

平成 23 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19681023
 研究課題名 (和文) 有機化学を活用したケミカルゲノミクスプラットフォームの高度化と応用研究
 研究課題名 (英文) Development and application of chemical genomic platforms by use of synthetic organic chemistry
 研究代表者
 叶 直樹 (KANO NAOKI)
 東北大学・大学院薬学研究科・准教授
 研究者番号：40317293

研究成果の概要 (和文)：我々が独自に開発した「固相担体上への小分子固定化 (光親和型固定化)」を利用した小分子-蛋白質相互作用解析法の高機能化をまず検討した。小分子と固相担体を繋ぐリンカー部分に切断サイトを導入することで、これまでは困難であった固定化後の小分子の解析と、小分子反応性蛋白質の高感度検出を達成した。一方、小分子マイクロアレイ (小分子高密度集積チップ) の開発を行い、酸化酵素 P450 の基質特異性を検出する新規小分子マイクロアレイを構築した。

研究成果の概要 (英文)：Small-molecule microarray and affinity matrix technologies have been developed. Firstly, by introducing a cleavable site in a photoactivatable linker, which is used to immobilize small molecules on an affinity matrix, validation of the immobilized small molecule on the affinity matrix became possible for the first time. The newly developed cleavable photoactivatable platform also permits the efficient detection of proteins covalently bound to the immobilized small molecule. Secondly, small-molecule microarray platforms that detect substrate specificity of cytochrome P450 have been developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	16,500,000	4,950,000	21,450,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：マイクロアレイ、有機化学、ケミカルゲノミクス、生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

特定の蛋白質に特異的に結合する小分子 (リガンド) は、この蛋白質の機能を解析するた

めの基礎研究ツールとして重要な価値を持つ。このような観点から、特定の蛋白質に対して特異的に結合する小分子を、合成小分子ライブラリーから網羅的に探索する小分子

マイクロアレイが注目されていた。一方、特定の生理活性物質の細胞内標的分子を探索する目的で、小分子固定化アフィニティービーズも注目されていた。我々は固相担体上への小分子の新規導入法を開発して、上記二つの相互作用検出プラットフォームとの融合を進めていた。

2. 研究の目的

小分子マイクロアレイや小分子固定化アフィニティービーズなどの小分子-蛋白質相互作用検出技術に、適切な有機化学反応を組み込み、これを利用することで、上記相互作用検出プラットフォームの革新的な改良と応用を目指す。具体的には(1)小分子マイクロアレイ上に結合した蛋白質を光トラップする手法の開発、(2)開裂型リンカーを用いた光親和型固定化の改良、(3)酵素基質特異性検出アレイの開発、を行う。

3. 研究の方法

(1) 小分子マイクロアレイ上に結合した蛋白質を光トラップする手法の開発

マイクロアレイ基板上に導入したジアジリン基から発生させたカルベンを用いて低分子化合物を基板上に固定化させる手法(光親和型固定化法)は応募者らが開発した手法であるが、365 nmの紫外線を用いてジアジリンの光分解反応を検討した結果、過剰の低分子化合物の存在下でも、必ずジアジリンの異性化によりジアゾ化合物が副生することを見出している。このジアゾ化合物が302 nmの紫外線照射により効率的に分解され、カルベンを生じるといった報告が為されているため、このジアゾ化合物が蛋白質との十分なクロスリンク能を持つかどうか確認する。

(2) 開裂型リンカーを用いた光親和型固定化の改良

光親和型固定化で用いる photoactivatable リンカー中にジスルフィド結合を導入した開裂型 photoactivatable リンカーを合成し、これが既存の photoactivatable リンカーと同様に小分子の固定化に利用可能かどうかをまず調べる。利用可能であれば小分子を固定化後に開裂サイトを切断させ、固定化された小分子の量や配向性の解析を行う。

(3) 酵素基質特異性検出アレイの開発

これまでに開発してきた相互作用検出プラットフォームは、結合した状態が安定に存在する小分子-蛋白質間相互作用の検出を主に目指していたが、本課題では酵素が小分子と一過的に相互作用した結果生じる官能基の基板上での検出に焦点を絞る。すなわち、

P450 とその基質群をモデル系として、基板上に固定化した小分子を P450 で処理した時に水酸化された(または付加された)小分子を検出する試薬を開発する。

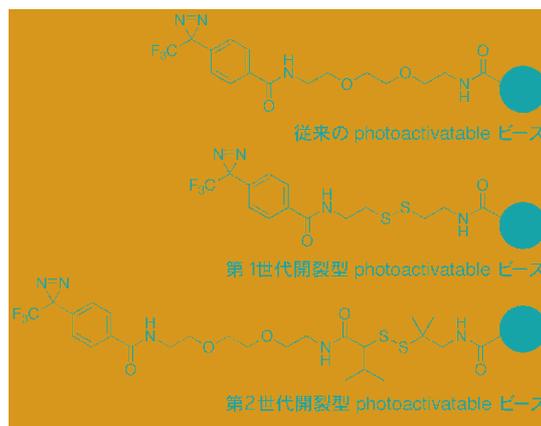
4. 研究成果

(1) 小分子マイクロアレイ上に結合した蛋白質を光トラップする手法の開発

マイクロアレイ基板上に導入したアリールジアジリン基と、365 nmの紫外線照射によりジアジリン基より副生するジアゾ化合物を用いて、小分子と蛋白質を2段階の光照射により基板上に固定化するべく、基板上にアリールジアジリン基を導入する検討や、各種ジアジリン化合物を合成・光分解し、その光分解生成物の解析を行った。未だに基板上のジアジリン基や、光分解により発生するジアゾ化合物のさらなる光分解を基板上で「その場観察」することには成功しておらず、またジアゾ化合物が小分子と十分なクロスリンク能を持っているかどうかの確認ができていないが、ジアジリン基の特性に関するいくつかの基礎的かつ重要な知見を得ることに成功した。

(2) 開裂型リンカーを用いた光親和型固定化の改良

H20年度までに第一世代型開裂型 photoactivatable リンカーの合成を達成した。このリンカーを導入した樹脂(第一世代開裂型 photoactivatable ビーズ)に小分子を固定化したプラットフォームが、小分子に共有結合する結合蛋白質の検出に有効であることを明らかにした。また、このプラットフォームでは固定化された小分子を固相上から切り出して検出することが可能であることを明らかにした。



第一世代開裂型 photoactivatable ビーズの高い有用性は示されたが、本プラットフォーム中のジスルフィド結合の脆弱性を改良すべく、第2世代型クリーバブル光親和型リンカ

一の合成を達成した。更にこのリンカーを用いて第2世代開裂型 photoactivatable ビーズは第1世代型と同様に小分子の結合蛋白質解析に使えることを明らかにした。懸念であったジスルフィド結合の安定性は、選択的切断能を有しながら、第1世代型に比べて大きく向上したことも明らかにした。

(3) 酵素基質特異性検出アレイの開発

当初、酸化酵素 Cytochrome P450 の基質特異性を検出すべく、小分子マイクロアレイ上に固定化した小分子群をまず P450 と反応させ、小分子上に付与された官能基(水酸基など)を検出試薬で検出する手法の開発を目指した。しかし、当初の予想に反して、アレイ基板上に固定化された基質が基質としての酸化を全く受けなくなる事が明らかとなった。そこで、アジド化小分子ライブラリーを溶液中で酸化させた後にアルキン修飾基板に導入して、それから検出試薬で検出する方法と、小分子ライブラリーの代わりに補酵素 NADH を基板に固定化しておき、基質の酸化に伴う NADH から NAD⁺ への変換を検出するプラットフォームの構築を目指した。アジド化小分子ライブラリーを用いる手法では、低感度ながら酸化された基質の検出に成功している。また、NADH 固定化アレイを用いる手法も要素技術の開発に成功している。

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 15 件)

(1) N. Kanoh, H. Takayama, K. Honda, T. Moriya, T. Teruya, S. Simizu, H. Osada, Y. Iwabuchi, *Bioconjugate Chem.*, **21**, 182-186 (2010) (査読有)

(2) I. Miyazaki, H. Okumura, S. Simizu, Y. Takahashi, N. Kanoh, Y. Muraoka, Y. Nonomura, H. Osada, *Chembiochem*, **10**, 845-852 (2009) (査読有)

(3) M. Kawatani, H. Okumura, K. Honda, N. Kanoh, M. Muroi, N. Dohmae, M. Takami, M. Kitagawa, Y. Futamura, M. Imoto, H. Osada, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 11691-11696 (2008) (査読有)

(4) N. Kanoh, T. Nakamura, K. Honda, H. Yamakoshi, Y. Iwabuchi, H. Osada, *Tetrahedron*, **64**, 5692-5698 (2008) (査読有)

[学会発表] (計 31 件)

(1) 叶 直樹、有機合成化学を基盤とした天然有機化合物のケミカルバイオロジー、第3回万有財団若手交流セミナー、平成21年11月22日、唐津ビューホテル

(2) 叶 直樹、タンパク質-小分子リガンド間相互作用検出のための有機化学、化学系学術協会東北大会、平成21年9月20日、日本大学工学部

(3) 叶 直樹、有機合成化学を基盤とした天然有機化合物のケミカルバイオロジー、第26回有機合成化学セミナー、平成21年9月16日、前橋市中央公民館

(4) N. Kanoh, Development of Photo-Cross-Linked Small-Molecule Microarrays and Affinity Matrix as Chemical Genetic Screening Platforms, CSI Singapore, NUS, and Tohoku University G-COE Joint Symposium, 平成21年9月9日, Genome Institute of Singapore

(5) 叶 直樹、有機合成化学を基盤とした天然有機化合物のケミカルバイオロジー、新規素材探索研究会第8回セミナー、平成21年6月5日、新横浜富士ビューホテル

(6) 高山 浩、叶 直樹、本田香織、守谷 崇、照屋貴之、清水史郎、長田裕之、岩渕好治、低分子化合物のターゲット探索に用いる開裂型 photoaffinity beads の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、平成21年5月18日、神戸市産業振興センター

(7) N. Kanoh, Chemosite non-selective organic reaction in natural product-based chemical genetics, 8th Tateshina Conference on Organic Chemistry, 平成20年11月7日、蓼科フォーラム

(8) N. Kanoh, Photo-generated carbene as a possible universal chemical handle for functionalizing small molecules, IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products ICOB-6 & ISCNP-26, 平成20年7月5日, Prince Edward Island, Canada

[図書] (計 6 件)

(1) N. Kanoh "Small Molecule Microarrays: Methods and Protocols" (M. Uttamchandani, S. Q. Yao, Eds), Humana Press, p.17-23 (2010)

(2) 叶 直樹 「バイオチップ実用化ハンドブ

ック」(金子周一、堀池靖浩 監修), NTS Inc., p. 203-209 (2010)

(3) N. Kanoh, H. Osada "Protein Targeting with Small Molecules: Chemical Biology Techniques and Applications" (H. Osada, Ed.), Wiley, p 57-80 (2009)

(4) 叶 直樹「ナノバイオ計測の実際」(三原久和、小島英理、馬場嘉信 編)、講談社サイエンティフィック、p 52-62 (2007)

(5) 清水史郎、宮崎 功、近藤恭光、叶 直樹、長田裕之「マイクロアレイ・バイオチップの最新技術」(伊藤 嘉浩 監修)、CMC Press, p 229-239 (2007)

(6) 齋藤亜貴子、叶 直樹、長田裕之「分子間相互作用解析ハンドブック」(磯辺俊明、中山敬一、伊藤隆司 編)、羊土社, p 225-229 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

叶 直樹 (KANOH NAOKI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：40317293