

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19350086

研究課題名（和文） 新発想アフィニティ担体によるケミカルバイオロジーの推進

研究課題名（英文） Implementation of chemical biology using novel affinity resins

研究代表者

細矢 憲（HOSOYA KEN）

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：00209248

研究成果の概要（和文）：創薬研究において重要な手法である生理活性物質に対する標的タンパク質の検索に対して、従来には無い全く新しい概念のモノリス型のアフィニティ担体を開発し、その特性について詳細に検討を行った。その結果、新規に開発したアフィニティ担体は、そのソフト界面由来の非特異的タンパク吸着の大幅な低減と、標的タンパク質の高い捕捉能を実現し、既存のアフィニティ担体を凌駕する特性を得た。また、表面修飾により、リガンドの存在環境を変化させることが可能であり、存在環境における標的タンパク質の捕捉が可能であることが示された。本成果は、ケミカルバイオロジーの推進に大きく寄与するものと確信している。

研究成果の概要（英文）：I have developed completely new, monolithic affinity resins for researches of target proteins of certain bioactive substances, which have been very important for novel drug discovery. Based on careful studies, I have realized great suppression of non-specific adsorption of proteins based on “soft” surface of affinity resins and really improved capture of the target proteins, which have been never realized using commercially available affinity resins. In addition, using surface modification, environment of the immobilized ligand has been controlled to capture various target proteins in certain environment. These results will contribute implementation of chemical biology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：アフィニティ担体，ケミカルバイオロジー，環境技術，生理活性，タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

世界的な医療費抑制政策を背景に現在製薬企業は存亡の危機にある。国内においても、国民皆保険制度の傘の元成長を続けてきた製薬企業も10年後の国内新薬創造型企業数が現在の20社前後から1, 2社に絞られるとの予測が示すよう同様な危機的状態にある。新薬創造型企業にとって新規創薬ターゲット開拓が生き残りにかけた最良の戦略であることは広く知られているが、従来型創薬ターゲットといわれる単純な酵素阻害剤や生体内生理活性リガンド受容体作用剤といった創薬に関する戦略が定まっている分野が既に枯渇し、過去の延長線上にないタイプの新規ターゲット探索への対応が強られる状態にある。

2003年4月14日に米国, 英国, 日本, フランス, ドイツ, 中国の6カ国の首脳が発表したヒトゲノム解読に象徴されるように、ここ10年いわゆる「ゲノム創薬」と呼ばれる戦略がメガ企業を中心に実施されてきた。具体的には、既存の創薬ターゲットと類似構造を持つ遺伝子がコードする蛋白質も同様に良好な創薬ターゲットとなりうるとの仮定の元 Bioinformatics と呼称される手法を用いた *in silico* 新規遺伝子開拓研究や、病人と健常人との遺伝子・蛋白質の違いによって病態を支配する遺伝子が同定できるとの仮定のもと網羅的な遺伝子解析を可能とする遺伝子チップ等の開発が莫大な投資の元行われてきた。しかし、実際にこれらの情報を元に創出

された阻害剤や促進剤が *in vitro* 系では活性を示すことは認められても、病態モデルを中心とした *in vivo* 系においては期待された効果を示さず具体的な成果を出ることがないまま現在まで推移してきている。これらの事実は低分子化合物による生体コントロールの難易性を示すとともに現代科学による homeostatis 解明が不十分であるとの認識を広め、新たな戦略変更を強いる結果となった。

一方、我々は過去の経験から数多くの生理活性物質（副作用，毒性等を含む）を有している。これらの化合物は微量で生体に劇的な変化をもたらすことから、生体内に特異的に結合するターゲット蛋白質が存在し、かつその直接制御が *in vivo* においても明らかに生理作用を示すことが生理活性物質の存在により先に証明されていることから特に注目を集めてきた。しかし、生理活性物質が直接相互作用し、かつ対象とする生理活性を惹起するこのターゲット蛋白質を同定することは技術的な問題点も多く、その多くは未開拓のまま放置されてきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、次に示す三段構えの研究を行うことにある。

**第一**に、下記の4つの要素を併せ持つ新発想アフィニティ担体を開発する。

- (1) 十分な化学的、物理的安定性を有するリジッドな合成高分子から構成される。
- (2) 蛋白質の非特異的吸着を極限まで抑制することが可能な親水性基材より構成される。
- (3) 溶液のフロースルー化を実現し、蛋

白質の浸透を妨げない共連続構造を持たせる。

- (4) 蛋白質の生体内での存在・活動環境を模倣した表面特性を持たせる。

**第二**に、得られたアフィニティ担体に薬物、毒物などの生理活性物質、あるいは藍藻類由来天然物（肝臓毒、神経毒）等をリガンドとして固定化し、蛋白質ライゼート(lysate)と処理することで、リガンドと相互作用可能な、いわゆるターゲット（標的）蛋白質を捕捉し、種々の方法にて同定し、ライブラリ化することでその機能を明らかにすること。

**第三**に、実験の操作性向上のために、アフィニティ担体をキャピラリアレー型とし、同時に複数のリガンドに対する標的蛋白質を同条件で検索可能なシステム作りを行うこと。

つまり、本研究では、単なるアフィニティ担体の開発にとどまらず、蛋白質がフロースルーすることが可能なモノリス型のアフィニティ担体を開発し、加えて、リガンド近傍の環境を実際の蛋白質が機能する細胞部位の環境に類似させることで、より正確なターゲット蛋白質の捕捉の実現と、これらの特性を利用した効率的標的蛋白質の検索装置の開発、すなわちケミカルバイオロジーの推進を含めて最終の目的としている。

### 3. 研究の方法

- (1) モノリス型アフィニティ担体の合成法の確立

従来の粒子型のアフィニティ担体から脱却し、骨格と流路が一体となった共連続構造（**モノリス構造**）を有する全く新しい構造のアフィニティ担体を新規開発する。

- (2) 非特異的吸着の無いモノマー類の検索と利用

アフィニティ担体を構成するモノマー類は、蛋白質の非特異的吸着を抑制するために、親水性の高いエチレンオキシド単位（ $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）を構造として含むPEG型架橋剤モノマーを利用し、リガンド

担持用モノマーも同様な構造を持つ新規開発モノマーを用いる。

- (3) アフィニティ担体の表面環境の制御  
さらにリガンド担持用モノマーに加えて、「間引き剤モノマー」と記載した第三のモノマーを用いて、アフィニティ担体表面の親水的・疎水的環境の調整、およびリガンド担持量の調整を行う機能を賦与する。
- (4) モノリス構造を改良し、タンパク質ライゼートを含む溶液がフロースルー可能な構造を得る  
モノリス構造をさらに改良し、粘度の高いタンパク質ライゼートを低圧力で送液可能にするアフィニティ樹脂を開発する。
- (5) 得られたアフィニティ担体に種々の生理活性物質をリガンドとして固定化し、その標的タンパク質候補を解析する  
よりその蛋白質が実際に存在する環境により近い「場」での蛋白質補足を行うことが可能となるという全く従来に無い新発想のアフィニティ担体の開発を行う。
- (6) キャピラリ内で作成したフロースルー可能なアフィニティ担体を用い、キャピラリアレー型とすることにより、同時に複数条件でのタンパク質検索を試みる。
- (7) 得られた成果を結集し、効率のよい標的タンパク質検索を可能にする方法を詳細に検討する

### 4. 研究成果

下記番号は、実験方法の項目と同じである。

- (1) モノリス型アフィニティ担体の合成法の確立  
簡便な方法で、世界に全く例のないモノリス型のアフィニティ担体の開発に成功した。リガンド密度を自在に変化させることが可能であり、取扱の面でも極めて実用性が高く、試用提供が行われる予定。
- (2) 非特異的吸着の無いモノマー類の検索と利用  
PEG型骨格を用いることにより、そのソフト界面に由来して、非特異的タンパ

ク吸着を劇的に低減できることが分かった。

- (3) アフィニティ担体の表面環境の制御  
共重合および、後表面修飾により、疎水性基、親水性基、イオン交換基をモノマー型で、また、ポリマー型で自在に導入する方法を開発した。
- (4) モノリス構造を改良し、タンパク質ライゼートを含む溶液がフロースルー可能な構造を得る  
同様のモノマーを用いて、サブミリサイズのキャピラリー内でフロースルーが可能な連続的なモノリス媒体の調製に世界で初めて成功し、その分子認識特性を明らかにした。
- (5) 獲られたアフィニティ担体に種々の生理活性物質をリガンドとして固定化し、その標的タンパク質候補を解析する  
同じリガンドを固定した場合でも、捕捉できるタンパク質が異なることを世界で初めて明らかにし、単にどのようなアフィニティ担体でも同じ結果が得られず、その表面特性の制御が極めて重要であることを明らかにした。
- (6) キャピラリー内で作成したフロースルー可能なアフィニティ担体を用い、キャピラリーアレー型とすることにより、同時に複数条件でのタンパク質検索を試みる。  
アフィニティ担体の表面特性により、捕捉できるタンパク質が異なることから、キャピラリー内で調製したモノリス型担体の分子認識能について詳細に検討し、疎水性の保持に基づく第一次保持に加えて、保持された分子に対して、カルボキシル基、フェノール性水酸基などに特異的な保持を示すことを明らかにした。  
また、開発した担体は、有機溶媒の濃度が高い場合でも表面水和を必要とせず、従って、タンパク質との非特異的吸着が抑制されることを本実験でも明らかにした。
- (7) 得られた成果を結集し、効率のよい標的タンパク質検索を可能にする方法を詳細に検討する  
表面に種々の官能基を導入することにより、様々な存在環境でのリガンドに対する標的タンパク質捕捉が可能となった。また、疑似細胞膜構造を併せ持つアフィニティ担体の開発にも成功した。

これらの事を総合して、申請時の目的は十分に達成され、世界的にも例の無いモノリス構

造を持つアフィニティ担体を開発すると同時に、表面修飾により、リガンド環境を自在に変化させることができる方法を開発した。

また、それらのアフィニティ樹脂を用いた生理活性物質の標的タンパク質検索における問題点を明らかにし、単純に市販のアフィニティ担体を用いることでは標的タンパク質検索が必ずしも妥当な結果を与えないという警鐘を鳴らすと同時に、今後のケミカルバイオロジーの推進に充分に寄与する成果を挙げることができたと確信をしている。

#### 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 22 件)

- (1) T. Mori, T. Kubo, and K. Hosoya  
Basic Chromatographic Properties of Polyethylene Glycol-type, Polymerbased Monolithic Columns  
*Anal. Sci.*, (査読有) 26(Mar) 311 - 316 (2010)
- (2) T. Kubo, F. Watanabe, N. Kimura, K. Kaya, and K. Hosoya,  
Novel polymer monolithic column for hydrophilic compounds.  
*Chromatographia*, (査読有) 70. 527 - 532 (2009).
- (3) T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, Y. Tominaga,  
Effective recognition on the surface of a polymer prepared by molecular imprinting using ionic complex.  
*Macromolecules*, (査読有) 42(8), 2911 - 2915 (2009).
- (4) T. Mori, T. Kubo, K. Kaya, and K. Hosoya,  
Quantitative evaluations of surface-concentrated amino groups on monolithic type solid supports prepared by co-polymerization method.  
*Colloid and Polym. Sci.*, (査読有) 287 (5), 513 - 523 (2009).
- (5) T. Mori, T. Kubo, K. Kaya, and K. Hosoya,

Importance of surface properties of affinity resin for capture of a target protein, Cyclooxygenase-1. *Bioorg. Med. Chem.*, (査読有) 17, 1587 - 1599 (2009).

- (6) H. Aoki, N. Tanaka, **T. Kubo**, and **K. Hosoya**,

Polymer-based monolithic columns in capillary format tailored by using controlled *in situ* polymerization. (Review) *J. Separation Sci.*, (査読有) 32, 341 - 358 (2009).

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

- (8) **K. Hosoya**, M. Sakamoto, K. Akai, T. Mori, **T. Kubo**, K. Kaya, K. Okada, N. Tsujioka, and N. Tanaka,  
A novel chip device based on wired capillary packed with high performance polymer-based monolith for HPLC: Reproducibility in preparation processes to obtain long column. *Anal. Sci.*, (査読有) 24 (1), 149 - 154 (2008).

- (9) **T. Kubo**, N. Kimura, **K. Hosoya**, and K. Kaya,  
Novel polymer monolith prepared from a water-soluble crosslinking agent. *J. Polym. Sci., Part A Polymer Chemistry*, (査読有) 45, 3811 - 3817 (2007).

[学会発表] (計 7 2 件)

- (1) T. Mori, **T. Kubo**, and **K. Hosoya**  
Development of PEG type Monolithic Polymer Semi-micro Columns for HPLC.

TENTH TETRAHEDRON SYMPOSIUM, 23 - 26  
June 2009, Paris, France

- (2) T. Mori, **T. Kubo**, and **K. Hosoya**  
Preparation and application of monolithic type affinity resin, Moli-gel. 2008 Eastern Analytical Symposium and Exposition, November 19<sup>th</sup>, 2009, Somerset, New Jersey (USA)

- (3) 森 朋子, **細矢 憲**, 他  
アフィニティ担体を用いた天然物・毒物に対する未知標的タンパク質探索研究〜リガンド密度と結合タンパク質との相関〜  
みちのく分析科学シンポジウム  
2007 仙台, 2007 年 7 月 27 日, 東北大学

[図書] (計 2 件)

- (1) 渡部悦幸, **久保拓也**, **細矢 憲** 化学同人 (京都),  
ベーシック機器分析化学 (濃縮・抽出・分離を用いた機器分析の基礎)  
2008 年 18 - 27

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- (1)  
名称: エポキシ樹脂硬化物多孔体の製造方法  
発明者: **久保拓也**, **細矢 憲**  
権利者: 東北大学  
種類: 特許出願  
番号: 2009-197740  
出願年月日: 2009 年 8 月 28 日  
国内外の別: 国内

- (2)  
名称: アフィニティ担体及びその製造方法  
発明者: **細矢 憲** 他  
権利者: リバースプロテオミクス研究所  
種類: 特許出願  
番号: WO/2007/142331  
出願年月日: 2007 年 6 月 7 日  
国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

<http://kava2.kankyo.tohoku.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細矢 憲 (HOSOYA KEN)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：00209248

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

久保 拓也 (KUBO TAKUYA)

東北大学・大学院環境科学研究科・助教

研究者番号：20374994