2023-113583, 特願 2024-207054, 24-0038-001WO01)。

これらの研究成果を活用し、特に膵臓がんの早期診断技術の社会実装に繋げる試みが大学発スタートアップ企業によって進められており、本研究の成果の実用化に向けた端緒を与えることができたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hanaoka Kenjiro, Ikeno Takayuki, Iwaki Shimpei, Deguchi Sayaka, Takayama Kazuo, Mizuguchi Hiroyuki, Tao Fumiya, Kojima Nobuhiko, Ohno Hisashi, Sasaki Eita, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Maeda Kazuya, Kusahara Hiroyuki, Urano Yasuteru	4. 巻 10
2. 論文標題 A general fluorescence off/on strategy for fluorogenic probes: Steric repulsion-induced twisted intramolecular charge transfer (sr-TICT)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 adi8847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adi8847	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 Sakamoto Shingo, Hiraide Hideto, Minoda Mayano, Iwakura Nozomi, Suzuki Misa, Ando Jun, Takahashi Chiharu, Takahashi Ikuko, Murai Kazue, Kagami Yu, Mizuno Tadahaya, Koike Tohru, Nara Satoshi, Morizane Chigusa, Hijioka Susumu, Kashiyo Ayumi, Honda Kazufumi, Watanabe Rikiya, Urano Yasuteru, Komatsu Toru	4. 巻 4
2. 論文標題 Identification of activity-based biomarkers for early-stage pancreatic tumors in blood using single-molecule enzyme activity screening	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100688 ~ 100688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2023.100688	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 Kuriki Yugo, Sogawa Mari, Komatsu Toru, Kawatani Minoru, Fujioka Hiroyoshi, Fujita Kyohei, Ueno Tasuku, Hanaoka Kenjiro, Kojima Ryosuke, Hino Rumi, Ueo Hiroki, Ueo Hiroaki, Kamiya Mako, Urano Yasuteru	4. 巻 146
2. 論文標題 Modular Design Platform for Activatable Fluorescence Probes Targeting Carboxypeptidases Based on ProTide Chemistry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 521 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.3c10086	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 Ukegawa Tatsuya, Komatsu Toru, Minoda Mayano, Matsumoto Takuya, Iwasaka Takumi, Mizuno Tadahaya, Tachibana Ryo, Sakamoto Shingo, Hanaoka Kenjiro, Kusuhara Hiroyuki, Honda Kazufumi, Watanabe Rikiya, Urano Yasuteru	4. 巻 11
2. 論文標題 Thioester Based Coupled Fluorogenic Assays in Microdevice for the Detection of Single Molecule Enzyme Activities of Esterases with Specified Substrate Recognition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 2306559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202306559	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 Nagano Norimichi, Ichihashi Yuki, Komatsu Toru, Matsuzaki Hiroyuki, Hata Keisuke, Watanabe Toshiaki, Misawa Yoshihiro, Suzuki Misa, Sakamoto Shingo, Kagami Yu, Kashiro Ayumi, Takeuchi Keiko, Kanemitsu Yukihide, Ochiai Hiroki, Watanabe Rikiya, Honda Kazufumi, Urano Yasuteru	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of fluorogenic substrates for colorectal tumor-related neuropeptidases for activity-based diagnosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 4495 ~ 4499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2SC07029D	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 Kuriki Yugo, Yoshioka Takafusa, Kamiya Mako, Komatsu Toru, Takamaru Hiroyuki, Fujita Kyohei, Iwaki Hirohisa, Nanjo Aika, Akagi Yuki, Takeshita Kohei, Hino Haruaki, Hino Rumi, Kojima Ryosuke, Ueno Tasuku, Hanaoka Kenjiro, Abe Seiichiro, Saito Yutaka, Nakajima Jun, Urano Yasuteru	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of a fluorescent probe library enabling efficient screening of tumour-imaging probes based on discovery of biomarker enzymatic activities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 4474 ~ 4481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1sc06889j	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 Hoshino Yuki, Hanaoka Kenjiro, Sakamoto Kei, Yasunaga Masahiro, Kojima Takashi, Kotani Daisuke, Nomoto Ayumu, Sasaki Eita, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Takamaru Hiroyuki, Saito Yutaka, Seto Yasuyuki, Urano Yasuteru	4. 巻 3
2. 論文標題 Molecular design of near-infrared (NIR) fluorescent probes targeting exopeptidase and application for detection of dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 859 ~ 867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CB00253H	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 Hanaoka Kenjiro, Iwaki Shimpei, Yagi Kiyoshi, Myochin Takuya, Ikeno Takayuki, Ohno Hisashi, Sasaki Eita, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Uchigashima Motokazu, Mikuni Takayasu, Tainaka Kazuki, Tahara Shinya, Takeuchi Satoshi, Tahara Tahei, Uchiyama Masanobu, Nagano Tetsuo, Urano Yasuteru	4. 巻 144
2. 論文標題 General Design Strategy to Precisely Control the Emission of Fluorophores via a Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19778 ~ 19790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c06397	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 Kawashima Shun, Yoshida Daisuke, Yoshioka Takafusa, Ogasawara Akira, Fujita Kyohei, Yanagiya Masahiro, Nagano Masaaki, Konoeda Chihiro, Hino Haruaki, Kitano Kentaro, Sato Masaaki, Hino Rumi, Kojima Ryosuke, Komatsu Toru, Kamiya Mako, Urano Yasuteru, Nakajima Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 Rapid imaging of lung cancer using a red fluorescent probe to detect dipeptidyl peptidase 4 and puromycin-sensitive aminopeptidase activities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12665-9	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 Yanagi Kouichi, Komatsu Toru, Fujikawa Yuuta, Kojima Hirotsu, Okabe Takayoshi, Nagano Tetsuo, Ueno Tasuku, Hanaoka Kenjiro, Urano Yasuteru	4. 巻 6
2. 論文標題 Development of pathway-oriented screening to identify compounds to control 2-methylglyoxal metabolism in tumor cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-023-00864-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 Nagano Norimichi, Ichihashi Yuki, Komatsu Toru, Matsuzaki Hiroyuki, Hata Keisuke, Watanabe Toshiaki, Misawa Yoshihiro, Suzuki Misa, Sakamoto Shingo, Kagami Yu, Kashiro Ayumi, Takeuchi Keiko, Kanemitsu Yukihide, Ochiai Hiroki, Watanabe Rikiya, Honda Kazufumi, Urano Yasuteru	4. 巻 in press
2. 論文標題 Development of fluorogenic substrates for colorectal tumor-related neuropeptidases for activity-based diagnosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2SC07029D	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 8件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Toru Komatsu
2. 発表標題 Development of single-molecule enzyme activity profiling platform for activity-based diagnosis of early stage pancreatic tumor
3. 学会等名 国際交流シンポジウム 次世代薬学 アジアシンポジウム（日本薬学会 第 144 年会）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小松徹
2. 発表標題 有機小分子蛍光プローブと1分子計測技術の融合による血液中1分子酵素活性網羅的解析技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第 144 年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小松徹
2. 発表標題 1分子レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術基盤の開発と応用
3. 学会等名 バイオインタラクション（BIRA）研究会 第 23 回ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小松徹，渡邊力也，水野忠快，本田一文，坂本眞伍
2. 発表標題 1分子レベルのタンパク質機能検出による疾患診断技術の開発
3. 学会等名 第 40 回メディシナルケミストリーシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小松徹
2. 発表標題 Proteoform レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発
3. 学会等名 第 1 回 ATF コンファレンス 2023年11月13日 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小松徹
2. 発表標題 Proteoform レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発
3. 学会等名 レドックス R&D 戦略委員会 第 2 回 夏のシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小松徹
2. 発表標題 1 分子レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発
3. 学会等名 千里ライフサイエンス振興財団 新適塾「未来創薬への誘い」第57回講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松徹
2. 発表標題 1 分子レベルの酵素活性網羅的解析に基づく 疾患診断技術の開発
3. 学会等名 第 16 回メタボロームシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Komatsu, Shingo Sakamoto, Tadahaya Mizuno, Kazufumi Honda, Rikiya Watanabe, Yasuteru Urano
2. 発表標題 Development of single-molecule enzyme activity-based protein profiling (SEAP) strategy for the detection of disease-related enzyme activities in blood samples
3. 学会等名 Redox Week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Komatsu, Shingo Sakamoto, Yu Kagami, Tadahaya Mizuno, Kazufumi Honda, Rikiya Watanabe, Yasuteru Urano
2. 発表標題 Development of single-molecule enzyme activity-based protein profiling (SEAP) strategy for the detection of disease-related enzyme activities in blood samples
3. 学会等名 International Chemical Biology Society Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小松徹	4. 発行年 2023年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 208
3. 書名 疾患と関わる酵素の働きを夾雑環境下で「視る」	

1. 著者名 小松徹, 小倉大輝, 浦野泰照	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 333
3. 書名 茶カテキンによるエピジェネティック制御因子への関与	

〔出願〕 計6件

産業財産権の名称 固相抽出を利用した蛍光プローブライブラリの調製方法、及びこれを用いた酵素活性計測方法	発明者 浦野泰照, 小松徹, 鏡味優, 坂本眞伍, 渡邊力也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-527924	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ペプチド結合加水分解酵素検出用蛍光プローブ	発明者 浦野泰照, 小松徹, 鏡味優, 坂本眞伍, 笠井貴文, 渡邊力也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/017768	出願年 2022年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 酵素活性の検出方法、及び当該方法に用いる蛍光プローブ	発明者 浦野泰照, 小松徹, 坂本眞伍, 請川達 也, 渡邊力也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/007926	出願年 2023年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 酵素活性の評価のための方法及びキット	発明者 小松徹, 浦野泰照, 鏡味優, 坂本眞伍	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-113583	出願年 2023年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 ペプチド含有化合物の製造方法	発明者 小松徹, 浦野泰照	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-207054	出願年 2024年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 1分子のタンパク質機能 / 構造を評価可能な方法論の開発	発明者 小松徹, 浦野泰照, 石井聖哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、24-0038-001W001	出願年 2024年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	水野 忠快 (Mizuno Tadahaya) (90736050)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教 (12601)	

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
---------	---------