

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19115

研究課題名(和文)膜タンパク質親和性天然物を起点とした天然物-薬物複合体創薬への挑戦

研究課題名(英文)Challenges to create natural product-drug conjugate starting from screening of natural products that bind to membrane proteins

研究代表者

松森 信明(Matsumori, Nobuaki)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：50314357

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)：本研究は、代表者の開発した独自技術を起点とした「天然物-薬物複合体」医薬の創成を目指す。これまで、金ナノ粒子表面を薄い脂質膜で被覆し、ここに膜タンパク質を安定的に固定化する技術確立した。これを天然脂質や天然有機化合物の混合物に作用させ、膜タンパク質に親和性の高い化合物を回収し、LC-MSで検出する実験スキームが完成した。本手法により膜タンパク質に親和性の高い天然物の効率的取得が達成できた。同時に、金ナノ粒子の強い赤色を利用した膜タンパク質親和性天然物の検出法も新たに開発した。本手法をマイクロアレイ上に固定された化合物ライブラリーに適用することで、膜タンパク質親和性天然物の探索が効率化できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物ライブラリーを利用した創薬研究は、目的とする生理活性を有する化合物をいかに探索するかに主眼が置かれてきた。本研究では生理活性を指標とせず、標的膜タンパク質との強い親和性を有する天然物を探索する。ここで代表者の開発した膜タンパク質親和性天然物探索法を活用する。このようにして得られた天然物を起点として、その親和性を保ちつつ、抗体-薬物複合体のように低分子薬剤を結合させる。これにより、高い標的特異性と薬理活性を併せ持つ画期的な新薬を開発する創薬戦略が実現する。本研究ではこの「天然物-薬物複合体」医薬創成の目的を立てることができ、新たな創薬分野開拓への重要な端緒となった。

研究成果の概要(英文)：This research aims to create "natural product-drug conjugate", starting from our original technology. We have established a technique for stably immobilizing membrane proteins on the surface of gold nanoparticles coated with a thin lipid film. Furthermore, by utilizing this technique, we have developed an experimental scheme to recover membrane protein-binding natural products from a mixture of natural lipids and natural organic compounds, and to detect them by LC-MS. This method made it possible to efficiently obtain natural products with high affinity for membrane proteins. At the same time, a new method for detection of natural products with high affinity for membrane proteins using the strong red color of gold nanoparticles was also developed. By applying this method to compound libraries immobilized on micro-arrays, the screening of natural products having high affinity to membrane proteins can be made more efficient.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：膜タンパク質 脂質 天然物 相互作用 金ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質が膜タンパク質の構造および機能を能動的に制御している事例が次々に明らかになった。そこで、松森は表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた脂質-膜タンパク質間相互作用解析法を開発し [Anal. Chim. Acta. 2019, 1059, 103]、その有効性を示した (図 1)。一方、この方法で特異的脂質を見つけるためには、単離精製した種々の脂質を SPR 分析する必要がある。そこで金ナノ粒子表面を SAM で修飾し、これに膜タンパク質を固定化することで、膜タンパク質特異的脂質を親和性精製する手法を発案した (図 2)。すでに bR を用いて概念検証に成功し、特異的脂質の探索が簡便化された。ここで強調すべきは、本方法が「脂質」探索ばかりでなく、「薬剤」や「天然物」の探索にも全く同様に適用できる点である。つまり、応募者は膜タンパク質に対する「活性」ではなく「親和性」で化合物を探索する画期的方法論の開発に成功した。

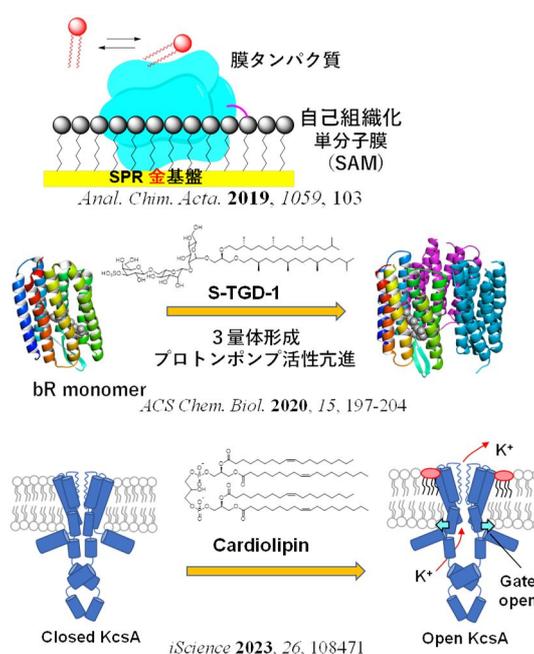


図 1

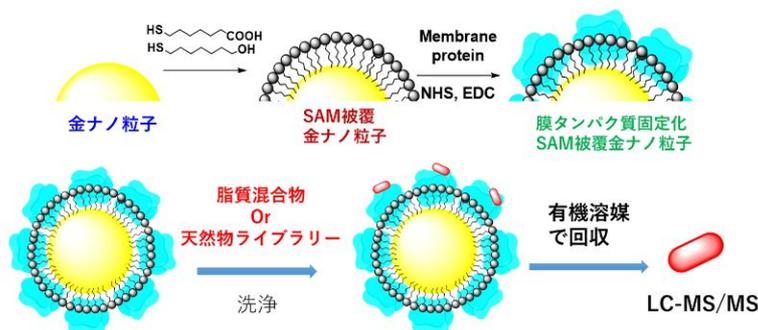


図 2

一方、抗体 - 薬物複合体 (ADC) はがん細胞表面の抗原を認識する抗体とペイロードを適切なリンカーを介して結合させた医薬群で、近年注目を集めている。しかし、ADC は原理的に細胞表面の抗原しか標的としえず、さらに ADC では巨大な抗体に比べて担持できるペイロードの質量比は限られるといった課題がある。そこで松森は、抗体の代わりに上記手法で取得した天然物を用い、これにペイロードを結合させることで、「天然物 - 薬物複合体医薬品」の創成を着想した。

2. 研究の目的

天然物ライブラリーや化合物ライブラリーを利用した創薬研究は、目的とする生理活性を有する化合物をいかに探索するか主眼が置かれてきた。本提案では、この従来の視点を根底から覆し、生理活性を指標とせず、標的膜タンパク質との強い親和性を有する天然物を探索する。この天然物を起点として、その親和性を保ちつつ、抗体 - 薬物複合体 (ADC) のように低分子薬剤 (ペイロード) を上手く結合させる。これにより、高い標的的特異性と薬理活性を併せ持つ、画期的な新薬を開発する創薬戦略を提案する。ペイロードを結合させるためにはある程度の分子サイズが必要であるため、合成化合物よりも構造が多様で中分子が多く含まれる天然物が最適と考える。具体的には、乳癌などに高発現している膜タンパク質 HER2 を標的とし、天然物ライブラリーを用いた HER2 親和性天然物のスクリーニングおよび単離、天然物へのペイロード結合、活性評価、を行う。これにより、「天然物 - 薬物複合体」医薬の創成と、それに基づく新たな創薬分野開拓に挑戦する。

3. 研究の方法

応募者は最近、金ナノ粒子表面を自己組織化単分子膜（SAM）で修飾し、これに膜タンパク質を固定化することで、膜タンパク質に特異的に相互作用する脂質や天然物をアフィニティー精製する手法を開発した（図2）。この方法では、SAM アルキル鎖との疎水性相互作用によって多量の膜タンパク質を金ナノ粒子表面に結合できる。また、SAM により膜環境をある程度膜タンパク質に付与できる。本提案では、この膜タンパク質固定化金ナノ粒子を起点として、「天然物-薬物複合体医薬」の創成とそれに基づく新たな創薬分野の開拓を目指し、図3に示す研究を行う。膜タンパク質として、すでに実用化されたADCの標的であり、乳癌など各種癌細胞表面に高度に発現している癌抗原HER2を用いる。ただし、この段階で得られる天然物はごく微量であるため、その検出はnanoLC-MSなどを用いた超微量オミックス解析の技術を有する当研究室川井准教授に協力を仰ぐ。次に、ペイロード導入に必要な量の天然物を確保するため、ライブラリーに立ち戻り nanoLC-MS 情報を基に単離を行う。単離した天然物にリンカーを介してペイロードを結合させる。リンカーおよびペイロードはADC用に開発されたものが購入可能であり、これを転用する。抗腫瘍活性の評価を行い、この結果を基にリンカーやペイロードの最適化を行う。

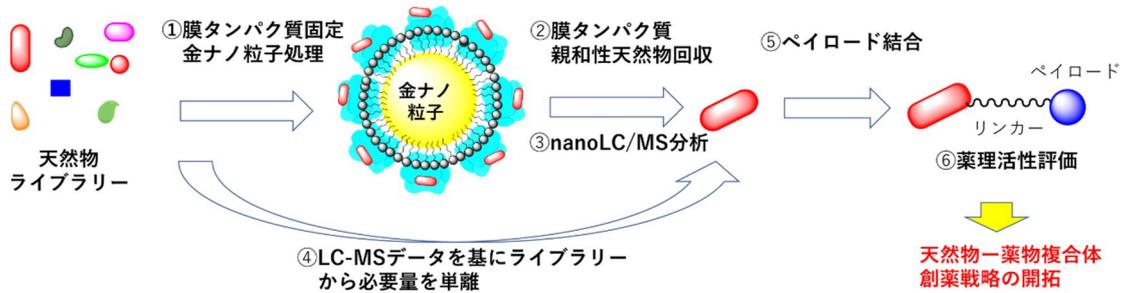


図3 本研究の模式図

4. 研究成果

これまで、金ナノ粒子表面を薄い脂質膜で被覆し、ここに膜タンパク質を安定的に固定化する技術を確認した。現時点では膜タンパク質として好塩菌由来のバクテリオロドプシン（bR）や放線菌由来のカリウムチャンネルKcsAを用いて検討を行った。さらにこれを天然脂質や天然有機化合物の混合物に作用させ、親和性の高い天然物をプルダウンし、LC-MSで検出するまでの実験スキームを完成した。この概念検証として、bR生産菌の有する天然脂質混合物から、bR結合脂質がプルダウンされることを証明し報告した[Anal. Biochem. 2024, 687, 115447]（図4）。さらにKcsAについても天然脂質混合物から特異的な脂質の探索に成功した。つまり本手法により膜タンパク質に対する親和性の高い天然物の取得が可能となった。

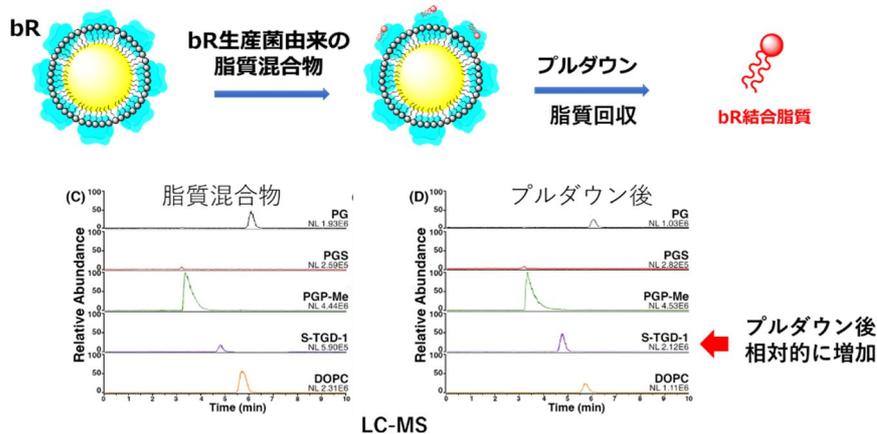


図4 脂質混合物からバクテリオロドプシン特異的脂質の回収

一方で、図3の手法では、天然物の単離や構造決定に時間と労力を要することがわかった。そこで、これを解決するために、金ナノ粒子の赤色を利用した膜タンパク質親和性天然物の検出法も新たに開発した。まずは、薄層クロマトグラフィー（TLC）で天然物混合物を分離後に

PVDF (Poly Vinylidene Fluoride) 膜に転写し、bRを担持した金ナノ粒子を作用させることでbR親和性天然物を赤色に染めることに成功した。本手法をマイクロアレイ上の化合物ライブラリーに適用している。これにより、膜タンパク質親和性天然物の探索が効率化でき、天然物-薬物複合体創成の目途が立った。今後膜タンパク質として癌抗原HER2などを用いて検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Murata Michio, Matsumori Nobuaki, Kinoshita Masanao, London Erwin	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular substructure of the liquid-ordered phase formed by sphingomyelin and cholesterol: sphingomyelin clusters forming nano-subdomains are a characteristic feature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 655 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-022-00967-1	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 該当する
1. 著者名 Umegawa Yuichi, Yamamoto Tomoya, Dixit Mayank, Funahashi Kosuke, Seo Sangjae, Nakagawa Yasuo, Suzuki Taiga, Matsuoka Shigeru, Tsuchikawa Hiroshi, Hanashima Shinya, Oishi Tohru, Matsumori Nobuaki, Shinoda Wataru, Murata Michio	4. 巻 8
2. 論文標題 Amphotericin B assembles into seven-molecule ion channels: An NMR and molecular dynamics study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabo2658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abo2658	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 該当する
1. 著者名 Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Inimitable Impacts of Ceramides on Lipid Rafts Formed in Artificial and Natural Cell Membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 727 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes12080727	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 Garza Darcy Lacanilao, Hanashima Shinya, Umegawa Yuichi, Murata Michio, Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki, Greimel Peter	4. 巻 38
2. 論文標題 Behavior of Triterpenoid Saponin Ginsenoside Rh2 in Ordered and Disordered Phases in Model Membranes Consisting of Sphingomyelin, Phosphatidylcholine, and Cholesterol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 10478 ~ 10491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c01261	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 該当する

1. 著者名 Hirano Kana, Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki	4. 巻 1864
2. 論文標題 Impact of sphingomyelin acyl chain heterogeneity upon properties of raft-like membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184036 ~ 184036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2022.184036	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 Hieda Manami, Tsujimura Koya, Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki	4. 巻 95
2. 論文標題 Formation of a Tight Complex between Amphidinol 3 and Sterols in Lipid Bilayers Revealed by Short-Range Energy Transfer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1753 ~ 1759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20220273	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 Ochiai Toshiki, Inukai Tensei, Akiyama Manato, Furui Kairi, Ohue Masahito, Matsumori Nobuaki, Inuki Shinsuke, Uesugi Motonari, Sunazuka Toshiaki, Kikuchi Kazuya, Kakeya Hideaki, Sakakibara Yasubumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Variational autoencoder-based chemical latent space for large molecular structures with 3D complexity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-023-01054-6	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 Iwamoto Masayuki, Morito Masayuki, Oiki Shigetoshi, Nishitani Yudai, Yamamoto Daisuke, Matsumori Nobuaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Cardiolipin binding enhances KcsA channel gating via both its specific and dianion-monoanion interchangeable sites	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108471 ~ 108471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108471	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 Matsumori Nobuaki, Hieda Manami, Morito Masayuki, Wakamiya Yuma, Oishi Tohru	4. 巻 98
2. 論文標題 Truncated derivatives of amphidinol 3 reveal the functional role of polyol chain in sterol-recognition and pore formation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 129594 ~ 129594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2023.129594	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 Wangamnuayporn Supakorn, Kinoshita Masanao, Kawai Takayuki, Matsumori Nobuaki	4. 巻 687
2. 論文標題 Gold nanoparticle-powered screening of membrane protein-specific lipids from complex lipid mixtures	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115447 ~ 115447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2023.115447	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5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松森信明
2. 発表標題 脂質機能解明のための多角的分析
3. 学会等名 第4回脂質駆動学術創生研究部会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松森信明
2. 発表標題 脂質と膜タンパク質の相互作用解析法の開発とその応用
3. 学会等名 公益財団法人山田科学振興財団 2022年度研究交歓会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuaki Matsumori
2. 発表標題 Interaction Analysis between Membrane Proteins and Lipids
3. 学会等名 ICPAC Kotakinabalu 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuaki Matsumori
2. 発表標題 Ladder-shaped polycyclic ether desulfo-yessotoxin strongly inhibits vacuolar-type ATPase
3. 学会等名 ICPAC Bali 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松森信明
2. 発表標題 潜在空間を構成・検証する生物活性の時空間定量計測手法開発・応用
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院理学研究院化学部門生体分析化学研究室 http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/BioanalChem/ 九州大学研究者情報 松森信明 https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K005543/index.html 研究者プロフィールツール 九州大学Pure https://kyushu-u.pure.elsevier.com/ja/persons/nobuaki-matsumori Researchgate https://www.researchgate.net/profile/Nobuaki-Matsumori Google Scholar https://scholar.google.com/citations?user=AnjKBJQAAAAJ&hl=en&oi=ao

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
研究協力者	川井 隆之 (Kawai Takayuki)	九州大学・理学研究院・准教授 (17102)	
研究協力者	木下 祥尚 (Kinoshita Masanao)	九州大学・理学研究院・助教 (17102)	

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