

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21472

研究課題名(和文)超高性能クライオEMの分子プローブ創製

研究課題名(英文)Molecular probe for high-performance cryo-EM

研究代表者

金井 求(Kanai, Motomu)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：20243264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体高分子やオルガネラ、細胞のクライオ電子顕微鏡観察は、構造生物学研究に不可欠な分析手段であるが、感度の低さが課題になっている。感度を向上させる方法として、電子線反射能の高い金属粒子を標的に結合させるアプローチがある。本研究において我々は、クライオ電顕観測に適した性質を備えたAu25ナノクラスターを、Trp修飾により二工程で抗体に対して均質性高く結合させる方法を開発した。Immunogoldが実際に合成できていることを、SECとクライオ電顕観測によって確認した。合成収率は高くないが、本研究はAu25ナノクラスターを抗体修飾した初の成功例となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体に金ナノ粒子を結合させたimmunogoldは、抗体の高い標的分子識別能と金粒子の高い電子線反射能の双方を併せ持つことから、高次の生命現象の分子機構解明への適用が期待される。Immunogoldのその他の用途として、光照射による金ナノ粒子の活性酸素生成を利用するがん光線力学療法や、吸光係数が大きいことから極低濃度でも視認できることを活かした抗体検査プローブなどが想定される。

研究成果の概要(英文)：We achieved bioconjugation of Au25 nanocluster to a monoclonal antibody at scarcely exposed tryptophan (Trp) residues, toward the development of high-resolution probes for cryogenic electron microscopy (cryo-EM) and tomography (cryo-ET). We improved the Trp-selective bioconjugation by using hydroxylamine reagents. This new protocol allowed for the application of Trp-selective bioconjugation to acid-sensitive proteins such as antibodies. We found that a two-step procedure, utilizing first Trp-selective bioconjugation for introduction of azide groups to the protein and then strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) to attach bicyclononyne (BCN)-presenting, redox-sensitive Au25 nanocluster, was essential for scalable procedure. Covalent labeling of the antibody with gold nanoclusters was confirmed by cryo-EM analysis of the Au25 nanocluster conjugates.

研究分野：有機合成化学

キーワード：抗体修飾 トリプトファン 金ナノ粒子 クライオ電顕

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体高分子やオルガネラ、細胞のクライオ電子顕微鏡 (EM) 観察は、構造生物学研究に不可欠な分析手段であるが、感度の低さが課題になっている。

(2) 感度を向上させる方法として、電子線反射能の高い金属粒子を標的に結合させるアプローチがあるが、結合パターンは限定的で、不均質な生成物を与える結合法が一般的であった。

2. 研究の目的

(1) クライオEMの新規精密プローブとなりうる抗体 - 金ナノ粒子複合体の合成法を開発する。

(2) 本研究で開発する新規抗体 - 金ナノ粒子複合体のクライオEM観察をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 我々が開発した keto-ABNO を用いたトリプトファン (Trp) 選択的なタンパク質修飾法を基盤として、抗体 - 金ナノ粒子複合体の新規合成法を開発する。

(2) 本研究で開発した抗体 - 金ナノ粒子複合体のクライオEM観測をおこない、その性能を評価する。

4. 研究成果

(1) 抗体 - 金ナノ粒子複合体の新規合成法の開発

生体高分子やオルガネラ、細胞のクライオEM観察は、構造生物学研究に不可欠な分析手段であるが、感度の低さが課題になっている。感度を向上させる方法として、電子線反射能の高い金属粒子を標的に結合させるアプローチがある。特に、抗体に金ナノ粒子を結合させた抗体 - 金ナノ粒子複合体は、抗体の高い標的分子識別能と金粒子の高い電子線反射能の双方を併せ持つことから、高次の生命現象の分子機構解明への適用が期待される cryo-トモグラフィー (ET) に有用なプローブとなる。抗体 - 金ナノ粒子複合体のその他の用途として、光照射による金ナノ粒子の活性酸素生成を利用するがん光線力学療法や、吸光係数が大きいことから極低濃度でも視認できることを活かした抗体検査プローブなどが想定される。

様々な応用が期待される抗体 - 金ナノ粒子複合体であるが、その調製には、タンパク質と無機金属粒子といった異なるカテゴリーに属する分子どうしを精密に繋ぐ技術が必要となる (Figure 1)。この技術の開発は、重要かつ最先端の合成化学的な標的であると認識している。タンパク質は有機分子ではあるが、巨大 (一般的な抗体の分子量は 20 万程度) で、室温・水中・中性条件で扱う必要があり、抗体は特に凝集しやすい。抗体の持つ最大の特徴である選択的で高い抗原結合能を損なわないために、抗原結合部位 (Fab) への修飾を回避する必要がある。また、修飾位置や修飾個数 (cluster-antibody ratio: CAR) によって抗原結合特性や物性が異なるので、なるべく均質性高く修飾できる方法が有利である。一方で金ナノ粒子の方も、クライオ電顕によって金の原子数まで識別できるのでできるだけ均質性が高い方が良いが、中でも直径 1 nm 程度の金ナノ粒子が signal/noise ratio (S/N 比) に優れていると考えられる。

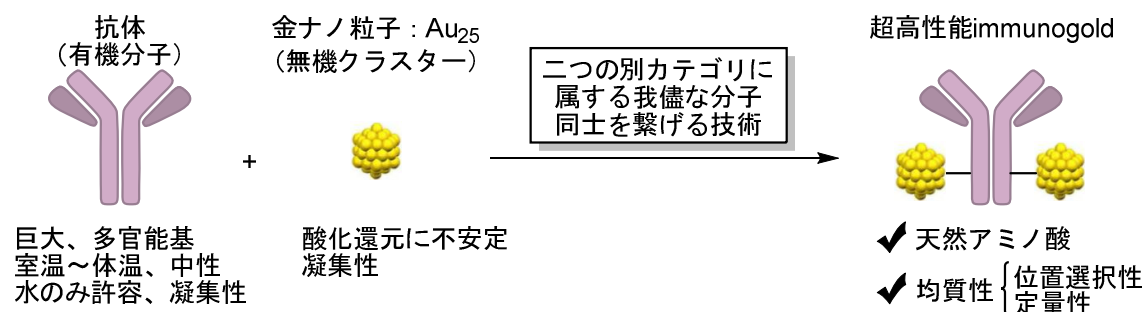


Figure 1

今回、我々が開発した keto-ABNO を用いたトリプトファン (Trp) 選択的なタンパク質修飾法 [1] と東大院理・佃達哉研究室が有する金ナノクラスター (Au₂₅) 表面修飾技術 [2] を融合することで、クライオ電顕への適用が可能な新規均質抗体 - 金ナノ粒子複合体の合成に成功した [3]。

抗体 - 金ナノ粒子複合体の最も単純な合成ルートは、Au₂₅ の配位子末端に keto-ABNOH が結合した **1** を調製し、**1** を Trp 共役反応によって抗体と結合させるものである (Figure 2)。報告例のあるアミノエタチオールを配位子として有する Au₂₅(SR)₁₈ (R = C₂H₄NH₂) に対して、チオール基を末端に有する keto-ABNOH **2** を用いてリガンド交換をおこない、1 クラスター当たり 2 ~ 3 個の keto-ABNOH を提示する Au₂₅ **1** を合成した。**1** を TEMPO⁺により酸化的に活性化しながら抗体 trastuzumab との Trp 共役反応に付したが、目的の反応は全く進行しなかった。MS で痕跡量観測される共役体は、Au₂₅ が酸化されたもののみであった。

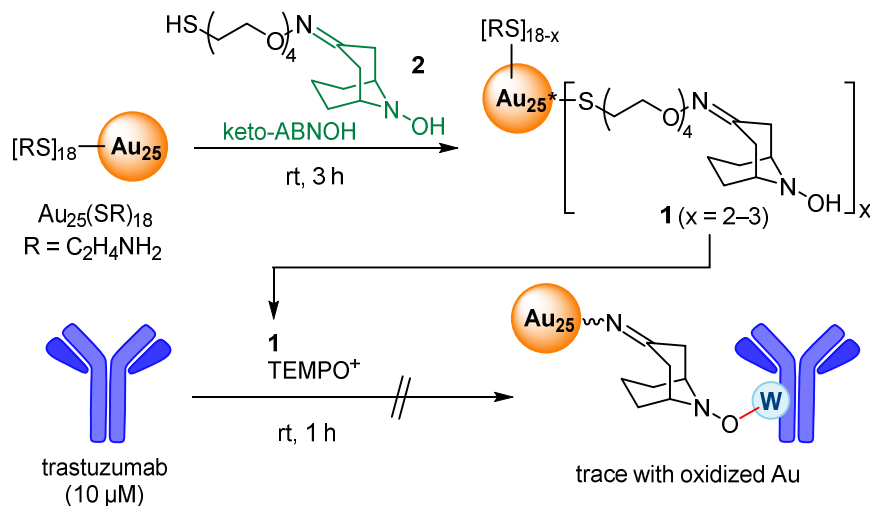


Figure 2

そこで次善の策として、アジド基を有する keto-ABNOH 誘導体 **3** と Trp との反応により抗体を均質性高く修飾してアジド基を提示した抗体 **4** をまず合成し、**4** に対して酸化還元過程を経ることなく Au₂₅ を結合した bicyclononyne (BCN) を strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) によって結合させる二工程法をとることとした (Figure 3)。Trastuzumab と **3** との Trp 共役反応は問題無く進行し、**4** がほぼ定量的に得られた。一方で、Au₂₅ - カプトプリル錯体 **5** を BCN アミン **6** と縮合し、1 クラスター当たり約 1 個の BCN を提示する **7** を合成した。**4** と **7** を SPAAC に付したところ、収率は低いながらも抗体 - 金ナノ粒子複合体 **8** を得た。生成物を size-exclusion column chromatography (SEC) で解析したところ、原料 trastuzumab よりも少しだけ早く

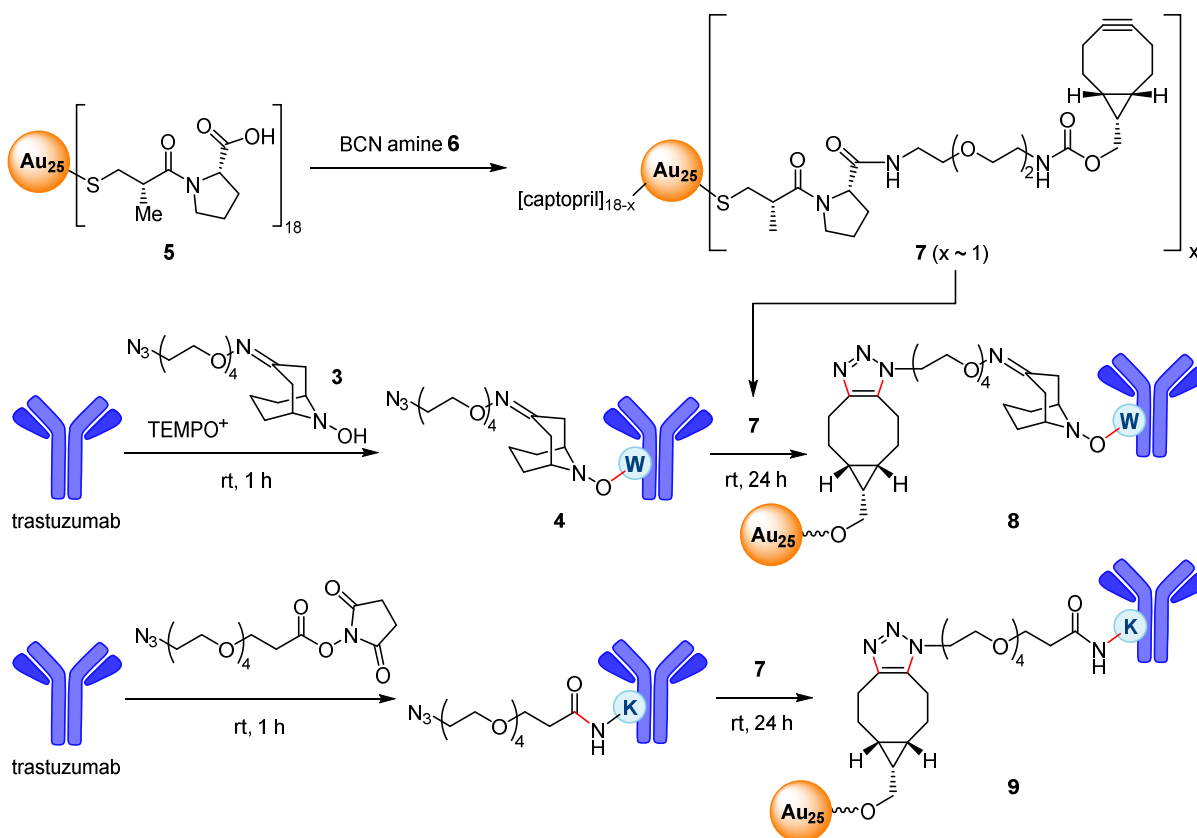


Figure 3

溶出する画分に、タンパク質の持つ 280 nm の吸収と金クラスターの持つ 380 nm の吸収の両方を有する **8** が観測できた。コントロールとして、Lys に対して Au₂₅ を導入した抗体 - 金ナノ粒子複合体 **9** も合成した。**9** の収率は比較的高く、やはり原料に対してやや早く溶出する画分に **9** が観測できた。SEC により抗体 - 金ナノ粒子複合体を単離精製し、それらの吸光分析から **8** の CAR は 0.66、**9** の CAR は 2.75 と決定した。CAR が高いことに起因すると考えられるが、Lys 共役体 **9** には顕著な凝集が見られた。また、抗原 (HER2) 結合能を ELIZA で調べたところ、未修飾の trastuzumab に比較して結合能は低下しているものの、それでも nM オーダーでの結合活性が残っていることが分かった。

(2) クライオ EM 観測

8 と **9** を用いて、東大院医・吉川雅英研究室の協力のもとにクライオ電顕観測をおこなった (Figure 4)。その結果、Au₂₅ クラスターと思われる黒点状の陰影が抗体の Y 字型の物質の上に観測できた (Figure 4A, B)。原料である trastuzumab には、黒点は観測されなかった (Figure 4C)。Image J を用いた解析から、**8** の方が **9** よりも黒点の数が少ないことも見て取れ、この結果は吸光分析から算出される CAR の違いを支持している。今後、これらの新規 immunogold をプローブとして、より詳細なクライオ電顕観測をおこなっていく予定である。

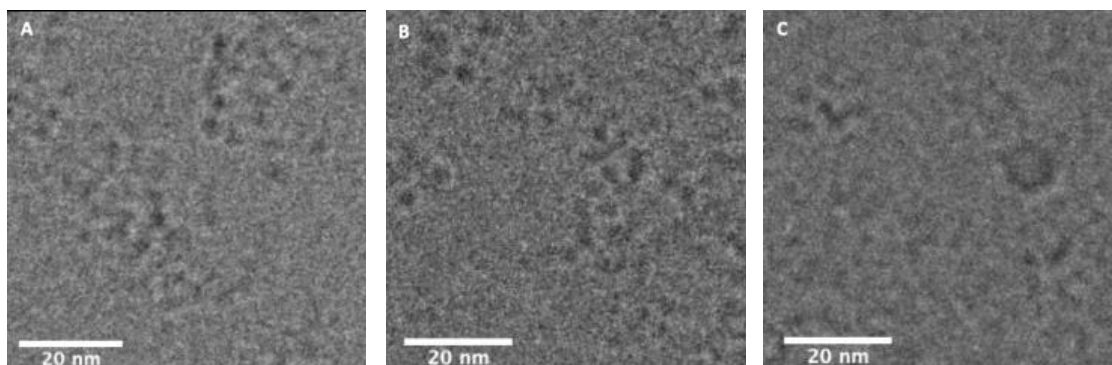


Figure 4. Cryo-EM images. **A.** Au₂₅-trastuzumab Trp-conjugates. **B.** Au₂₅-trastuzumab Lys-conjugates. **C.** Non-conjugated trastuzumab.

今回、クライオ電顕観測に適した性質を備えた Au₂₅ ナノクラスターを、Trp 修飾により二工程で抗体に対して均質性高く結合させる方法を開発した。Immunogold が実際に合成できていることを、SEC とクライオ電顕観測によって確認した。合成収率は高くないが、それは SPAAC の効率が低いことに起因していた。この結果は、リンカーの長さは十分に長いと考えられるにもかかわらず、Trp 修飾で導入したアジド基の方が Lys 修飾で導入したアジド基よりも反応性の低い環境に存在することを示唆しており、今後その原因の解明をおこないたい。収率は低いながらも簡便な操作で合成できるため、現状の **8** を用いても応用展開が期待できると考えている。

< 引用文献 >

- [1] “Transition Metal-Free Tryptophan-Selective Bioconjugation of Proteins” Seki, Y.; Ishiyama, T.; Sasaki, D.; Abe, J.; Sohma, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10798–10801.
- [2] “Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)-Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals” Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5261–5270.
- [3] “Bioconjugation of Au₂₅ Nanocluster to Monoclonal Antibody at Tryptophan” Malawska, K. J.; Takano, S.; Oisaki, K.; Yanagisawa, H.; Kikkawa, M.; Tsukuda, T.; Kanai, M. *Bioconjugate Chem.* **2023**, *34*, 4, 781–788.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Adamson Christopher, Kajino Hidetoshi, Kawashima Shigehiro A., Yamatsugu Kenzo, Kanai Motomu	4. 巻 143
2. 論文標題 Live-Cell Protein Modification by Boronate-Assisted Hydroxamic Acid Catalysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 14976 ~ 14980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c07060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Katsuya, Ishiyama Takashi, Seki Yohei, Sakai Kentaro, Togo Takaya, Oisaki Kounosuke, Kanai Motomu	4. 巻 143
2. 論文標題 Protein Modification at Tyrosine with Iminoxyl Radicals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19844 ~ 19855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c09066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tagawa Hiroshi, Maruyama Katsuya, Sasaki Koichi, Konoue Natsuki, Kishimura Akihiro, Kanai Motomu, Mori Takeshi, Oisaki Kounosuke, Katayama Yoshiki	4. 巻 10
2. 論文標題 Induction of ADCC by a folic acid?mAb conjugate prepared by tryptophan-selective reaction toward folate-receptor-positive cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 16727 ~ 16731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra03291c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Malawska Katarzyna Joanna, Takano Shinjiro, Oisaki Kounosuke, Yanagisawa Haruaki, Kikkawa Masahide, Tsukuda Tatsuya, Kanai Motomu	4. 巻 XX
2. 論文標題 Bioconjugation of Au25 Nanocluster to Monoclonal Antibody at Tryptophan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 XX-XX
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.3c00069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 Chemical catalysis targeting biomacromolecules
3. 学会等名 21st Tetrahedron Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 Bioorthogonalなバイオチン-ストレプトアビジン相互作用が拓く ²¹¹ At-プレターゲティング技術
3. 学会等名 放射線科学研究機構キックオフシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体内の分子構造変換ダイナミズムに介入する化学触媒
3. 学会等名 イノベーション人材育成セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子構造変換ダイナミクスに介入する化学触媒
3. 学会等名 触媒学会 つくば地区講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金井研究室HP
<https://gousei.f.u-tokyo.ac.jp/>
金井研究室HP
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kanai/index.html>

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
---------	---------