

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510269

研究課題名(和文) 光切断リンカー付アフィニティ樹脂を用いた汎用的な生理活性物質探索法の開拓

研究課題名(英文) Development of versatile method for identification of the target protein using affinity resins with photo-labile linker

研究代表者

田中 明人(TANAKA, AKITO)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：30454789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：H19-H21年度科研費研究で開発した“光切断リンカーを活用した特異的蛋白質の選択的溶出法”をベースとし、我々が開発し筑波家田化学から市販されている新規固相担体(AquaFirmus™)を応用することにより、本研究課題の目標であったターゲット不明の生理活性物質のターゲット探索法を開拓できた。本手法はターゲット既知のFK506でも、カルシニューリンを含むターゲット複合体の効率的な一括同定に成功している。現在、共同研究継続中の製薬企業が有するターゲット未同定開発化合物に適応し、ターゲット探索に適応中である。

研究成果の概要(英文)：We have here developed an effective method for identification of bio-active compound such as drug, natural product, and so on, using affinity resins from lysates. In this method, we applied photo-labile linker to elute the target protein from affinity resins selectively after mixed with lysate from target organ. We used "AquaFirmus", our products, as solid material in this work because this is chemically stable and hydrophilic enough to reduce the non-specific protein absorption. We first fixed target-known bioactive compounds such as FK506 or benzenesulfonamide on the resin through the photo-labile linker with hydrophilic spacers, and successfully eluted the target proteins by irradiation on ice for 5 min. We now apply this novel method for identification of target-unknown compounds including developed compounds of pharmaceutical companies.

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：活性発現の分子機構 アフィニティ樹脂 生理活性物質 ターゲット探索

1. 研究開始当初の背景

新規創薬ターゲット探索は現代における大きな課題の一つである。しかし、近年多くの技術的発展が見られるものの、未だ目標達成が困難な状況にあり、より強力な新手法開拓に強い関心が寄せられている。一方、動物モデルあるいは臨床において顕著な薬効を示す化合物(天然物や開発ドロップ化合物等)やすでに臨床上有益な効果が知られているにも拘らずターゲット未同定の医薬品(古い医薬品等)が数多く知られている。また、山中らによるiPS細胞創出に触発された研究から、細胞分化誘導化能をもつ低分子化合物創出(ターゲット未知)1など最新chemical biology 成果と思われる魅力ある新規生理活性物質が数多く創出されつつある。

これらの化合物のターゲット探索は、今後の分子生物学の進歩のみに限らず、創薬研究に大いに貢献することが期待されることから、早急に解決すべき課題と考えられている。アフィニティ樹脂は本目的に合致するシンプルかつ有効な手法であるが、その遂行には総合的な化学力や、各種 know how 蓄積などが求められ、その活用は一部研究グループに限られているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は新たに発見した光切断リンカーを活用した特異的蛋白質の選択的溶出に改良を加えることにより、広範な生理活性物質の特異的結合タンパク質同定をアフィニティ樹脂によって簡便かつ効率的に遂行する方法を確立することを目的とする(下図参照)。



図 本研究で開拓する基本技術

タンパク質等に悪影響のないUV照射(約360 nm)によって、効率的に切断可能なリンカーを固相担体と生理活性物質の間に挿入することによって、生理活性物質特異的結合タンパク質の選択的同定を可能とする。

本方法では対象生理活性物質を、光照射によって選択的に切断されるリンカーを介しアフィニティ樹脂に固定し、ターゲットを含有するライゼートと混合することによりターゲットタンパク質をアフィニティ樹脂上に捕捉後、タンパク質等への悪影響の少ない光照射により、選択的にターゲットタンパク質を溶出することを可能にする計画である。これまでは非特異的結合タンパク質(代表例: チュブリン、アクチンなど)も同時にアフィニティ樹脂に結合するため、ターゲットタンパク質との区別が困難となり、ターゲット同定に多大な努力を必要としてきた。我々はこの問題を解決するため、1) 非特異的結合タンパク質吸着を効率的に抑制する親水性 PEG スペーサー開発、2) 適応範囲が限

られる拮抗法などに代わる汎用的特異的結合タンパク質判定方法の開発、3) 非特異的結合タンパク質吸着が少なく、かつ化学的に安定な新規アフィニティ樹脂用固相担体 "AquaFirmus™"の開発などを実施してきた。今回ここで提案する光切断リンカーを活用した特異的結合タンパク質選択的溶出方法を新たに確立することにより、アフィニティ樹脂を用いたターゲット探索がより簡便に、かつ効率的になることが期待され、これまで特定の研究グループに偏る傾向にあった生理活性物質ターゲット探索研究が広くchemical biologist に門戸が開かれることになると考えられる。

3. 研究の方法

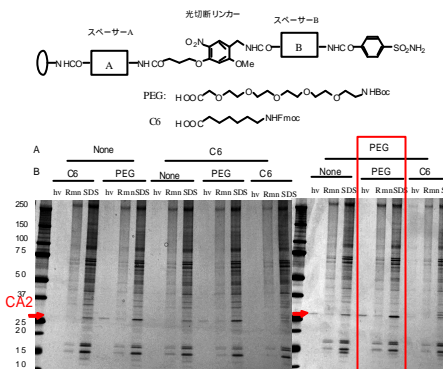
H23年度は、H19-21年度科研費研究実績で構築した光切断リンカーを用い選択的な特異的結合蛋白質溶出技術を最適化する。この際、使用する固相担体やスペーサーの種類や性質も同時に最適化する計画である。H24年度には、最適化した条件を用い、ターゲット既知の生理活性物質で手法のブラッシュアップを行う。最終年度において、現在実施中のターゲット探索研究(製薬企業の開発品を含む)に応用し、その実効性を確認する。

4. 研究成果

(1) スペーサー構造の最適化

光切断リンカーとしてH19-21年度科研費研究で使用したo-nitro-benzylamine誘導体(下図)を利用し検討を行った。当初市販の固相担体に当該光切断リンカーを導入し検討を行ったが、疎水的な性質のため、非特異的な蛋白吸着が多く見られ、目的を達成することが出来なかった。また、アフィニティ樹脂用固相担体として汎用されるアフィゲルは、組成が糖誘導体であり、合成溶媒中で変性し使用不可であった。そこで、本研究では我々が独自に開発した化学的に安定で、高い親水の性質から非特異的蛋白吸着が非常に低減された AquaFirmus™ (筑波家田化学販売中)を固相担体として用いることとした。

当初、疎水的な性質を有する当該光切断リンカー構造をカバーするように(下図)、前後にPEG スペーサーを導入し検討を行った。対象として疎水的なスペーサー(アルキル鎖)も並行して検討した(下図)。

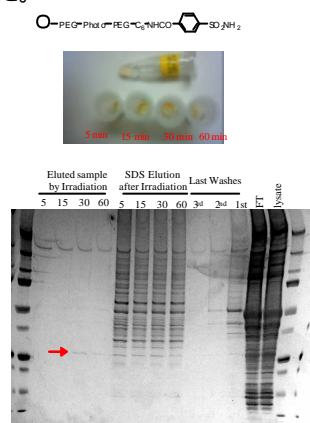


検討は非特異的結合蛋白量が多くターゲット探索検討が困難なラット脳を用い、lysate buffer も 0.25 M sucrose, 0.3 mM DDC, 25 mM Tris buffer (pH 7.6, protein 8 mg/mL) という単純なものを適応した。その結果、上図に示すように、疎水的なスペーサー（アルキル鎖）に比べ、PEG スペーサーを用いた場合に光照射のみで使用した生理活性物質 benzensulfonamide のターゲットのひとつである CA2 (carbonic anhydrase type 2) を特異的に得ることに成功した。この結果、疎水的なスペーサーを用いることによって、親水的な固相担体表面で、疎水的な benzensulfonamide、光反応性リンカー、スペーサーが疎水的な複合体を形成し、ターゲットと特異的な相互作用を阻害しているものと考えられた。

これらの結果をベースに本検討では、PEG 型スペーサーを採用することとした。

(2) 光照射時間の最適化

次に、結合実験後に行う光照射条件の検討を行った。特に、UV 照射は 350-370 nm に限定した波長を照射（フィルター使用）しているが、長時間の UV 照射はターゲットの分解を伴うリスクがあるため、照射時間の最適化を行った。

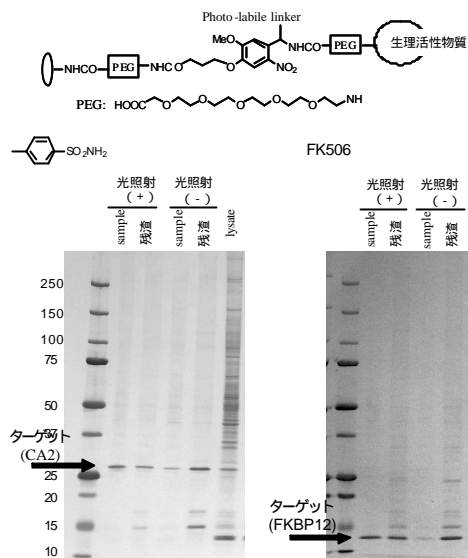


その結果、30分程度でターゲット溶出が最大化することが明らかとなった。反応自身は短時間で終了していると考えられるが、上部からの光照射のため、アフィニティ樹脂全体に光照射がいきわたるのに30分程度の時間が必要であるためと考えられた。今後より透明性の高い固相担体の開発ができた場合、より短時間でのターゲット取得ができるようになると考えられ、現在別途検討を継続している。

(3) ターゲット既知化合物での評価

(2) までに得られた条件を用い、ターゲット既知で、本研究領域では汎用される生理活性物質 2 種類（benzensulfonamide、FK506）を固定化し、検討を行った。その結果、次図に示すように、ラット脳から調整し

た lysate と混合後、lysate buffer で洗浄し、同じく lysate buffer 中で光照射（4 度、30 分）することによって、選択的にターゲット蛋白質を溶出することに成功した。



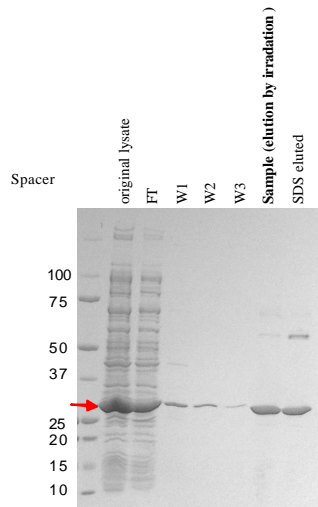
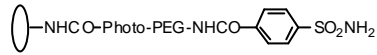
図に示されるように無数のターゲットから構成されるラット脳 lysate から、本研究で開拓した光切断リンカーを用いることによって、高度に選択的にターゲット蛋白質を得ることが可能となった。これらの結果は、今後ターゲット未知の生理活性物質のターゲット探索研究に貢献できるものと期待された。

また、ここで得られた手法は、純度の低い蛋白質混合物から、アフィニティ樹脂に結合する能力を持つ蛋白質を高度に分別できることを意味しているため、例えば抗体医薬品や蛋白質医薬品の最終精製への活用が期待できる。また、混合物からリガンド分子と特異的に結合できることを指標に分別可能であることから、電気泳動等で判定できる蛋白質純度（1次配列や翻訳後修飾など）だけでなく、3次元構造的な純度も併せ持つ超高純度蛋白質の精製法としても期待できる。本領域の適応分野としては、例えば X 線結晶解析用高純度蛋白質の精製などが考えられる。そこで、次項で検討を行った。

(4) 超高純度蛋白質の精製

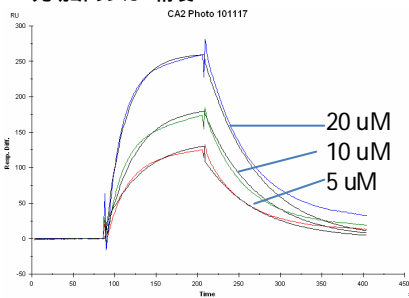
前項までの検討で本研究で開発された手法により、超高純度蛋白質精製の可能性が示唆されたため、大腸菌で CA2 を産生させ、そこからの CA2 の本手法による精製を検討した。CA2 は benzensulfonamide を特異的に結合することから当該化合物を光切断リンカーを介し固定化し、光照射を行いサンプルを得た。

AquaFirmus

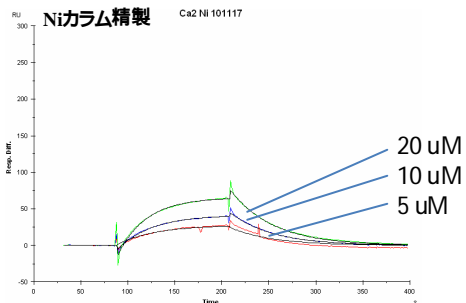


その結果、上図に示すように光照射によって電気泳動的に高純度蛋白質を得ることができた。そこで、この蛋白質の3次元構造純度を推定するため、BIAcoreを用いた検討を行った(次図)。

光切断リンカー精製



Niカラム精製



検討では一般的な精製法の一つである Ni カラムを用いたサンプルと比較した。上図の結果を用い、解析した結果、下記表に示すように光切断リンカーを用い精製した CA2 は、従来法 Ni カラムで精製した CA2 に比べ約 3.4 倍強い結合性を示し、光切断リンカーで得られたサンプルの有用性が示唆された。また、結合 CA2 量を表すと考えられるシグナル強度

も約 5 倍ほど光切断リンカーで得られたサンプルが高く、固定化した benzensulfonamide に結合する CA2 量も多く含まれていることが示唆された。つまり、当該サンプルに含まれる CA2 は benzensulfonamide に特異的に結合する比率が高く、かつ量も多いことが推定された。

	CA2 Photo	CA2 Ni
Ka (1/Ms) (Mean ± SE, SE%)	1293 ± 196 (19.6 %)	535 ± 23.9 (1.26 %)
Kd (1/s) (Mean ± SE, SE%)	0.0159 ± 2e-4 (4.47 %)	0.0222 ± 2.41e-4 (1.09 %)
KD(kd/ka)	1.23E-05	4.15E-05

(5) ターゲット未知化合物への応用

現在、当研究室ではアステラス製薬やエーザイと共同研究契約を行い、開発中の化合物のターゲット探索を実施中である。残念ながら、未だターゲットの絞込みには至っていないが、本研究で開拓した手法を用いることによって各化合物の特異的な結合蛋白質を同定することに成功している。今後共同して validation 研究を行い、各化合物の早期医薬品化に貢献していく計画である。

なお、秘密保持契約があるため、各化合物の臨床が進むまで結果の公表は順延しているが、時機を見て順次公表し、広く我が国の科学の発展に寄与していく計画である。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

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://www2.huhs.ac.jp/~h070016a/>

6．研究組織

(1)研究代表者

田中 明人 (TANAKA, Aki to)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：30454789

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：