

平成30年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14680

研究課題名(和文)疾患特異的な表在性蛋白質の単離精製技術の開発と実証

研究課題名(英文)Development and demonstration of novel purification techniques for disease-specific superficial proteins

研究代表者

井上 豪 (Inoue, Tsuyoshi)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：20263204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非天然ビオチンの末端にスクシンイミド基(NHS基)を付加した新規誘導体を合成し、細胞表面へのラベル化実験を試みたところ、天然型のビオチン化試薬を用いた従来法と同様に表面蛋白質を精製できることが判明した。特に新手法では内在性ビオチン化蛋白質であるカルボキシラーゼ類を排除でき、細胞骨格蛋白質がリストされることが判明した。ヒトの転移癌のモデルマウスで試したところ、担癌マウスで1.5倍以上亢進する血管内皮蛋白質の種類について解析したところ、従来法でのみリストされる蛋白質が147種、従来法と新規法で共通にリストされる蛋白質が28種あったが、新規法でのみ亢進が認められた蛋白質が53種あることが判明した。

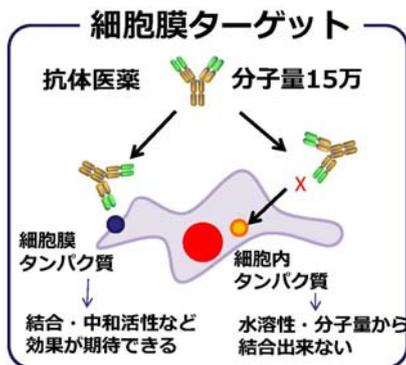
研究成果の概要(英文)：Regarding the labeling reagent, succeeded in synthesizing a derivative in which a succinimide group (NHS group) was added to the non-natural biotin derivatives. As a result of experiments and proteomics analyses of vascular endothelium using mouse, it was found that the surface protein were only purified and the endogenous biotinylated proteins could be excluded by using the new derivatives. Proteomic analysis was also performed on diseased mice seeded with A20 lymphoma. Analyses of the vascular endothelial proteins that increased by 1.5 times or more in tumor-bearing mice were performed. There are 147 kinds of proteins listed only by the conventional method, and 28 kinds of proteins commonly listed in the conventional method and the novel method. However, it turned out that there were 53 kinds of proteins that were only found to be enhanced by the novel method. Validation is now under study.

研究分野：構造生物化学

キーワード：プロテオミクス解析 質量分析 表在性蛋白質 抗原探索 非天然ビオチン化ラベル 改変型ストレプトアビジン CTC 血管内皮

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品は副作用が少なく、患者の QOL (Quality of Life) が極めて高いことから、需要も急増している。しかし、抗体は分子量が約 15 万 (小分子化しても約 5 万) とサイズも大きく、細胞内にアクセスできず、その標的は疾患細胞の表在性分子に限られる (下図)。



従って、癌細胞の表面に特異的に発現している蛋白質を単離精製する技術を開発すれば、例えば、転移癌の原因と考えられている体内を循環する癌細胞 (CTC) を検出する抗体を取得することもでき、革命的な診断薬や抗癌剤を開発できる。進行癌の血管内皮のタンパク質や CTC の表面タンパク質を分析する技術の開発は、これを認識する抗体の取得を容易にし、革新的な医薬品の創出が可能となる。

また、これまでに上市または治験段階にある抗体医薬品の数は 450 種類程度あるのに対し、それらの標的となる抗原分子の数は 40 種類にも満たず (下図)、1 つの標的に対し 10 社以上が BIC (Best in Class) の抗体医薬品を開発しており、FIC (First in Class) の医薬品開発に向けた新たな標的探索技術の開発が期待されている



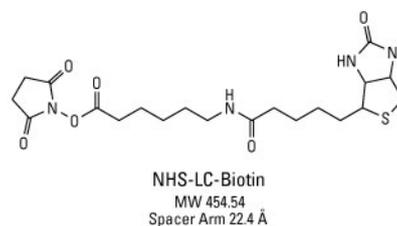
我々はこの問題に対応するべく、非天然型ビオチンにのみ結合する改変型ストレプトアビジンの開発に成功した。

活性部位のアミノ酸残基を 4 カ所置換した改変型ストレプトアビジンが、天然型ビオチンには全く結合せず、非天然型の bis-イミノビオチン誘導体 (右図下側, R = 水素原子) にのみ強固に結合 (K_D 値 = 10^{-10} M 以下, 検出限界) するよう設計し、世界初でこれに成功している。(J. Biochem., 2015, Bios. Biot. & Biochem., 2015, J. Bios. & Bioeng., 2015. 特願 2013-031038, 特願 2014-028525, PCT/JP2014/53734)。

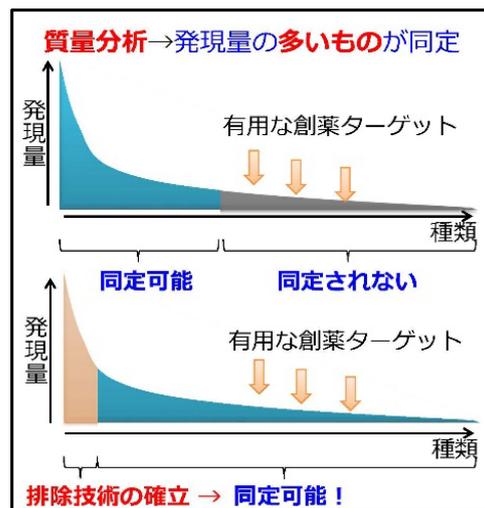
2. 研究の目的

本研究課題では、非天然のビオチン化試薬を合成し、癌細胞の表在性の蛋白質のみをラベル化し、改変型ストレプトアビジンを担持したビーズで単離精製する技術を開発するとともに、質量分析法を駆使して、癌細胞の表面に極微量であっても有意に発現している新規な標的分子を探索する技術を開発する。

具体的には、下記のような天然のビオチンにスクシンイミド基を導入してビオチンのラベル化試薬 (下図) が市販されているのを参考に、bis-イミノビオチン (IMBT) 誘導体を合成し、血管内皮や血球細胞などの生体組織の表面に存在する蛋白質をラベル化する技術を開発する。



従来から知られているビオチン化試薬では内在性のビオチン化蛋白質も同時に精製されることが問題であったが、本研究課題によって内在性ビオチン化蛋白質を排除でき、極微量しか存在しないものであっても単離精製が可能で、膜表在性の蛋白質の存在比を質量分析で解析できるような技術になるかどうかを実証することを目的としている。



3. 研究の方法

これまでに数種類の溶解度の高い IMBT 誘導体の設計・合成を行い、得られた化合物について iTC や SPR 測定を駆使した物性解析と、改変型ストレプトアビジン (MTSA) との複合体の X 線構造解析を行い、より活性の高い

IMBT 誘導体を創成した。

本 bis-イミノビオチン誘導体を用い、従来のビオチン化ラベル化誘導体化合物との性能評価を通常マウス、A20 リンパ腫を播種した転移癌モデルのマウスを用いたプロテオミクス実験について血管内皮タンパク質をターゲットに実行した。

4. 研究成果

ラベル化試薬については、非天然ビオチンの末端にスクシンイミド基 (NHS 基) とスルホン酸基を付加した誘導体を合成することに成功した。

細胞表面へのラベル化実験を試みたところ、天然のビオチン化試薬を用いた従来法と同様に表面蛋白質を修飾できることが判明した。

次に、マウスを用いた血管内皮のラベル化実験およびプロテオミクス解析を行ったところ、従来法では内在性ビオチン化蛋白質であるカルボキシラーゼが Top3 にリストされたが (表 1)、新規法ではこれらを排除でき、Top にフィブロネクチンがリストされるなど、狙い通りにデザインされていることが判明した (表 2)。

表 1. BTNでラベル化 (従来法)

Protein name	Score
Pyruvate carboxylase, mitochondrial	27519
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	7641
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	6087
Fatty acid synthase	4378
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	4274
3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal	4104
3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal	4077
Fibronectin	3784
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	3736
Acetyl-CoA carboxylase 1	3728
Myosin-1	3656
Myosin-4	2647
Myosin-8	2458
Myosin-9	2112
Retinal dehydrogenase 1	2103

表 2. IMNでラベル化 (新技術)

Protein name	Score
Fibronectin	4718
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	4561
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	2827
Pyruvate carboxylase, mitochondrial	2095
ATP-binding cassette sub-family A member 8-A	1806
Apolipoprotein B-100	1194
Isoform 2 of Collagen alpha-1(XIV) chain	1156
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	1146
EMILIN-1	1145
Collagen alpha-5(VI) chain	1086
Laminin subunit alpha-5	1027
Nidogen-2	936
ATP-binding cassette sub-family A member 1	911
Laminin subunit beta-2	905
Argininosuccinate synthase	855

膜蛋白質 基底膜蛋白質 内在性BTN化蛋白質

さらに、A20 リンパ腫を播種した疾患マウスについても同様にプロテオミクス解析を行った。担癌マウスで 1.5 倍以上亢進する血管内皮蛋白質の種類について解析したところ、従来法でのみリストされる蛋白質が 147 種、従来法と新規法で共通にリストされる蛋白質が 28 種あったが、新規法でのみ亢進が認められた蛋白質が 53 種あることが判明し、

Validation を引き続き行っている。

今後は、A20 リンパ腫を播種した担癌マウスについて、更に詳細なプロテオミクス解析を進め、少しでも可能性のある有意な抗原タンパク質の同定を進め、その蛋白質を認識する抗体を取得する予定である。

また、CTC についても本技術の有用性が認められたことを受け、臨床医との調整を行い、CTC 細胞を用いたプロテオミクス研究について具体的な検討を進める予定である。

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 4 件)

1. New molecular packing in a crystal of pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis*: a double-helical arrangement of blue copper. Y Fukuda, E Mizohata and T Inoue, *Acta Cryst.*, F73, 159-166, (2017)
2. Structural insights into a secretory abundant heat soluble protein from an anhydrobiotic tardigrade *Ramazzottius varieornatus*. Y Fukuda, Y Miura, E Mizohata, T Inoue. *FEBS Letters.*, 591(16). 2458-2469, (2017)
3. Active site geometry of a novel aminopropyltransferase for biosynthesis of hyperthermophilic specific branched-chain polyamine. R Hidese, KM Tse, SKimura, E. Mizohata, J Fujita, Y Horai, N Umezawa, T Higuchi, M Niitsu, T Oshima, T Imanaka, T Inoue, S Fujiwara. *FEBS Letters.*, 284(21), 3684-3701, (2017)
4. Crystal structure of secretory abundant heat soluble protein 4 from one of the toughest "water bears" micro-animals *Ramazzottius varieornatus*. Y Fukuda, T Inoue. *Protein Science.* (in press) (2017)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

抗体医薬の開発に資する創薬標的タンパク質の同定方法及び標的タンパク質に対する抗体の製造方法, 特許, PCT/JP2018/005814 発明者: 鈴木常司, 戸谷由之, 番場伸一, 鎌田

春彦, 井上豪, 他
権利者: 鈴木常司, 戸谷由之, 番場伸一, 鎌田
春彦, 井上豪, 他

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 豪 (Tsuyoshi Inoue)
大阪大学大学院工学研究科・教授
研究者番号: 20263204