

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22651081

研究課題名（和文） 有機合成化学を起点とする細胞内外イディオタイプ分子の新規創製法

研究課題名（英文） Synthetic Strategy to Idiotypic Molecules in or on Live Cells by Efficient Bond-Forming Reactions

研究代表者

田中 克典 (TANAKA KATSUNORI)

独立行政法人理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室・准主任研究員

研究者番号：00403098

研究成果の概要（和文）：

独自の鋳型誘起合成により、リン酸化タンパク質（鋳型）を認識する機能性ペプチドを、鋳型から転写合成する方法を開発した。本課題では、特に上皮成長因子受容体(EGFR)の下流のシグナル伝達において、リン酸化タンパク質を認識するアダプタータンパク質である Grb2-SH2 ドメイン (Growth-factor Receptor-Bound protein 2/Src Homology 2) の疑似ペプチドを創製することに成功した。このペプチドは、Grb2-SH2 ドメインを凌駕するリン酸化タンパク質選択性を示し、EGFR を高発現する癌細胞に対して選択的な細胞増殖抑制作用を示した。さらに癌モデルマウスにおいても顕著な癌選択的増殖抑制効果を示すことを見出した。

研究成果の概要（英文）：

A new synthetic strategy for obtaining artificial receptors that selectively regulate and/or control specific protein/protein interactions was developed based on the template-assisted and the self-activating click reaction applied to a combinatorial library. Synthetic mimics of the Grb2-SH2 domain, examined as a model case, selectively bound to a target signaling protein to induce cytotoxicity and inhibit tumor growth in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	2,000,000	1,300,000	3,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,840,000	5,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：ペプチド、イディオタイプ、ダイナミック・コンビナトリアルケミストリー、シンセティックバイオロジー、自己活性化型クリック反応、Grb2-SH2 ドメイン

1. 研究開始当初の背景

ジェレミ・サンダー教授らによる平衡反応を巧みに利用した機能性材料分子の合成研

究に代表されるように、ダイナミック・コンビナトリアルケミストリー (DCC) を用いたユニークな分子創製概念が国内外で大いに注目されていた。しかし、生体機能性分子

の創製という観点から本概念が利用された例はほとんどなかった。一方、研究開始当時、反応速度が早く簡便であり、しかも生体分子の相互作用に影響を与えないような高速有機合成反応、例えば Grubbs らによるメタセシス反応や Meldal/Sharpless らのクリック反応の機能性材料や生体制御物質への更なる展開に注目が集まっていた。報告者もこの2つの反応を凌駕するような反応速度と簡便性を持つ反応として、超高速 6 π -アザ電子環状反応を開発し (Tanaka, K. *et. al. J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9660, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 102)、更なる効率的な反応の開発とケミカルバイオロジーへの展開を計画していた。このような背景のもと、DCC の概念とこれら高速結合形成反応の積極的な活用を基盤とした、新たな機能性分子創製の着想に至った。

2. 研究の目的

細胞にはペプチド、タンパク質、または糖鎖など多様なリガンド、ならびにそれらに対応する多数の受容体の作成と準備がなされており、それぞれに応じたシグナルを伝達することで、生体内応答を増幅または減衰させその機能調節に貢献している。また免疫応答反応に代表されるように、自己は外敵(リガンド)に特異的に結合する抗体をオーダーメイドで作成することができる。本研究課題は、このような生体分子の特異的な相互作用にヒントを得て、特定のタンパク質に強く結合する糖鎖リガンド、または特定のタンパク質に選択的に結合するペプチド性イディオタイプを、DCC と高速有機合成反応を併用して自由自在に創製し、さらにそれら創製分子を用いて機能性生体分子の相互作用を制御することを目的とした。生体内現象を模倣した合成有機化学からの新たな挑戦、“シンセティックバイオロジー”の実施を本研究の大きな目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、特定のタンパク質、中でも細胞内リン酸化タンパク質に選択的に結合するペプチド性イディオタイプの創製に取り組んだ。タンパク質リン酸化に起因するシグナル伝達は成長、増殖、生死などを制御する極めて重要な経路で、がん細胞においてはこのシグナルが過剰に伝達され、細胞増殖やアポトーシス抵抗性を引き起こす。そこでリン酸化シグナルの遮断は抗がん作用に繋がるため、キナーゼ阻害剤であるゲフィチニブなどの抗がん剤が開発されてきた。一方、リン酸化タンパク質とそれを認識するタンパク質の結合を阻害することでシグナルを

遮断する試みも多数行われてきた。その多くはリン酸化ペプチドやそのミミックを用いるもので、標的タンパク質が複数のリン酸化シグナルに対応しているために選択性に問題があった(図1)。これに対して報告者は、独自の鑄型誘起反応により、リン酸化タンパク質(鑄型)を認識する機能性ペプチドを、鑄型から転写合成する方法を考案した。得られるペプチドは特定のリン酸化タンパク質に選択的で、個々のタンパク質-タンパク質間相互作用を制御可能な分子をテイラーメイドに設計できると考えた。本課題では、この戦略により、上皮成長因子受容体(EGFR)の下流のシグナル伝達において、リン酸化タンパク質を認識する重要なアダプタータンパク質である Grb2-SH2 ドメイン (Growth-factor Receptor-Bound protein 2/Src Homology 2)の疑似ペプチドを創製することを計画した。

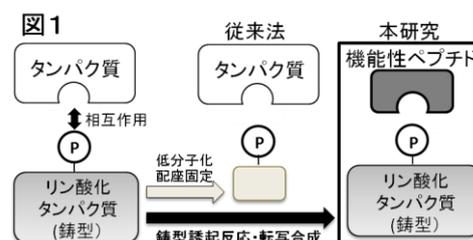


図1 リン酸化シグナルシグナルを制御するための2つのアプローチ

4. 研究成果

1. 鑄型誘起合成の戦略と Grb2-SH2 ドメイン疑似ペプチドの創製

報告者らが実際に行った鑄型誘起合成の概略を図2に示す。報告者らはこれまでに、1のようなペプチド(図4、ペプチド1参照)が、2つのリジン残基を介してリン酸基と結合することを見出していた。そこで、アジド基のような反応基を備えたペプチド1に対して、鑄型となる標的リン酸化タンパク質を配位させた後(図2、ステージI)、さらに幾つかのペプチドライブラリーを同時に作用させることにより、最終的にこのライブラリーの中から鑄型にフィットするペプチドが選択されると考えた(ステージII)。この段階で、非可逆的な結合形成反応(鑄型誘起反応、ステージIII)を実施することにより、鑄型のリン酸化タンパク質に選択的に結合するペプチドが得られると予測した。

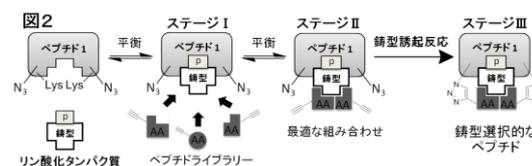


図2 リン酸化タンパク質（鋳型）を認識する機能性ペプチドを鋳型から転写合成する概念図

当初、非可逆的な結合形成反応として、1価銅と塩基の存在下におけるアジド基とアセチレン基との Huisgen[3+2]環化反応を検討していたが、ペプチドを基質として用いた場合には、銅イオンが基質に強く配位するために、反応が良好に進行しなかった。さらに、塩基性条件下で異性化しやすいペプチドには使用できず、鋳型誘起合成に耐える結合形成反応として利用することができなかった。そこで反応条件を精査した結果、塩基に代わる新たな添加剤としてヒスチジン誘導体を見出し、中性条件下での Huisgen 環化反応を実現した。さらにヒスチジンをペプチドに導入することによって（図3）、「自己活性化型」に反応を進行させることが可能であり、これまで難しいとされてきた複雑なペプチド同士の反応を良好に進行させることに成功した。

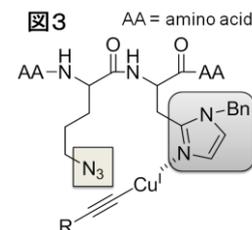


図3 ヒスチジン活性化基による自己活性化型クリック反応

そこで以上の知見を基に、Grb2-SH2 ドメイン疑似ペプチドの鋳型誘起合成を実施した（図4）。実際の検討では、Grb2/S_{H2} が認識するリン酸化部分配列に選択的な分子を効率良く得るために、既知のモデルリン酸化環状ペプチド **3** を鋳型として用いた（図4）。さらにアセチレンペプチドライブラリー **2** を構成するアミノ酸は、既に報告されている Grb2-SH2 ドメインとペプチド **3** との X 線結晶構造解析を基に選択した。すなわち、ヒスチジン残基を導入したペプチド **1** に対して、リン酸化ペプチド **3**（鋳型）の存在下、および非存在下で、アセチレンペプチドライブラリー **2** との Huisgen 反応を行った。HPLC を用いて鋳型の有無による生成物の相違を検討した結果、3種類のクリックペプチド **4a-c** がリン酸化ペプチド **3** の存在下で顕著に再現性良く生成することが判明した。

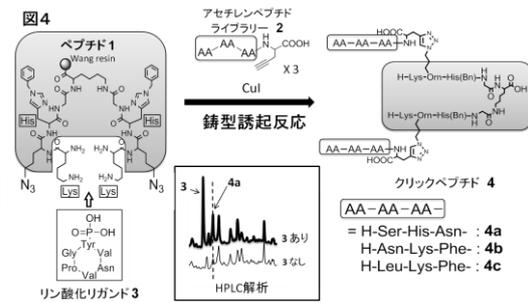


図4 Grb2-SH2 ドメイン疑似ペプチドの鋳型誘起合成

そこで、これらペプチドを固相法によってグラムスケールで再合成し、蛍光標識した環状リン酸化ペプチド **3** に対する解離定数を求めた結果、それぞれ数 μM 程度の相互作用を示すことが判明した (**4a**: $1.5\mu\text{M}$, **4b**: $2.4\mu\text{M}$, **4c**: $2.4\mu\text{M}$)。このように、報告者が開発した鋳型誘起合成法を用いて、Grb2/S_{H2} ドメインの疑似低分子となり得るペプチドを創製することができた。

さらにリン酸化ペプチド **3** との相互作用を向上させることを目指して、ペプチド **4a** の配座固定を検討した。すなわち、**4a** の2つのグリシンに対して *cis*-2-ブテンで架橋し、環状構造を組むことにより、リン酸基の認識に重要な2つのリジン残基が互いに接近する。その結果、リン酸基との相互作用がより増大すると期待した。期待したように、合成した環状ペプチドは、リン酸化ペプチド **3** に対して 590nM の解離定数を示し、直鎖型のペプチド **4a** に比較して約3倍の向上を実現した。

2. Grb2-SH2 ドメイン疑似ペプチドの細胞内シグナル伝達に及ぼす影響

次いで報告者は、上記で得られたクリックペプチドのうち、合成供給や誘導化が容易な **4a** を基本分子として、TAMRA 蛍光やビオチン標識体（図5）を調製して、細胞内のシグナル伝達に及ぼす影響を検討した。

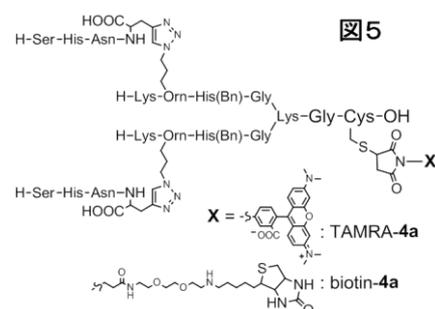


図5 蛍光やビオチン標識クリックペプチドの構造
これら標識基は、ペプチド **4a** の活性に影響

を与えないように、C末端に対してグリシン／システインを介して導入した。まず、EGFRを高発現するA431ヒト扁平上皮癌細胞(Grb2-SH2を介したシグナル伝達が細胞増殖に寄与する)に対してTAMRA-4aを作用させたところ、濃度依存的に細胞内に取り込まれることが判明した(図6A)。そこで、A431癌細胞に対して10 μ Mの4aを37 $^{\circ}$ Cで6時間作用させたところ、顕著な細胞増殖抑制活性やアポトーシス誘導活性を示すことが判明した(図6B)。一方、EGFRを高発現しないC6ラットグリオーマ細胞に対してもペプチド4は細胞内に取り込まれたが、これらの効果は全く認められなかった(図6C)。さらに、Huisgen反応前駆体ペプチド10を用いた場合にも、両者の細胞に増殖抑制効果は見られなかった(図6D)。

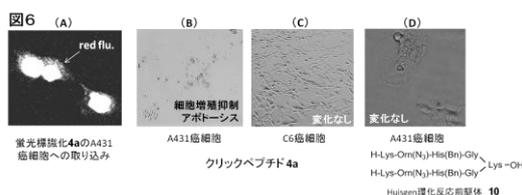


図6 クリックペプチド4の細胞内導入効率と細胞増殖抑制やアポトーシス誘導活性

そこで、ビオチン標識体(biotin-4a、図5)を用いてA431細胞ライセートから標的のリン酸化タンパク質を探索した。EGFR細胞のライセートに対して100 μ Mのbiotin-4aを作用させた後、アビジンビーズで標的タンパク質を抽出した。SDS-PAGE/リバー染色により解析したところ、65kDaに強度は弱いものの、明確なバンドを認めることができた(図7A)。そこで、EGFRシグナル伝達経路において、Grb2/SH2が認識する4つの代表的なリン酸化タンパク質(EGF, Gab1, Shc, IRS-1)、およびCrkL/SK2が認識する2つのリン酸化タンパク質(CAS, CBL)の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、Shc抗体を用いた場合に65kDaのバンドを検出することができた(図7B)。さらにShc抗体とproteinA-アガロースを併用することにより、細胞内で結合した4a/リン酸化Shc複合体を抽出することに成功した。以上のように、4aはA431細胞内でリン酸化Shcタンパク質に選択的に結合して、細胞選択的に増殖抑制活性を示すことが明らかとなった。

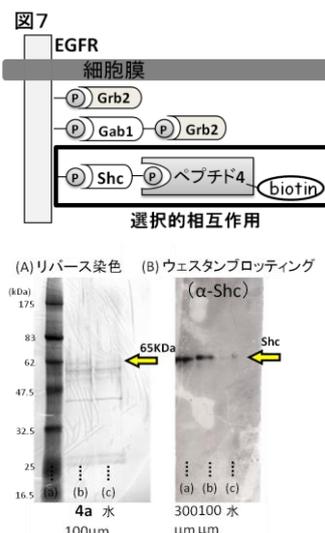


図7 ビオチン標識ペプチドを用いた標的リン酸化タンパク質の探索

3. Grb2-SH2 疑似ペプチドの動物レベルでの癌選択的増殖抑制効果

さらにペプチド4aは、動物内でも選択的に望む癌の増殖を抑制することが判明した。標的のA431細胞またはC6細胞を移植したそれぞれの癌モデルマウスに対して、4aの血中内濃度が細胞実験で増殖抑制阻害を示した濃度の10倍(100 μ M)になるように、1週間継続して尾静脈注射を行った。その結果、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、あるいは腎臓の質量変化には全く影響を与えることなく、A431癌の体積増加を選択的に抑制することが分かった。さらに、EGFRを高発現しないC6癌の増殖にも全く影響を及ぼさないことが判明した。すなわち、動物内でも毒性を与えることなく、望みの細胞増殖を選択的に制御するペプチド分子を創製することに成功した。

このように、報告者が開発した「鑄型誘起合成」を経て創製したクリックドペプチドは、細胞内に効率的に取り込まれ、リン酸化Shcタンパク質に選択的に結合するとともに、望むシグナル伝達を制御できることを示した。

4. 「鑄型誘起合成」に利用できる効率的結合形成反応の開発

上記研究では、「自己活性化型クリック反応」を鑄型誘起反応における結合形成反応として積極的に活用した。しかし、本研究課題をさらに進める上で、用いることのできる基質の制限に加えて、銅試薬を当量用いなければならない等の問題により、本反応を用いた組織上や生体内での実施を含めた一般的展開は困難であることが判明した。一方、この間報告者は、共役イミン誘導体が新奇な[4

+4]反応を速やかに起こすことを見出した。共役イミンは、不飽和アルデヒドと生体にも多く存在するアミンから容易に生成するため、この[4+4]反応を生体内でも使用できる新しい鑄型誘起反応として活用することを想起した。様々な不飽和アルデヒドとアミンを反応させることにより、中間に生成する共役イミンが温和な条件下、速やかに[4+4]反応を起こし、ジアザビシクロオクタンや、さらに1分子のアミンが架橋した誘導体が高収率で得られることが分かった。本反応は生体内でも実施することが可能であると考えられ、本課題が目指す生体内での様々な酸性官能基や生体金属を鑄型として鑄型誘起合成を実施することのできる結合形成反応として見出した。

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5件)

(1) Conformationally Fixed Analog of Peptide Mimic of Grb2-SH2 Domain: Synthesis and Evaluation Against A431 Cancer Cell, T. Iwata, K. Tanaka, T. Tahara, S. Nozaki, H.

Onoe, Y. Watanabe, K. Fukase, Mol. BioSyst., 9, 1019-1025, 2013 (査読有)

(2) Template-Assisted and Self-Activating Clicked Peptide as a Synthetic Mimic of the SH2 Domain, Tanaka, K., Shiotsuki, S., Iwata, T., Kageyama, C., Tahara, T., Nozaki, S., Siwu, E. R. O., Tamura, S., Douke, S., Murakami, N., Onoe, H., Watanabe, Y., Fukase, K, 7, 637-645, ACS Chem. Biol., 2012 (査読有)

(3) Auxiliary-directed oxidation of ursolic acid by 'Ru'-porphyrins: chemical modulation of cytotoxicity against tumor cell lines, Tanaka, K., Mazumder, K., Siwu, E. R. O., Nozaki, Satoshi, Watanabe, Y., Fukase, K., Tetrahedron Lett., 53, 1756-1759, 2012 (査読有)

(4) Efficient Synthesis of 2.6.9-Triazabicyclo [3.3.1]nonanes through Amine-Mediated Formal [4+4] Reaction of Unsaturated Imines, K. Tanaka, E.R.O. Siwu, S. Hirotsuki, T. Iwata, R. Matsumoto, Y. Kitagawa, A. R. Pradipta, M. Okumura, K. Fukase Tetrahedron Lett., 53, 5899-5902, 2012 (査読有)

(5) Ursolic Acid Derivatives from Bangladeshi Medicinal Plant, Sarauja roxburghii: Isolation and Cytotoxic Activity against A431 and C6 glioma Cell Lines, K. Mazumder, E. R. O. Siwu, K. Tanaka, S. Nozaki, Y. Watanabe, K. Fukase,

Phytochem. Lett., 4, 287-291, 2011 (査読有)

[学会発表] (計16件)

(1) 田中克典, 天然生物活性機構に携わる新奇な共役イミン反応性の検証と展開, 農芸化学会仙台大会 2013 年度, 超活性天然物とケミカルバイオロジーへの応用 (仙台, 2013.3.27)

(2) 田中克典, 共役イミンの「隠された反応性」の開拓と天然物ケミカルバイオロジーへの展開, 早稲田大学理工学研究科講演会 (東京, 2012.12.5)

(3) 田中克典, Unexplored Reactivity of Unsaturated Imines: Application to Organic Synthesis and Chemical Biology, 第41回ケミカルバイオロジー領域研究会, 独立行政法人理化学研究所(埼玉和光, 2012.11.26)

(4) 田中克典, 不飽和イミンの「隠された反応性」の開拓とケミカルバイオロジーへの展開, 成蹊大学理工学部講演会 (東京, 2012.11.15)

(5) 田中克典, タンパク質不活性化機構に学ぶアザ電子環状反応の開発と天然物合成, および合成化学生物学(生体制御合成化学)への展開, 味の素株式会社 講演会 (神奈川, 2011.12.12)

(6) 田中克典, タンパク質の革新的標識化法と非侵襲的イメージングによる動態解析: 糖鎖による影響を考える, 日本化学会関東支部講演会「創薬を指向したタンパク質科学」 (東京, 2011.10.21)

(7) 田中克典, 効率的結合形成反応の再開拓から始める天然物合成と合成生物学の新戦略, 第28回有機合成化学セミナー 有機合成化学奨励賞受賞講演 (山形天童, 2011.9.1)

(8) 田中克典, 糖鎖によるタンパク質と生細胞の生体内動態調節: 安定性と集積、および癌転移を結合形成反応で可視化/制御する, JST ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトシンポジウム「生命化学の最先端」, 独立行政法人理化学研究所 (埼玉和光, 2011.7.27)

(9) 田中克典, N-結合型糖鎖の実用的合成手法と生体内イメージング技術の開拓, 第30回日本糖質学会年会 糖質学会奨励賞受賞講演 (新潟長岡, 2011.7.11)

(10) 田中克典, A New Strategy in Synthetic Biology: From Enzyme Inhibition, Natural Products Synthesis to PET Imaging by

6 π -Azaelectrocyclizations (Department of Organic Chemistry, University of Geneva, スイス, 2011.7.5)

(11) 田中克典, Exploring A Unique Reactivity of 6 π -Azaelectrocyclization for Natural Products Synthesis & Synthetic Biology, The 7th Sino-US Chemistry Professors Conference (Guiyang, 中国, 2011. 6.29)

(12) 田中克典, 効率的結合形成反応から始まるシンセティックバイオロジーの新戦略, 「生体分子の化学」シンポジウム, 独立行政法人理化学研究所 (埼玉和光, 2011.1. 21)

(13) 田中克典, Pep TenChip への糖鎖/ペプチド導入の革新的導入法と生体分子社会構築のデザイン, ハイペップ研究所 2010 紅葉ワークショップ (京都, 2010.12.3)

(14) 田中克典, Visualization of N-Glycan dynamics in living animals, New strategy from synthetic chemistry & molecular imaging, Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) (台湾, 2010.10.29)

(15) 田中克典, 実用的合成を指向したマイクロフロー反応の適応範囲と可能性: 生理活性天然物の合成を例として, 塩野義製薬中央研究所講演会 (塩野義製薬, 大阪, 2010.10.12)

(16) 田中克典, 革新的結合形成反応の糖鎖科学への応用: マイクロフロー/固相合成システムによる N-結合型糖鎖の合成と非侵襲的イメージング, 財団法人野口研究所講演会 (東京, 2010.5.28)

〔図書〕 (計 3 件)

(1) 鋳型誘起反応の開発に基づくリン酸化タンパク質認識ペプチドの化学転写合成, 田中克典, The Japanese Peptide Society 出版, 15-19 (2012)

(2) ペプチド・タンパク質、細胞の革新的標識法と PET による動態解析への応用 in 次世代バイオ医薬品の製剤設計と開発戦略, 田中克典, 深瀬浩一、シーエムシー出版, 119-126 (2011)

(3) 新規標識反応を基盤とする糖鎖プローブの開発とインビボイメージング in 蛍光イメージング・MRI プローブの開発と最新動向, 田中克典, 深瀬浩一、シーエムシー出版, 35-43 (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 吸着材用水不溶性担体及びエンドトキシン吸着材

発明者: 深瀬浩一、田中克典、齋藤政利、畑中美博、築地美鈴

権利者: 国立大学法人大阪大学、旭化成クラレメディカル株式会社

種類: PCT/JP2011

番号: 003976

出願年月日: 2011 年 1 月 12 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

(1) 受賞

2010 年 第 13 回日本糖質学会奨励賞受賞

2011 年 第 29 回有機合成化学奨励賞受賞

2012 年 (独)日本学術振興会の科学研究費助成事業(科研費)平成 24 年度審査員表彰受賞

2012 年 第 44 回若手ペプチド夏の勉強会一般講演部門優秀賞受賞(岩田隆幸(D1): 共同研究者)

2012 年 第 44 回若手ペプチド夏の勉強会ポスター発表部門優秀賞受賞(北谷方嵩

(M2): 共同研究者)

2013 年 日本化学会第 93 春季年会 (2013)

学生講演賞受賞(岩田隆幸(D1): 共同研究者)

(2) 関係ホームページ

田中生体機能合成化学研究室

<http://www.riken.jp/nori-tanaka-lab/>

理化学研究所 田中生体機能合成化学研究室

http://www.riken.go.jp/research/labs/associate/biofunct_synth_chem/

理化学研究所 - 田中生体機能合成化学研究室 (基幹研究所)

<http://www.asi.riken.jp/jp/laboratories/associatelabs/biofunc/index.html>

日本化学会新領域研究グループ 有機合成化学を起点とするものづくり戦略

<http://orgsynth.csj.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 克典 (TANAKA KATSUNORI)

独立行政法人理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室・准主任研究員

研究者番号: 00403098

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし