

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23651231
研究課題名（和文） ケミカルバイオロジー的方法論を活用した『人工ビオチン』誘導体の開発と応用
研究課題名（英文） Development and application of “artificial biotin” derivatives using methodologies of chemical biology
研究代表者
寺井 琢也（TERAI TAKUYA）
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：00508145

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、ケミカルバイオロジー研究に汎用されるビオチン・（ストレプト）アビジンシステムの更なる高機能化を目的として、約 16 万に及ぶ低分子化合物ライブラリーの中から新規（ストレプト）アビジン結合分子の探索を行った。その結果、1 μ M オーダーで目的タンパク質と結合する新規化合物を得ることに初めて成功した。更に、X 線結晶構造解析やドッキングシミュレーションにより新規リガンドとタンパク質との結合様式について知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In order to further sophisticate biotin-streptavidin system that is used as a universal binding pair in chemical biology, we screened a large library of approximately 160,000 compounds for novel ligands to streptavidin. As a result, we succeeded in obtaining new ligands that have affinities to the protein in the order of 1 μ M. Moreover, we analyzed their binding mechanisms in detail by X-ray crystallography and computer simulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：化合物ライブラリー、生体分子の化学修飾

1. 研究開始当初の背景

ビオチンは、カルボキシル転移酵素に対する補酵素として働く他、卵白に含まれるアビジンや、ストレプトマイセス属（放線菌）が産生するストレプトアビジン（以下、両者をアビジン類と呼ぶ）などのタンパク質と非常に強力な複合体（ $K_d \approx 10^{-15}$ M）を作ることが古くから知られている。この結合は抗原-抗体反応（ $K_d \approx 10^{-8} \sim 10^{-10}$ M）と比較しても遥かに強く、通常の条件下ではほぼ不可逆であるため、リガンド結合タンパク質の単離・精製や、生体分子の固相表面への提示、バイオイメージングといった様々な場面において、ビオチンによる分子の標識とアビジン類への結合が gold standard として汎用されている。

ン類への結合が gold standard として汎用されている。

しかし、強力な結合が全ての場合に有用であるとは限らない。例えばアフィニティー精製のタグとしてビオチンを用いた場合、アビジン類結合担体からの溶出には過酷な条件（6 M 塩酸グアニジン pH 1.5 など）が要求されるが、こうした条件下では多くの標的分子が機能を失ってしまう。また通常のビオチンを用いた場合、ある特定の刺激に応じて複合体形成を引き起こすような複雑な実験は難しい。そこで申請者は、（天然）ビオチンとは全く異なる化学構造を有し、かつアビジン類と強く結合することができる新たな

有機小分子、『人工ビオチン』を開発するという新たな着想によって上記の課題を克服しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ケミカルバイオロジー研究（アフィニティーカラム、細胞への薬物輸送など）への応用を志向し、天然ビオチン添加や外液洗浄により溶出可能な“程良い”結合力を有する新規アビジン類リガンド『人工ビオチン』を開発することを目的とする。より具体的には、公的化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング（HTS）という網羅的な手法と、X線結晶構造解析や *in silico* でのドッキングシミュレーションなどの論理的な分子設計とを組み合わせることで、全く新しい基本骨格を有するリガンドを効率的に探索し、その構造の最適化と機能化を達成することを目指す。本研究の成果は、プロテオミクスや創薬ターゲットの探索研究など様々な分野に応用可能であり、萌芽研究にふさわしい発展性と意義を有している。また本研究から得られるノウハウは疾患関連など他のタンパク質に対する阻害剤探索にも有用と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 蛍光偏光法を用いた評価系の開発

研究代表者らによる予備的検討の結果、タンパク質のビオチン結合ポケットに弱く（= μM オーダー）結合することが見出されている **diMe-biotin**（図1 赤丸部分）に対してリンカーを介して蛍光団（フルオレセイン）を修飾した化合物をプローブとして合成した（図1）。続いて、プローブ単独、卵白アビジン存在下、および **diMe-biotin** 共存下で蛍光偏光の大きさを測定した。更に、スクリーニングへの展開を念頭においてプローブの濃度やタンパク質濃度、インキュベーション時間、DMSO 濃度など様々なパラメータを変化させ、384 穴プレートにおける最適な評価条件を設定した。

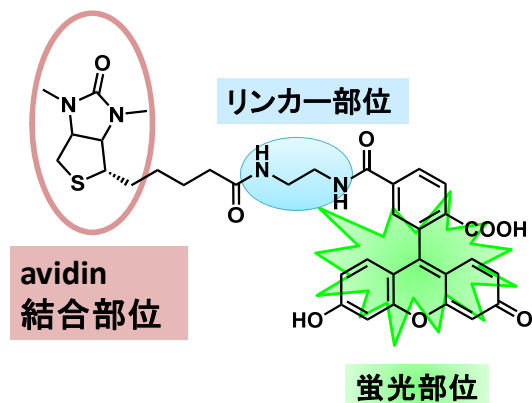


図1. 開発したプローブの構造

(2) 化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング

前項の結果を受け、東京大学創薬オープンイノベーションセンターの岡部隆義特任教授、小島宏建特任教授らから提供された化合物（およそ 160,000）を用いて、卵白アビジン結合小分子の一次スクリーニングを行った。この実験においては得られる測定データが膨大であったため、コンピュータにより自動で適切なデータ処理を行うプログラムを作成した。一次スクリーニングの結果、平均値より 4SD 以上の変化を示した化合物をヒットと判定し、再現性試験へと進めた。ここで再現性が得られた化合物に関してはストレプトアビジン結合試験へと進めた。

(3) ストレプトアビジン結合試験と濃度依存性試験

続いてストレプトアビジンに対する結合試験を行った。ここでは、図1よりも更に結合能が高い、ビオチン自体を結合部位として利用したプローブを用いて評価を行った。その後、研究の目的を考慮して、10%以上の結合阻害を示し、かつ天然ビオチンと同一でない骨格を持つ化合物のみを選択して濃度依存性試験を実施した。

(4) SPR による評価

蛍光偏光法で濃度依存性が確認された新規リガンドに対して表面プラズモン共鳴（SPR）を用いた結合試験を行った。この方法は、蛍光リガンドとの競合ではなく直接的に化合物とタンパク質との結合を評価可能である。具体的には、ストレプトアビジンをアミンカップリングにより基板に固定し、リガンドを溶液に添加した際の共鳴角の変化を観察した。これにより、結合および乖離の速度と結合定数を算出した。

(5) X線結晶構造解析とドッキングシミュレーション

大阪大学大学院理学研究科の杉山成特任准教授と共同で、得られた新規結合分子とストレプトアビジンとの複合体結晶を取得した。この結晶を SPring-8 (BL44XU) の放射光を利用して構造解析し、相互作用様式の解明を行った。

更に、東京大学創薬オープンイノベーションセンターの多田幸雄特任研究員と共同でドッキングシミュレーションも実施し、より親和性の高いリガンドの創製に向けた分子設計について検討した。

4. 研究成果

(1) 蛍光偏光法を用いた評価系の開発

設計どおり、アビジン存在下において化合物の蛍光偏光が大きく上昇すること、および

阻害剤添加により偏光の上昇が抑制されることを確認した(図2)。これは、蛍光団がタンパク質に結合して分子量が増えることで励起状態における回転が抑制され、偏光の解消速度が低下するためである。

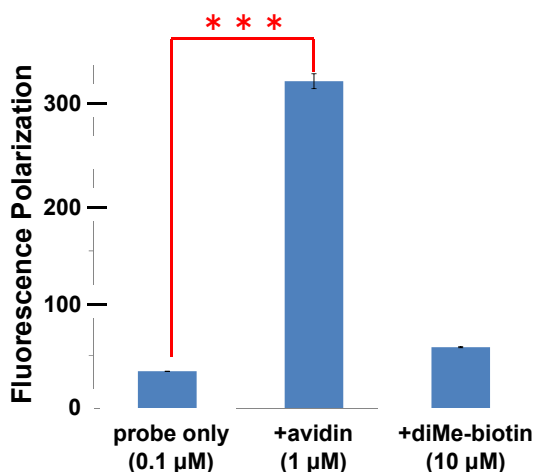


図2. 蛍光偏光を用いた結合評価の結果

(2) 化合物ライブラリーを用いたハイスクリーン

1st スクリーニングの結果、963 化合物が hit とみなされた(図3)。その中で、773 化合物が再現性試験(30%以上の結合阻害)に合格した。

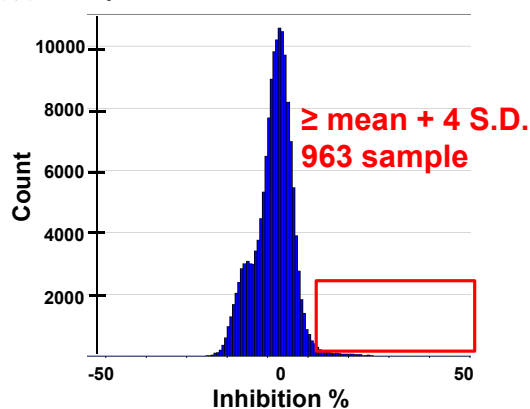


図3. 1次スクリーニングの結果
(縦軸は化合物数を表す)

(3) ストレプトアビジン結合試験と濃度依存性試験

ストレプトアビジンは卵白アビジンと比較して一般にリガンドとの親和性が低く、濃度依存性試験まで到達したのは11化合物にとどまった。なお、天然ビオチン自体を含む類縁体は軒並みこの段階まで残っていた。この事は、これまでのアッセイ系が十分に機能していることの証拠でもある。

(4) SPR による評価

SPR による評価の結果、ビオチンとは異なる

骨格を有し、ストレプトアビジンに対して $10^{-5} \sim 10^{-6}$ Mの乖離定数を持つ6種類のリガンドを獲得することに成功した。これらはいずれも、タンパク質に対して高い結合・乖離速度を示した(図4)。

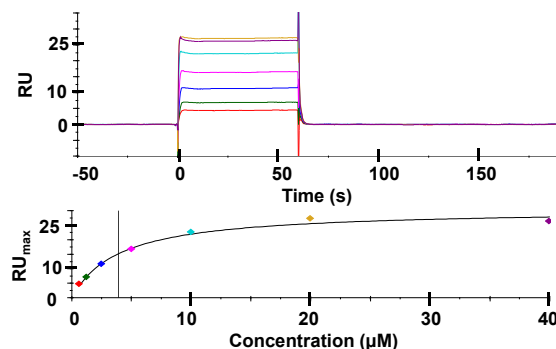


図4. SPRの結果(代表例)

(5) X線結晶構造解析とドッキングシミュレーション

種々の条件検討を行い、化合物とストレプトアビジンの共結晶を取得することに成功した。構造解析の結果、化合物が確かに天然ビオチンと同一の結合ポケットに入っていることを証明した(図5)。

また、計算機科学を用いた詳細な結合様式の解明により、更に強力な結合分子を合成するための設計指針が得られた。

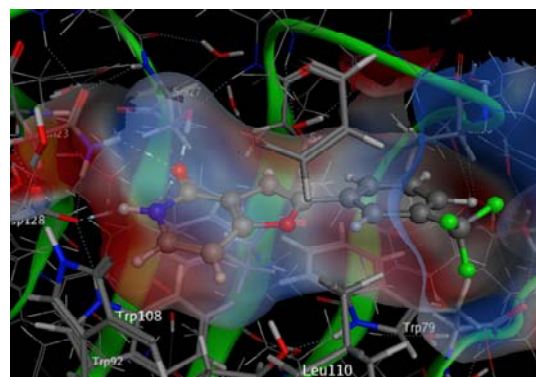


図5. X線構造解析の結果
(結合部位の拡大図)

(6) 今後の展望

本研究で得られたリード化合物と分子設計を元に誘導体展開を実施し、nMオーダーで結合するリガンドの取得を目指す予定である。更に、光活性化などの高度な機能を付与して生物応用を行っていきたい。

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7件)

(1) "Small-molecule Fluorophores and Fluorescent Probes for Bioimaging"

Takuya Terai and Tetsuo Nagano, *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.*, **465**, 347-359 (2013). DOI: 10.1007/s00424-013-1234-z (招待による執筆)

- (2) "TokyoGreen Derivatives as Specific and Practical Fluorescent Probes for UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1" Takuya Terai, Rie Tomiyasu, Tomoe Ota, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Kenjiro Hanaoka, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, *Chem. Commun.*, **49**, 3101-3103 (2013). 査読あり DOI: 10.1039/c3cc38810g
- (3) "Near-infrared Fluorescence Probes for Enzymes Based on Binding Affinity Modulation of Squarylium Dye Scaffold" Daihi Oushiki, Hirotatsu Kojima, Yuki Takahashi, Toru Komatsu, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura and Tetsuo Nagano, *Anal. Chem.*, **84**, 4404-4410 (2012). 査読あり DOI: 10.1021/ac300061a
- (4) "Salicyclic Acid Derivatives as Antennae for Ratiometric Luminescent Probes Based on Lanthanide Complexes" Takuya Terai, Hiroki Ito, Kazuya Kikuchi, and Tetsuo Nagano, *Chem. Eur. J.*, **13**, 7377-7381(2012). 査読あり DOI: 10.1002/chem.201200610
- (5) "創薬研究への応用を目指した蛍光プローブの開発" 寺井琢也、長野哲雄, *化学工業*, **63**, 295-301 (2012) (招待による執筆)
- (6) "A Long-Lived Luminescent Probe to Sensitive Detect Arylamine *N*-Acetyltransferase (NAT) Activity of Cells" Takuya Terai, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano, *Chem. Commun.*, **48**, 2234-2236(2012). 査読あり DOI: 10.1039/c2cc17622j
- (7) "Rational Development of Caged-Biotin Protein-Labeling Agents and Some Applications in Live Cells" Takuya Terai, Eri Maki, Shigeru Sugiyama, Yoshinori Takahashi, Hiroyoshi Matsumura, Yusuke Mori and Tetsuo Nagano, *Chem. Biol.*, **18**, 1261-1272 (2011). 査読あり DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.09.007

[学会発表] (計7件)

- (1) 伊藤央樹、寺井琢也、長野哲雄、“発光

性希土類錯体の寿命変化を利用したNAD(P)H依存性酵素の活性検出”、日本薬学会第133年会、2013年03月28日～2013年03月30日、横浜

- (2) 寺井琢也、伊藤央樹、長野哲雄、“サリチル酸誘導体を用いたレシオ型希土類発光プローブの開発”、日本薬学会第133年会、2013年03月28日～2013年03月30日、横浜
- (3) 河野萌、寺井琢也、岡部隆義、長野哲雄、“新規ストレプトアビジン可逆的結合分子の開発”、2013年03月28日～2013年03月30日、横浜
- (4) Takuya Terai, Hiroki Ito, and Tetsuo Nagano, "Luminescent lanthanide complexes as practical biosensors", SPACC19, 2012年08月03日～2012年08月04日、札幌
- (5) Takuya Terai, Hiroki Ito, and Tetsuo Nagano, "Responsive luminescent lanthanide complexes for biosensing applications", fluorescent biomolecules and their building blocks (FB3), 2012年07月05日～2012年07月08日、ヨーテボリ (スウェーデン)
- (6) 杉山成、寺井琢也、牧英里、西浦美也子、北谷友也、丸山美帆子、安達宏昭、松村浩由、高野和文、村上聡、井上豪、長野哲雄、森勇介、“アビジンとの結合制御に向けた新規ビオチン誘導体開発とその分子認識機構”、平成23年度日本結晶学会年会、2011年11月24日、札幌
- (7) 寺井琢也、牧英里、長野哲雄、“ケージドビオチンを用いた光照射部位選択的薬剤放出システムの開発”、日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会、2011年5月24日、東京

[図書] (計1件)

- (1) “蛍光イメージング/MRI プローブの開発” 寺井琢也、長野哲雄、シーエムシー出版、2011、1-9

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tlong/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺井 琢也 (TERAI TAKUYA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：00508145

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし