

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06988

研究課題名(和文) 創薬につながるタンパク質翻訳後修飾調節分子の迅速スクリーニング法

研究課題名(英文) Screening of post-translational modified molecules by using functional zinc complexes

研究代表者

小池 透 (Koike, Tohru)

広島大学・医系科学研究科(薬)・教授

研究者番号：90186586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の可逆的リン酸化やアセチル化などをスイッチとする生体機能制御の研究は、癌や免疫疾患などの原因究明、治療薬の開発、iPS細胞の分化制御などを目的として、グローバルな研究組織で精力的に進められている。本研究では、オリジナルな亜鉛錯体化合物(蛍光性フォスタグ、マイクロビーズ結合型フォスタグとチオタグ)を複数合成し、それらを用いた翻訳後修飾調節分子の迅速スクリーニング法の開発に必要な化学的基礎データを取得した。それらのデータを基礎として、キナーゼ反応に關与する人タンパク質のリン酸化プロファイリング法や培養細胞を用いたキナーゼ阻害剤スクリーニング法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロモル濃度以下のリン酸化生体分子を生理条件下で選択的に捕捉する低分子亜鉛錯体化合物を用いて、生体機能制御を担うリン酸化シグナル分子の蛍光分析法やリン酸基やチオール基と親和性のあるマイクロビーズ法を開発した。その研究手法は、現在汎用されているリン酸化シグナルの分析法(放射性同位体法やリン酸化分子の抗体を用いる方法)と比較して、迅速な定量定性解析を可能にし、簡便な操作性や安全性などの利点を持ち、癌やアルツハイマーなどの治療薬や次世代の抗菌薬やiPS細胞などの研究に適用可能な遺伝子制御試薬の開発に役立つオリジナルな分析技術である。

研究成果の概要(英文)：By using original functional zinc(II) complexes, phosphate- and thiol-capturing molecules (Phos-tag and Thio-tag), we have developed reliable analytical probes for the screening of post-translational modified molecules. In this study, we synthesized several original zinc(II) complex compounds (fluorescent Phos-tag, microbead-bound Phos-tag and Thio-tag), and used them to collect the basic chemical data necessary for the development of a rapid screening method for post-translational modification regulatory molecules. Based on the data, we developed a method for phosphorylation profiling of human proteins involved in kinase reactions and a method for screening kinase inhibitors using cultured cells.

研究分野：医薬分子機能科学

キーワード：リン酸化タンパク質 フォスタグ技術 チオタグ技術 翻訳後修飾 マイクロビーズ法 蛍光分析法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 複雑な生命現象を制御するタンパク質翻訳後修飾の全体像の解明は、次世代の重要な研究課題である。タンパク質のアシル化、リン酸化、糖鎖付加などをスイッチとする生体機能制御の研究は、癌や免疫疾患などの原因究明、治療薬の開発、iPS 細胞の分化制御などを目的として、グローバルな研究組織で精力的に進められている。全荷電数の減少や疎水性の増加をもたらすタンパク質のアシル化反応は、分子間相互作用や細胞内分画へのタンパク質の局在化を介して様々な遺伝子の発現や特定分子のリクルートに関わっている。また、タンパク質のリン酸化反応は、時間的および空間的に変化する生体内情報伝達やタンパク質の大きな構造変化をもたらす化学修飾である。それら翻訳後修飾を担う酵素の機能調節分子(阻害剤や活性化分子)は、翻訳後修飾の研究に不可欠な機能性分子である。それゆえ、翻訳後修飾の研究には、従来法である放射性同位体法や抗体などの研究ツールに加え、それらとは異なる視点で新規の阻害剤や活性化因子を用いた信頼性の高い情報が得られる簡便な分析手法が求められている。現在、翻訳後修飾に関連した酵素反応の解析法には、蛍光色素などで標識した人工基質や阻害剤が用いられているが、それらの数は、極めて限られている。一方、アシル化やリン酸化された反応生成物(天然型タンパク質)の解析には、電気泳動法や免疫学的手法など手間と時間がかかる研究手法が用いられている。翻訳後修飾をターゲットとした調節分子の化合物評価は、次世代の重要な研究課題の一つである。したがって、従来法と異なる革新的な研究技術が強く求められており、翻訳後修飾を調節する分子をより簡便かつ迅速にスクリーニングできる新しい分析手法の開発が必要とされている。

(2) 当該研究者は、亜鉛を必須とする酵素がアニオン性の基質を配位結合を介して捕捉する機能を持っていることに注目して、長年に渡り低分子亜鉛錯体化合物の特異的機能に関する研究を行ってきた。その研究成果の1つにリン酸基やチオール基をもつ化合物を生理条件下で選択的に捕捉する亜鉛酵素の活性中心モデル(一般名:フォスタグとチオタグ)の発見がある。二核亜鉛錯体のフォスタグは、カルボン酸イオンに対し10,000倍以上のリン酸イオン親和性があり、単核亜鉛錯体のチオタグはカルボン酸イオンに対し1,000倍以上のチオール親和性を持つ機能性低分子である。

### 2. 研究の目的

本研究では、蛍光発色基を有するフォスタグやチオタグを用いて、翻訳後修飾を担う酵素(アシル化およびリン酸化)の機能調節分子を探索することを目的として、新しい科学原理に基づいたハイスループット性を加味したスクリーニング法を開発する。国内外において、生体分子と亜鉛イオンの溶液内相互作用を化学的に追求し、その成果を実用的な分析技術へ応用する研究は、当該研究者のグループ以外ではほとんど行われていない。これまでに開発したフォスタグやチオタグ誘導体は、リン酸化分子やチオール誘導体を分解することなく分離したり、検出したりできる実用的な生体分子解析試薬である。本研究はそれら独自の研究成果を基礎として新規研究を展開した。本研究で開発するフォスタグやチオタグを用いた簡便かつ迅速な蛍光分析の科学原理は、複数の微量検体(候補分子群)を一度に検査できるアレイフォーマットのアッセイ法やマイクロプレートを用いたリアルタイム蛍光分析法に適用できる。これまでに開発した蛍光発色基を付加したり、マイクロビーズに結合させたフォスタグおよびチオタグ誘導体を当初使用するが、必要に応じてより水溶性の高い蛍光発色基を有したり、素材の異なるマイクロビーズに結合した新規蛍光性誘導体の合成、さらに、それらの化学的性質や分析条件の適用範囲の検討も研究目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) マルチリン酸化反応の蛍光検出法: 細胞内タンパク質は、80%以上がリン酸化されていると

考えられている。それらの中で、近接するアミノ酸の同時リン酸化が、細胞の異常増殖などを惹起するタイプも数多く報告されている。それらの検出には主に抗体法が使用されている。本研究では TAMRA-TAMRA 複合体形成などの近接した蛍光発色基の消光現象を利用して、天然型タンパク質のマルチリン酸化反応の迅速蛍光検出システムを検討した。近接リン酸化部位を持つ  $\gamma$ -カゼインを用いた場合、TAMRA-Phos-tag の消光率は 1  $\mu$  モル濃度で蛍光強度 (557 nm) が約 60%減少すること、また同条件下の脱リン酸化体では消光しないことを以前確認している。本研究では、実施例として MAPK 情報伝達系の dual-specificity kinase, MEK とその天然型タンパク質やペプチド性基質のマルチリン酸化反応を、TAMRA や BODIPY 系のフォスタグ誘導体を使用して蛍光検出法を検討した。

(2) 生体関連低分子アニオンを捕捉したフォスタグおよびチオタグの単離とその構造解析 (pH 滴定法, X 線結晶構造解析法, 各種分光法) を行なった。アニオン性配位子は、アデノシン-リン酸, ピロリン酸, オルトリン酸, 5-フルオロウラシルなどである。

(3) 阻害剤プロファイリング実施例の作成: リン酸化酵素に対する既知の阻害剤を使って、蛍光分析法によりそれら阻害剤のプロファイリング実施例 (濃度依存的な酵素活性変化曲線による IC<sub>50</sub> 解析など) を作成した。標的タンパク質として、ヒストンや ERK (MEK の基質) など、電気泳動法でアセチル化やリン酸化動態を解析した実績のあるものを用いた。

(4) 迅速スクリーニング法への展開: ハイスループット性を加味した新たな蛍光分析システムが確立できれば、リン酸化酵素の調節分子の候補化合物群を簡便かつ迅速にスクリーニングできる。ロースループット法である (3) の実施例をコントロールとして、マルチプレート法やドットプロット法で阻害剤スクリーニングの最適化に必要な実験条件の検討を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究以前に開発した蛍光発色基を有するフォスタグおよびチオタグ誘導体と生理条件下で使用可能な水溶性の大きい蛍光発色基 (Sulfo-Cy3) を有する新規蛍光性誘導体の合成法を最適化し合成プロトコルを公開した。それら蛍光性亜鉛錯体化合物は、翻訳後修飾調節分子の迅速スクリーニング法で使用する。新規化合物の化学的性質を検討した結果、リン酸基を捕捉する蛍光性フォスタグと蛍光性チオール基を捕捉するチオタグが水溶液中 (生理 pH, マイクロモル濃度) で、それぞれ、リン酸モノエステルとチオール化合物を 95%以上の捕捉能をもつことを確認した。フォスタグがリン酸モノエステルを選択的に捕捉することを確認するため、様々なリン酸誘導体とフォスタグの複合体の構造を pH 滴定と結晶構造解析により決定した。リン酸化合物として、アデノシン-5'-リン酸,  $\gamma$ -グリセロリン酸, フェニルリン酸, オルトリン酸の溶液内の構造を明らかにした。チオタグ分子については、水分子配位型の基本構造を明らかにした。

(2) (1) で合成した蛍光発色基を有するフォスタグ (リン酸基捕捉分子) およびチオタグ誘導体 (チオール捕捉分子) と組み合わせて使用する機能性担体の種類や標的分子の捕捉性能などの検討を行なった。樹脂系のマイクロビーズや糖鎖系のアガロースビーズに結合したフォスタグ分子のリン酸化ペプチドに対する配列特異性について、異なる捕捉タイプのリン酸基捕捉剤 (チタニア) との相違点について比較検討を行なった。その結果、アガロースビーズに結合したフォスタグが、捕捉性能と基質選択率において、最も優れていることが明らかとなった。核酸系リン酸モノエステルである AMP を捕捉したフォスタグの溶液内平衡とその結晶構造解析に成功した。また、アニオン性配位子が結合したチオタグの結晶構造解析 (5 種類) を行い、チオールの結合部位の構造学的特性を解明した。さらに、人由来の培養細胞内でリン酸化酵素とその基質タンパク質の同時発現系を複数構築し、それら細胞内の翻訳修飾過程をフォスタグを用いて分析するオリジナルな分析手法を開発した。また、キナーゼと基質タンパク質の遺伝子を合わせ持つプラスミドを複数作成し、大腸菌内でキナーゼ反応を行うシステムを構築し、キナーゼ阻害剤の新しい *in vivo* スクリーニング法を開発した。

(3) 2 種類のマイクロビーズに結合したフォスタグが捕捉したリン酸化生体分子の結合および解離の速度論に関する新しい知見 (最適な結合および解離時間, 最適な結合および解離のための

溶液組成，操作手順)を得た。それらマイクロビーズは，リン酸化生体分子の1ビーズ分離分析法を可能にする機能性分子である。また，チオタグにチオール以外のアニオン性配位が結合した結晶の構造解析を行い，チオールの結合部位の構造学的特性を解明した。さらに，各種培養細胞系で発現させたリン酸化酵素のリン酸化状態の解析をフォグタグを用いて分析する手法を開発した。この手法は，生化学実験で使用する活性型キナーゼの調製法における重要な知見を与えるものである。今後，本研究課題で得られた知見をもとに，翻訳後修飾を調節する分子をより簡便かつ迅速にスクリーニングできるオリジナルな分析手法の開発の継続を予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 17件）

1. 著者名 E. K.-Kikuta, M. Yoshimoto, M. Yano, E. Kinoshita, and Tohru Koike	4. 巻 70
2. 論文標題 An assay of human tyrosine protein kinase activities by using an Escherichia coli protein-expression system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 209-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/btn-2020-0154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Y. Ichimaru, J. Wanchun, Y. Yamaguchi, K. Sugiura, M. Imai H. Kurosaki, H. Fujioka, Tohru Koike, Y. Hieda, and K. Kato	4. 巻 37
2. 論文標題 Crystal Structure of [1(1),1(4),1(10),5(1),5(4),5(7),5(10)-octaaza-1,5(1,4)-dicyclododecana-3,7(1,3)-dibenzencyclo-octaphane]zinc(II) tetrakis(nitrate), [m,m-bis(ZnII-cyclen)](NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 X-ray Structure Analysis Online	6. 最初と最後の頁 87-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/xraystruct.37.15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Y. Ichimaru, K. Kato, H. Kurosaki, H. Fujioka, M. Sakai, Y. Yamaguchi, J. Wanchun, K. Sugiura, M. Imai, and Tohru Koike	4. 巻 6
2. 論文標題 Aqua(1,4,7,10-tetraazacyclodecane =cyclen)zinc(II) diperchlorate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IUCrData	6. 最初と最後の頁 397-415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2414314621003977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Y. Ichimaru, K. Kato, W. Jin, K. Sugiura, E. K.-Kikuta, E. Kinoshita, H. Kurosaki, and Tohru Koike	4. 巻 37
2. 論文標題 Crystal Structure of bis{1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato-dizinc(II)}-orthophosphate tris(perchlorate) octahydrate, [(Phos-tag) <sub>2</sub> -P043 - ](ClO <sub>4</sub> - ) <sub>3</sub> -8H <sub>2</sub> O	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 X-ray Structure Analysis Online	6. 最初と最後の頁 87-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/xraystruct.37.87	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 E. K.-Kikuta, Y. Ichimaru, Y. Yamano, K. Kato, H. Kurosaki, E. Kinoshita, and Tohru Koike	4. 巻 94
2. 論文標題 Characterization of the Binding of Adenosine-5'-monophosphate to a $\mu$ -Type Alkoxide-linked Dinuclear Zinc(II) Complex in Crystal and Solution State	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 2670-2677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20210280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 E. K.-Kikuta, E. Kinoshita, M. Suga, M. Higashida, Y. Yamane, T. Nakamura, and Tohru Koike	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of phosphorylation status and kinase activity of Src family kinases expressed in cell-based and cell-free protein expression systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1448-1461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11101448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Ino, E. Kinoshita, E. K.-Kikuta, T. Akiyama, Y. Nakai, M. Osada, A. Ryo, H. Hirano, Tohru Koike, and Y. Kimura	4. 巻 216
2. 論文標題 Evaluation of four phosphopeptide enrichment strategies for mass spectrometry based proteomic analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proteomics	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.202100216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 E. Kinoshita-Kikuta, S. Maruta, Y. Eguchi, M. Igarashi, T. Okajima, R. Utsumi, E. Kinoshita, and T. Koike	4. 巻 600
2. 論文標題 An immuno-dot blot assay for screening histidine kinase inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113765-113768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113765	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 M. Tsunehiro, K. Sasaki, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike	4. 巻 1151
2. 論文標題 Phos-tag-based micropipette-tip method for analysis of phosphomonoester-type impurities in synthetic oligonucleotides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 122198-122206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchromb.2020.122198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Ichimaru, M. Imai, H. Fujioka, T. Koike, H. Kurosaki, and K. Kato	4. 巻 36
2. 論文標題 Crystal Structure of [3-(1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1-yl)propan-1-amine]zinc(II) Bis(perchlorate)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 X-ray Structure Analysis Online	6. 最初と最後の頁 43-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/xraystruct.36.43	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 E. Kinoshita-Kikuta, T. Utsumi, A. Miyazaki, C. Tokumoto, K. Doi, H. Harada, E. Kinoshita, and T. Koike	4. 巻 10
2. 論文標題 Protein-N-myristoylation-dependent phosphorylation of serine 13 of tyrosine kinase Lyn by casein kinase 1 at the Golgi during intracellular protein traffic	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16273-16285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73248-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 E. Kinoshita-Kikuta, K. Akayama, E. Kinoshita, and T. Koike	4. 巻 64
2. 論文標題 A dot-blot-staining method for detecting phosphoproteins with a Phos-tag Aqua fluorescent dye	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/jelectroph.64.7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Ichimaru, K. Kato, K. Sugiura, C. Hirata, W. Jin, H. Fujioka, H. Kurosaki, and T. Koike	4. 巻 38
2. 論文標題 Crystal Structure of $[\{m,m\text{-bis}(\text{ZnII-cyclen})\}_3(\mu_2\text{-CO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)\text{H}_2\text{O}$	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 X-ray Structure Analysis Online	6. 最初と最後の頁 53-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/xraystruct.38.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Ichimaru, K. Kato, M. Kurihara, W. Jin, T. Koike, and H. Kurosaki	4. 巻 7
2. 論文標題 [1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane- 4N bis-nitrato- 20,0'zinc(II)] methanol solvate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IUCrData	6. 最初と最後の頁 220854-220863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2414314622008549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 E. Kinoshita-Kikuta, Y. Ino, Y. Kimura, T. Akiyama, E. Kinoshita, and T. Koike	4. 巻 66
2. 論文標題 Use of Escherichia coli expression system for analyzing kinase motifs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 13-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/jelectroph. 66.13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Ichimaru, K. Kato, R. Nakatani, K. Sugiura, Hi. Mizutani, E. K.-Kikuta, T. Koike, W. Jin, M. Imai, and H. Kurosaki	4. 巻 147
2. 論文標題 Characterization of Zinc(II) Complex of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane and Deprotonated 5-Fluorouracil (FU) in Crystalline/Solution States and Evaluation of Anticancer Activity: Approach for Improving the Anticancer Activity of FU	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry Communications	6. 最初と最後の頁 110221-110226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.inoche.2022.110221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike	4. 巻 2
2. 論文標題 Phos-tag-based phosphate affinity chromatographic techniques	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography Open	6. 最初と最後の頁 10051-10061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcoa.2022.100051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------