

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282212

研究課題名(和文) 生体機能光制御分子の創製と細胞機能精密制御への応用

研究課題名(英文) Creation of agents that selectively photo-degrade certain proteins and oligosaccharides and its application to control of cell functions

研究代表者

戸嶋 一敦 (TOSHIMA, KAZUNOBU)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：60217502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においては、種々の疾病に関連するさまざまなタンパク及び糖鎖を、特定波長の光照射によって、標的選択的に分解する新しい生体機能分子を創製した。さらに、これら生体機能分子が、疾病に関連する細胞内で機能し、これら細胞の機能を制御可能なことを見出した。これらのことにより、光照射によって生理活性の発現が制御可能な、これまでに類例のない生体機能光制御分子の開発に向けた新たな指針を確立した。

研究成果の概要(英文)：Several agents, that target-selectively photo-degrade certain disease-related proteins and oligosaccharides, were designed and synthesized. Furthermore, it was found the agents thus developed work not only in test tube but also in disease-related cells. From these studies, a new approach for the design of light-activated and molecular-targeted medicines has been established.

研究分野：分子生命化学

キーワード：生物活性分子 分子設計 合成 タンパク 糖 光分解 細胞 生体機能光制御分子

1. 研究開始当初の背景

本研究では、生体高分子としてのタンパク及び糖鎖を、選択的に光分解する生体機能分子の創製を主目的としたが、申請時においては、タンパクの光分解を指向した生体機能分子の創製研究は、国内外を通じて数例あるのみであり、端緒についたばかりであった。この時点において、著者らは、すでに、標的とするタンパク(転写因子:エストロゲンレセプター α)のみを選択的に光分解する光感受性生体機能分子の創製に、世界に先駆けて成功していた。一方、糖鎖を光分解する生体機能分子の創製に関する研究は類例がなく、著者らが、標的とする糖鎖(T-抗原糖鎖:Gal(β -1,3)GalNAc)のみを選択的に光分解する光感受性生体機能分子の創製に成功したのが、世界で最初の例となっていた。これらのことから、標的とするタンパク及び糖鎖を、特定の光照射をトリガーとして、選択的に光分解する生体機能分子の創製を主目的とする本研究は、極めて新しい研究領域であり、申請時まで、著者らの先駆的な研究成果が、この新領域をリードしていた。

2. 研究の目的

本研究では、生命現象を司り、多様かつ複雑な生体高分子であるタンパク及び糖鎖をターゲットとし、特定波長の光照射をトリガーとして、標的とする望みの生体高分子のみを選択的に光分解し、その機能発現を特異的に制御する新たな光感受性の生体機能分子の創製と細胞内機能制御を指向した応用を目的とした。また、タンパク及び糖鎖をランダム(非特異的)に光分解する万能バサミとなる光感受性分子と標的分子(標的生体高分子)が未知の薬剤とのハイブリッド分子を複製し、このハイブリッド分子によって光分解されるタンパクや糖鎖を網羅的に解析・同定することで、標的が未知の薬剤の標的分子(標的生体高分子)を同定するケミカルバイオロジーとしての新手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、生体高分子を光分解する光感受性分子(小分子)と、目的の生体高分子を認識する分子(小分子及び高分子)から構成されるさまざまなハイブリッド分子(光感受性生体機能分子)の創製と応用研究を目的とし、以下の研究方法で行った。

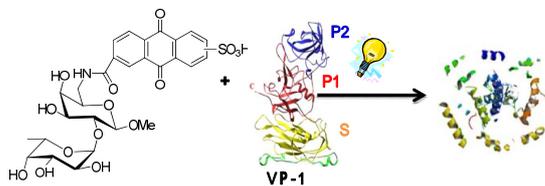
- (1) タンパク及び糖鎖の光分解に適した高機能な光感受性分子のデザインと合成
- (2) 光感受性分子の特定波長の光照射による光機能発現制御法の確立
- (3) 標的のタンパク及び糖鎖を認識する分子の選定及び開発
- (4) 生体高分子を光分解する光感受性分子(小分子)と生体高分子を認識する分子(小分子及び高分子)のハイブリッド法の開発と合成

- (5) 合成した光感受性生体機能分子の光分解効率及び選択性を指標にした機能評価
- (6) 合成した光感受性生体機能分子の細胞内生体高分子への応用と機能制御
- (7) 生体高分子(タンパク及び糖鎖)をランダムに光分解する光感受性分子(小分子)と標的分子が未知の薬剤とのハイブリッド分子を作成と、この分子によるタンパク及び糖鎖の分解挙動の解析と同定を利用したケミカルバイオロジーでの新たな標的分子同定法の確立

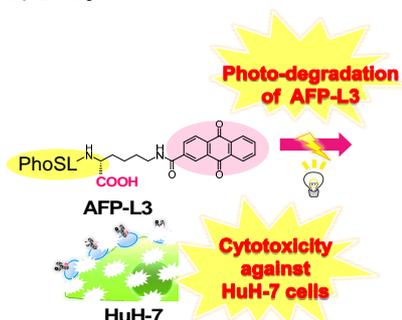
尚、上記において、活性酸素種の同定や効率を、ESRを用いて評価した。さらに、合成したハイブリッド型生体機能分子の標的生体高分子との相互作用を、蛍光法などを用いて評価し、また、生体高分子の光分解の効率及び選択性を、SDS-PAGE及びHPLCを用いて定量的に解析した。さらに、細胞内での標的とする生体高分子の光分解の挙動を、ウエスタンブロッティングなどの手法を用いて解析し、細胞内での標的生体高分子の選択的分解による細胞機能制御とフェノタイプの変化について検討した

4. 研究成果

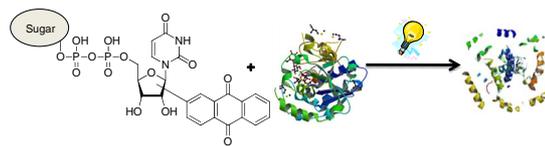
(1) ノロウイルス関連タンパク VP-1 の光分解: 標的タンパクである VP-1 は、血液型糖鎖である A、B、及び H 抗原糖鎖を認識することが報告されている。また、H 抗原糖鎖は A、B、及び H 抗原糖鎖の共通構造を有している。そこで、VP-1 を選択的に認識するための H 抗原糖鎖と、人体に無害な長波長紫外光の照射下、タンパクを光分解することが当研究室で見出されたアントラキノン誘導体とを、長さの異なるスペーサーを介して連結したアントラキノン H 抗原糖鎖ハイブリッド分子をデザイン及び合成した。次に、ハイブリッド分子及び H 抗原糖鎖を有さないアントラキノン誘導体の標的タンパク VP-1 に対する光分解活性を SDS-PAGE により評価した。その結果、長波長紫外光の照射下、H 抗原糖鎖を有さないアントラキノン誘導体と比べ、ハイブリッド分子が、VP-1 を効果的に光分解することを初めて見出した。さらに、ハイブリッド分子の光分解活性はスペーサーの長さに依存し、スペーサーが最も短いハイブリッド分子が最も高い光分解活性を有することを明らかにした。次に、ハイブリッド分子の認識部位の効果を検証するため、H 抗原糖鎖誘導体を用いた光分解における競合阻害試験を行った。その結果、ハイブリッド分子の VP-1 に対する光分解活性が大きく低下したことから、H 抗原糖鎖部位と VP-1 の相互作用が光分解活性に大きく関与していることを明らかにした。以上の結果より、本ハイブリッド分子が、長波長紫外光の照射下、標的タンパク VP-1 を効果的かつ選択的に光分解する新たな生体機能光制御分子であることを明らかにした。



(2) 肝がん関連糖鎖 1-6-フコース糖鎖付加型糖タンパクの選択的光分解：本研究では、標的タンパクとして、肝がん患者に過剰発現する腫瘍マーカーの α -フェトプロテイン L3(AFP-L3)に着目した。AFP-L3は、*N*-結合型糖鎖を有し、かつその糖鎖の還元末端のGlcNAcに 1-6フコシドが連結した特異な構造を有しており、現在、AFP-L3の機能解明及び AFP-L3 を標的とした新たな肝がん治療法の開発が強く求められている。そこで本研究では、AFP-L3 を選択的に認識し、特定波長の光照射下、AFP-L3のみを効果的に光分解する新たな人工生体機能分子のデザイン、合成、及び機能評価を行った。分子デザインに際し、AFP-L3の認識分子には、特異な 1-6 フコシド構造を選択的に認識するスギタケレクチン：*Pholiota squarrosa* lectin (PhoSL) を、また、光感受性部位には、人体に無害な長波長紫外光の照射下、生体高分子を効果的に光分解することが当研究室で見出されたアントラキノン誘導体を選択し、これらを PhoSL の N 末端及び C 末端に連結したハイブリッド分子 1 及び 2 をデザイン、合成した。次に、1 及び 2 の標的糖鎖に対する結合能及び結合特異性を、標的糖鎖を含む数種類の糖鎖を用いてキャピラリー電気泳動により評価した。その結果、ハイブリッド分子 1 は、いずれの糖鎖に対しても結合能を有さないのに対し、2 が標的糖鎖のみを選択的に認識し、かつ PhoSL と同様の高い結合能を有していることを見出した。さらに、2 の非標的及び標的糖タンパクである AFP-L1 及び AFP-L3 に対する光分解活性を SDS-PAGE により評価した結果、2 が長波長紫外光の照射下、AFP-L3 を選択的に光分解することを見出した。最後に、2 の AFP-L3 過剰発現細胞 HuH-7 及び AFP-L3 非発現細胞 A549 に対する効果を、MTT アッセイにより評価した。その結果、2 が HuH-7 選択的かつ光照射依存的に細胞毒性を発現することを見出した。

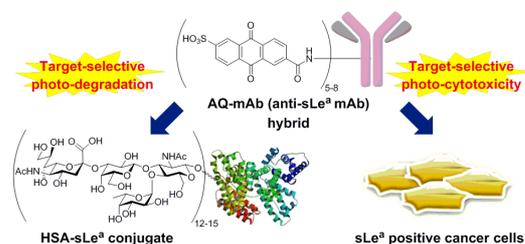


(3) 糖生合成酵素群の選択的光分解：標的糖転移酵素には、ガラクトース転移酵素である B4GalT1 を選択し、B4GalT1 の基質である UDP-Gal に対して AQ を付与したハイブリッド分子をデザインした。まず、UDP-Gal と AQ 誘導体を連結するための結合部位には、種々の糖転移酵素への応用を指向し、糖ヌクレオチドの共通構造であるリボースの 2 位または 3 位水酸基を選択し、これら水酸基をそれぞれメチル化したモデル基質を合成した。次に、モデル基質の B4GalT1 に対する親和性を、B4GalT1 を用いた UDP-Gal と GlcNAc のグリコシル化反応による LacNAc の生成における阻害活性を指標として評価した。その結果より、B4GalT1 と AQ 誘導体の連結部位はリボースの 2 位とし、両者をスペーサーを介して連結したハイブリッド分子をデザインし、全 22 工程にてハイブリッド分子の合成を達成した。さらに、得られたハイブリッド分子の B4GalT1 に対する酵素阻害活性を、長波長紫外光 (365 nm, 100 W) の照射下及び非照射下において評価した。その結果、ハイブリッド分子の酵素阻害活性が、糖ヌクレオチド部分を有さない AQ 誘導体に比べ高いこと、また、非光照射下に比べ光照射下において著しく高く、LacNAc の生成を効果的に抑制することを見出した。



(4) がん転移糖鎖シアリルルイス A 糖鎖の選択的光分解：糖鎖は、核酸、タンパクに次ぐ、「第三の生命鎖」と呼ばれ、恒常的な生命現象や様々な疾病に深く関与している。そのため、特定の標的糖鎖に対して特異的に相互作用し、その機能を精密に制御する人工生体機能分子の創製は、ポストゲノム研究における重要な研究課題である。これまでに当研究室では、標的糖鎖と選択的に相互作用する認識分子（レクチン、ボロン酸、及び超分子）と、人体に害の無い光照射下、糖鎖を光分解することが当研究室で見出されたアントラキノン (AQ) を連結したハイブリッド分子が、標的糖鎖を選択的に光分解することを報告している。そこで本研究では、糖鎖認識分子として、標的糖鎖を高い親和性と特異性で認識するモノクローナル抗体に着目し、その抗体に対して AQ 分子を付与した AQ-抗体ハイブリッド分子のデザイン、合成および機能評価を行った。標的糖鎖として、がんの転移に深く関与し、腫瘍マーカーとしても利用されているシアリルルイス A (sLe^a) 糖鎖を選択した。また、sLe^a を選択的に光分解するためのハイブリッド分子として、sLe^a のモノクローナル抗

体 CA19-9-203 に対して、複数の AQ 分子を付与した AQ-抗体ハイブリッド分子をデザイン、合成した。合成した AQ-抗体ハイブリッド分子は、MALDI-TOF MS 及び UV-Vis スペクトル解析の結果、抗体 1 分子当たり、5-8 分子の AQ 分子が結合していることが分かった。次に、AQ-抗体ハイブリッド分子の抗原認識能を ELISA アッセイで評価した結果、標的糖鎖 sLe^a を有する糖タンパク HSA-sLe^a に対して、AQ-抗体ハイブリッド分子が抗体 CA19-9-203 と同程度の結合定数を有することを見出し、AQ-抗体ハイブリッド分子が抗原認識能を保持していることを明らかにした。さらに、AQ-抗体ハイブリッド分子の光分解活性を、標的糖鎖 sLe^a を有する HSA-sLe^a 及び非標的糖鎖 Le^a を有する HSA-Le^a を用いて、ウエスタンブロット法により評価した。その結果、AQ-抗体ハイブリッド分子が人体に害の無い長波長の紫外光照射下、HSA-sLe^a を選択的かつ効果的に光分解することを見出した。



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 6 件)

- (1) D. Takahashi, T. Nagao, S. Sotokawa, K. Toshima, Target-selective Photo-degradation of a Sialyl Lewis a (sLe^a) Conjugate and Photo-cytotoxicity Against sLe^a Positive Cancer Cells Using an Anthraquinone-antibody Hybrid, *Medicinal Chemistry Communications*, **7**, 1224-1228 (2016). DOI: 10.1039/C6MD00167J (査読有)
 - (2) M. Okuyama, H. Ueno, Y. Kobayashi, H. Kawagishi, D. Takahashi, K. Toshima, Target-selective photo-degradation of AFP-L3 and selective photo-cytotoxicity against HuH-7 hepatocarcinoma cells using an anthraquinone-PhoSL hybrid, *Chemical Communications*, **52**, 2169-2172 (2016). DOI: 10.1039/C5CC09542E (査読有)
 - (3) 高橋大介、戸嶋一敦、標的糖鎖光分解用生体機能分子、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック、エヌ・ティー・エス、377-379 (2015). (査読無)
 - (4) H. Ikeda, E. Kaneko, S. Okuzawa, D. Takahashi, K. Toshima, Chemical and biological evaluation of unusual sugars, *alpha-ulosides, as novel Michael acceptor, Organic & Biomolecular Chemistry*, **12**, 8832-8835 (2014). DOI:10.1039/c4ob01877j (査読有)
 - (5) A. Hirabayashi, Y. Shindo, K. Oka, D. Takahashi, K. Toshima, Photodegradation of amyloid β and reduction of its cytotoxicity to PC12 cells using porphyrin derivatives, *Chemical Communications*, **50**, 9543-9546 (2014). DOI:10.1039/c4cc03791j (査読有)
 - (6) 平林歩、石田康則、高橋大介、戸嶋一敦、アルツハイマー病原因物質アミロイドを光分解する生体機能光制御分子の創製と応用、ケミカルバイオロジー、日本ケミカルバイオロジー学会編、7、2-5 (2014). (査読無)
- 〔学会発表〕(計 19 件)
- (1) 高城美智、高橋大介、戸嶋一敦、還元糖を選択的に光分解するアントラキノ-ヒドラジドハイブリッドの創製と AGEs 生成阻害への応用、日本化学会第 97 春季年会、平成 29 年 3 月 16 - 19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県、横浜市)。
 - (2) 高木亮馬、高橋大介、戸嶋一敦、セラノスティクスを指向した ROS 応答型蛍光分子-光感受性分子ハイブリッドの合成と機能評価、日本化学会第 97 春季年会、平成 29 年 3 月 16 - 19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県、横浜市)。
 - (3) 奥山真衣、高橋大介、戸嶋一敦、光感受性分子-糖ハイブリッドによるグリコシダーゼの選択的光分解、日本化学会第 97 春季年会、平成 29 年 3 月 16 - 19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県、横浜市)。
 - (4) 高城美智、高橋大介、戸嶋一敦、アントラキノ-ヒドラジドハイブリッドによる還元糖の選択的光分解と AGEs 生成阻害への応用、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、平成 28 年 6 月 15 - 17 日、京都テルサ(京都府、京都市)。
 - (5) 志村拓海、池田裕政、高橋大介、戸嶋一敦、光感受性分子-シクロオクチンハイブリッドによるがん細胞表面修飾及び選択的光細胞毒性、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、平成 28 年 6 月 15 - 17 日、京都テルサ(京都府、京都市)。
 - (6) 外川翔太、高橋大介、戸嶋一敦、光制御型酵素を指向したアントラキノ-酵素-ペプチドベクターハイブリッド分子の創製、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、平成 28 年 6 月 15 - 17 日(16 日)、京都テルサ(京都府、京都市)。
 - (7) M. Okuyama, H. Ueno, Y. Kobayashi, H.

- Kawagishi, D. Takahashi, K. Toshima, Target-selective Photo-Degradation of AFP-L3 and Selective Photo-Cytotoxicity Against HuH-7 Hepatocarcinoma Cells Using An Anthraquinone-PhoSL Hybrid, 4th National Tsing Hua University / Keio University Bilateral Symposium of Advanced Chemistry, July 12, 2016, 慶應義塾大学矢上キャンパス (神奈川県, 横浜市).
- (8) 外川翔太、高橋 大介、戸嶋一敦、光制御型酵素を指向したアントラキノン-酵素-ペプチドハイブリッド分子の創製、日本化学会第 96 春季年会、平成 28 年 3 月 24 - 27 日、同志社大学京田辺キャンパス、(京都府、京田辺市)
- (9) 奥山真衣、上野晴菜、小林夕香、河岸洋和、高橋大介、戸嶋一敦、肝がん関連糖タンパク AFP-L3 を選択的に光分解するアントラキノン-PhoSL ハイブリッドの創製と肝がん細胞に対する効果、Glyco TOKYO 2015 シンポジウム、平成 27 年 10 月 24 日、慶應義塾大学矢上キャンパス、(神奈川県、横浜市)
- (10) 上野晴菜、小林夕香、河岸洋和、高橋大介、戸嶋一敦、アントラキノン-PhoSL ハイブリッド分子による肝がん関連糖タンパク AFP-L3 の光分解及びヒト肝がん細胞 HuH-7 に対する効果、日本ケミカルバイオロジー学会、第 10 回年会、平成 27 年 6 月 10 - 12 日、東北大学川内キャンパス、(宮城県、仙台市)
- (11) 増田奏衣、高橋大介、戸嶋一敦、アントラキノン-糖ヌクレオチドハイブリッドによる糖転移酵素の光分解、日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会、平成 27 年 6 月 10 - 12 日、東北大学川内キャンパス、(宮城県、仙台市)
- (12) K. Toshima, Target-selective photodegradation of Target-selective photodegradation of oligosaccharides in health and disease, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 15-20, 2015, (Honolulu, USA).
- (13) K. Toshima, Target-selective photodegradation of proteins in chemical biology, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 15-20, 2015, (Honolulu, USA).
- (14) 志村拓海、大久保聡太、上野晴菜、高橋大介、戸嶋一敦、ノロウイルス関連タンパク VP1 を光分解するアントラキノン H 抗原糖鎖ハイブリッドの創製、日本化学会第 95 春季年会、平成 27 年 3 月 26 - 29 日、日本大学、(千葉県、船橋市)
- (15) 奥山真衣、増田奏衣、高橋大介、戸嶋一敦、アントラキノン-ハルミンハイブリッドによるアルツハイマー病関連タンパク DYRK1A の選択的光分解、日本化学会第 95 春季年会、平成 27 年 3 月 26 - 29 日、日本大学、(千葉県、船橋市)
- (16) 戸嶋一敦、糖質および抗生物質の合成と生体機能光制御分子の創製に関する研究、日本化学会第 95 春季年会、平成 27 年 3 月 26 - 29 日、日本大学、(千葉県、船橋市)
- (17) 戸嶋一敦、標的生体高分子を選択的に光分解する化学的手法の開発と生物学的応用、国際高等研究所研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」2014 年度第 1 回研究プログラム、平成 26 年 12 月 14 - 15 日、国際高等研究所(京都府、十津川市)
- (18) 長尾高志、高橋大介、戸嶋一敦、アントラキノン-抗体ハイブリッドによるシアルリルイス A 糖鎖の選択的光分解、日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会、平成 26 年 6 月 11 - 13 日、大阪大学、(大阪府、豊中市)
- (19) K. Toshima, Target-selective photodegradation of proteins and oligosaccharides, The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural products : Target ID and Regulation of Bioactivity, October 28-29, 2014. (October 28), 千里ライフサイエンスセンター(大阪府、豊中市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://www.applc.keio.ac.jp/~toshima/publication.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸嶋 一敦 (TOSHIMA KAZUNOBU)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：60217502

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし