

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19599025  
 研究課題名（和文） 光切断リンカーを利用した生理活性物質ターゲット探索方法の開発  
 研究課題名（英文） Development of novel photo-cleavable linker for the target identification of bio-active compound using affinity resins  
 研究代表者  
 田中 明人（AKITO TANAKA）  
 兵庫医療大学・薬学部・教授  
 研究者番号：30454789

研究成果の概要（和文）：アフィニティ樹脂を用いたターゲット探索をより効率するため、新たに光によって選択的切断可能なリンカーを固相担体と生理活性物質の間に導入した。その結果、既存のターゲット蛋白質を低温下（4度）、短時間（15-30分程度）の光照射のみで選択的にアフィニティ樹脂より溶出することに成功した。本方法では、反応に使用する buffer（溶媒）に制限が無く、通常 buffer 条件のまま反応が進行するため、汎用的な手法となった。

研究成果の概要（英文）：I have developed a photo-cleavable linker for identifications of the target proteins of attractive bio-active compounds. We here demonstrated that known target proteins such as FKBP12, CAII, and so on, were selectively eluted from affinity resins using our method, only by irradiation under protein-friendly mild conditions. This development is important for the identification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：アフィニティ樹脂、ターゲット探索、生理活性物質、光反応

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代において新たな医薬品創出は大きな課題の一つである。近年コンビナトリアル化学や HTS、SBDD 等創薬関連技術の進展を受け、創薬ターゲット同定後の創薬研究は大きな進歩を遂げている。しかし、新規創薬ターゲットは未だ容易でなく、

新たな創薬ターゲット探索方法開拓に関心が寄せられている。一方、毒性は強いが顕著な薬効のある化合物（天然物や開発ドロップ化合物等）や臨床上有益な効果が知られているにも拘らずターゲット未同定の医薬品（古い医薬品等）が数多く知られている。これらの生理活性物質の薬理作用を担

うターゲットは、既に *in vivo* での有用性がある程度担保されていることから、魅力ある新規創薬ターゲットになりうると考えられ高い注目を集めている。特に臨床効果が認められている化合物に関しては人における **Proof of Concept** が得られており、製薬産業にとって大きな福音となり得る。ターゲット解明によって効率的評価系の構築や理論的創薬研究が可能となり、オリジナル化合物を凌駕する選択性に優れ副作用が少なく、かつ強力な医薬品開発が期待されるため世界中で様々な取り組みがなされているが、生理活性物質のターゲットを効率的に同定する方法は未だに決定的な方法が確立されていない。

## 2. 研究の目的

研究はアフィニティ樹脂を用い、効率良くリガンドと特異的に結合するターゲットを効率的に同定する方法を開拓することを目的とする。アフィニティ技術はターゲット探索や目的物の精製に広く使われている技術であるが、固相表面に捉えられたターゲットを溶出するのに、多量のリガンドあるいは関連誘導体を加える方法や界面活性剤や高濃度の塩を加えて溶出する方法が主として用いられてきた。しかし、前者ではリガンド溶解度が充分でない問題点があり(多くの膜透過性化合物はある程度疎水性)、後者の方法では非特異的結合物質も同時に溶出される問題があり、目的を十分に満足する方法は未だ開発されていなかった。そのため、これまでは選択的なターゲット溶出を断念し、溶出ステップ以前までにアフィニティ樹脂への非特異的蛋白吸着を抑制することが強く求められてきた。しかし、目的蛋白質との結合を高いレベルで保持しながら、アフィニティ樹脂上への非特異的蛋白吸着を完全に抑制することは困難であり、アフィニティ樹脂によるターゲット探索の汎用性を制限してきた経緯がある。本技術では、**ターゲットに影響しない波長光の照射によってリガンドと固相担体との結合を選択的に切断し、ターゲットのみを固相表面から溶出することを目的としており、これらの問題を根本から解決することが期待される。**また、本技術では理論上溶出時の溶液成分に制限が無く、しかもリガンド以外の夾雑物が含有されないため得られたターゲット含有溶液の広範な活用が

可能となる。この優れた特性を利用し、トリプシンカラムや質量分析器と一体化した**完全自動ターゲット蛋白質探索装置の開発**も期待される。従来法ではトリプシン活性や MS 測定に障害となる高濃度界面活性剤・塩の除去過程が必須となり実現困難であった当該自動装置が開発されれば微量蛋白同定の問題であるケラチン等の混入が完全に回避され格段の感度向上が期待されている。また、本技術で得られたターゲットは理論上リガンドとの結合能を有する **active conformation** を高濃度で含有することから**抗体精製や X 線結晶解析用蛋白調整等**、サンプルに高い 3 次元構造的純度も求められる分野においても貢献が期待されている。

## 3. 研究の方法

本研究では大きく次の 3 つのステップからなる。1) 本研究に適した光切断リンカー、装置の開発、2) ターゲット既知のモデル化合物 (FK506 等) を用いた技術の最適化研究、3) 幅広い生理活性物質(未知ターゲットの探索を含む)を用いた応用研究

第 1 のステップではターゲットとして想定される蛋白質や核酸等に影響を示さない波長光の照射によって効率に切断される光切断リンカーと本研究に適した装置の開発である。具体的には、既知の光切断リンカー (*o*-nitrobenzyl derivatives) をベースに検討を行う計画である。この時、①光照射によって核酸や蛋白質の変性が起こり難い波長光によって、しかも②ターゲットの失活を抑制するため低温 (4 度付近) において効率的に反応が進行することの 2 点を指標とし検討する計画である。

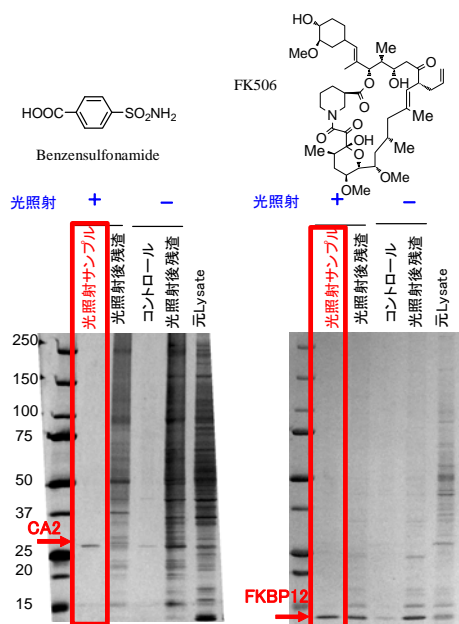
第 2 ステップでは実際に特異的結合タンパクが知られるモデル化合物 (FK506 等) を選択し、既知のターゲット (FKBP12 等) 同定を指標とし条件の最適化を行なう計画である。予備検討において、溶出時に高濃度ラジカル消去剤等を共存させた時にのみ目的の FKBP12 (FK506 binding protein) の選択的溶出が見られたことから、光照射によって切断された光切断リンカー由来の高反応性ラジカル体とターゲットとの非選択的な付加反応が起こっているものと考えられる。そこで、本ステップではこの非特異的反応の抑制策の開発が大きな課題となる (具体的対策は下記方法の欄に記載)。

また、本ステップではモデル化合物を利用し、既存手法との比較検討も行い、新手法のメリットを実験的・客観的に明確にしていく計画である。

第3ステップでは、開拓された手法の有用性の実験的な検証と手法の微調整を目的に、幅広い生理活性物質を用いた応用研究を遂行する計画である。そして、最終的に目標とする広範な化合物あるいは蛋白質、核酸等の生体物質に特異的に結合する蛋白質・核酸を効率的に取得する手法を開発する計画である。

#### 4. 研究成果

物理の分野で用いられてきた光発生装置を改良し、低温かつ短期間で光切断反応を完結する装置関連を完成し、光切断リンカーを用いたターゲット特異的溶出実験を遂行した。その中で、我々独自開発したアフィニティ研究用固相担体 AquaFirmus (筑波家田化学より販売) を用いた系において、顕著に特異的吸着蛋白質のみの選択的な溶出が可能であることが明らかとなった。これを開発した条件は、(1) 反応系が saline 相当の単純 buffer であり、特別な添加剤を必要としないこと、(2) 蛋白質の native 状態を最も長く保有できる温度である 4 度で行えること、(3) 約 30 分程度の照射時間でほぼ選択的溶出反応が飽和すること、などの観点から目的とするターゲット未知の生理活性物質のターゲット探索研究において広く適応が可能であることが示唆さ



れた。最後に、本研究課題で構築された研究成果の有効性を検証するため、ターゲット既知の生理活性物質である 2 つの化合物ベンゼンスルホンアミドおよび FK506 をリガンドとして選択し、ラット脳から調整した crude なライゼートから、ベンゼンスルホンアミド特異的結合蛋白質である CA2、および FK506 特異的結合蛋白質 FKBP12 を、それぞれ選択的にアフィニティ樹脂から溶出することを実施した。その結果、高感度の銀染色レベルにおいても CA2 や FKBP12 以外の蛋白質溶出が認められず、本手法の有用性を認めることができた。今後は、実際のターゲット探索研究に本手法を広く適応する計画である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① E. Iwaoka, T. Mori, T. Shimizu, K. Hosoya, A. Tanaka. Improvement of monolithic solid material by utilization of spacer for identification of the target using affinity resins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 1469-1472 (2009) 査読有

② T. Mori, A. Tanaka, T. Kubo, K. Kaya, M. Sakamoto, K. Hosoya, Properties of flaky affinity resin with co-continuous structure. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 1983-1991 (2008) 査読有

[学会発表] (計 1 件)

馬淵 美雪、岩岡 恵美子、市山 高明、高橋晃樹、清水 忠、西崎 知之、磯貝 隆夫、田中 明人、*AffiGelR* 並みに非特異的蛋白

吸着が少ないメタクリレート系固相担体 “*AquaFirmus*” の開発. 第 4 回ケミカルバイオロジー学会 神戸市産業振興センター (神戸)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.huhs.ac.jp/~h070016a/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中明人 (TANAKA AKITO)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：30454789