

平成 26 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：2012～2013

課題番号：24655147

研究課題名(和文) 生細胞系での薬剤標的タンパク質の同定を可能にするレーザー光増感ラベル化法の開発

研究課題名(英文) Development of chromophore-assisted laser scarring method for characterization of drug target proteins

研究代表者

小松 徹 (Komatsu, Toru)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40599172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、chromophore-assisted laser scarring (CALS) 法の確立に向けて、光増感反応によるタンパク質の化学修飾の様子を調べる基礎検討をおこない、タンパク質の印づけによる薬剤標的タンパク質の探索法としての新たな利用可能性を示すことに成功した。また、これと並び、タンパク質の活性に基づく新たな創薬標的分子探索法の開発を進め、その原理と実験系を確立することに成功した。これらの研究成果は、研究成果報告に示すように、論文、学会、図書において発表された。

研究成果の概要(英文)：We have studied the detailed mechanisms of chromophore-assisted laser inactivation (CALI) to apply it for labeling drug target proteins in living cells for functional annotation. We have succeeded in confirming the usefulness of the method to selectively detect the small molecule-binding proteins on electrophoresis gels. In addition, we have established a novel method to characterize the proteins with desired enzymatic activities with use of small molecular fluorescent probes.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：創薬化学 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

薬の作用は、有機小分子と、タンパク質をはじめとするターゲット分子の相互作用によって発揮される。新薬の開発の過程において、ある種の薬は、優れた薬効を示しながら、その標的タンパク質が同定できないために治療効果の予測が困難であり、またある種の薬は、標的タンパク質以外のタンパク質と非特異的に結合することにより重篤な副作用を示すといった問題が現存し、新薬の開発の大きな妨げとなっている。これらの諸問題は、有機小分子 タンパク質相互作用の評価が困難であることに起因するが、これを解決し、薬剤の標的タンパク質の同定を円滑に進める研究手法の開発は、創薬化学の分野において特に強く求められている。

これらを目的とする研究において、細胞からタンパク質溶液を調整し、小分子を結合させたカラムまたはビーズを用いることにより、標的タンパク質のみを濃縮して解析をおこなう affinity enrichment の手法が広く用いられている。近年でも、この手法によって、サリドマイドの標的タンパク質が新たに見出されるなど、創薬化学分野における強力な研究ツールとなっているが、この場合に、細胞が生きた状態でのタンパク質の機能が、細胞からタンパク質溶液を調整する過程において損なわれてしまうことにより、正しい有機小分子 タンパク質相互作用を評価することが困難か、しばしば誤った結果を与えることが大きな問題となる。そして、これを解決するためには、細胞が生きた状態で、標的となるタンパク質に対する印づけ (scarring) をおこない、後から印づけされたタンパク質を解析する手法の利用が必要となる。本研究では、光照射によって生じるエネルギーを化学反応に変換する機能性の有機小分子を用いて、薬の標的タンパク質の印づけをおこなうことを試みることにした。

2. 研究の目的

本研究は、ある有機化合物が結合するタンパク質を、細胞内に存在する総タンパク質 (プロテオーム) 中で選択的に化学修飾することにより、これを質量分析法により同定する研究手法の開発を目指すものである。これは、様々な生理活性分子 (薬) の標的となるタンパク質を網羅的解析により同定することで、新たなタンパク質の機能の発見と理解を可能にするものであり、新規の創薬ターゲットを見出す強力なツールとなることが期待されるものである。

現在、このような目的 (生細胞での有機小分子 タンパク質相互作用の評価) を達成しうる一般性のある手法として、光照射によって活性なラジカル種を形成し、標的分子との間に共有結合を形成する photoaffinity label

(PAL) の手法が存在するが、そのラベル化の精度の低さに伴い、生細胞で用いることができるだけの選択性、検出感度が保証されるには至っていないという問題点が現存する。本研究では、光増感剤を結合した有機小分子と相互作用するタンパク質を、光照射による活性酸素種の生成によって選択的に不活性化する chromophore-assisted laser inactivation (CALI) の手法を応用し、活性酸素種によるタンパク質上の化学修飾を利用し、薬剤標的タンパク質をプロテオーム中から選択的に検出する chromophore-assisted laser scarring (CALS) の手法へと発展させていくことを目指した。

このような実験系の実現に向けて、最も重要、かつこれまでに十分な検討がなされていない知見として、(1) 光増感剤によってタンパク質がどのように化学修飾を受けるか、(2) 生体内で酸化的な化学修飾を受けたタンパク質がどのような運命を辿るか、という2つの問題が存在したが、本研究課題では、これらの問題について十分な理解を与える知見を得ることにより、CALS 法 が実現し得る段階まで研究を進めることに成功した。

また、当初の研究目的とは異なる形ではあるが、本研究課題を遂行する過程において、同様の研究目的に合う、特定の酵素活性の検出に基づくタンパク質の探索手法の発案に至り、この実験系の実現についても併せておこない、達成することができた。これに関する詳細については「3. 研究方法」の第2項に述べる。

3. 研究の方法

第1項：CALS 法の確立に向けた精査

(1) 光増感剤の精査

はじめに、CALS 法の確立に向けて、最適な光増感剤の構造に関する検討をおこない、光照射依存的なペプチド鎖の切断による分子量の変化が観察される光増感剤として、xanthene 骨格を有する蛍光色素が有用であるという知見を得た。この色素を研究の目的に適う形に誘導體化することによって、以降の検討に利用した。

(2) タンパク質の酸化修飾の解明

光増感剤によって引き起こされるタンパク質の酸化修飾の様子を明らかにするため、酸化修飾によって生じる特異的なアミノ酸残基を化学修飾し、免疫学的手法によって高感度に検出する手法を確立した。これによって、より温和な光照射条件によって生じるタンパク質の酸化修飾を高選択的に検出することが可能となり、光増感剤の結合の有無を酸化修飾の違いによって見分けることができることが確かめられた。また、ここで生じる酸化修飾タンパク質をペプチドマスフィンガープリンティング法によってアミノ酸レ

ベルで解析することによって、酸化修飾がどのように起こっているかを分子レベルで理解する有用な知見を得ることに成功した。

(3) 光増感剤を用いたモデル系の確立と検討

上記の知見に基づき、光増感剤を共有結合させたモデル有機小分子とタンパク質の結合を、光照射依存的な酸化修飾構造の生成によって評価する実験を実施した。この研究結果に関しては、「4. 研究成果」に述べる。

第2項：酵素活性に基づくタンパク質探索法の開発

上記研究において、タンパク質の新たな探索系を模索する過程において、特定の酵素活性を可視化する有機小分子蛍光プローブを利用して、生体内のタンパク質の総体（プロテオーム）中から目的代謝活性を有する酵素を探索する実験系の着想に至り、これに対する基礎検討をおこなった。

これは、非変性の二次元電気泳動によってプロテオームを分画した後、目的の酵素活性を検出する蛍光プローブを用いたアッセイをおこない、ゲル上の活性本体タンパク質の位置を検出し、これに含まれるタンパク質を質量分析法によって解析することで同定をおこなうものである。電気泳動ゲルを細分し、マルチウェルプレート中に分注してウェル中で酵素アッセイをおこなう仕組みを用いることにより、酵素反応のターンオーバーによるシグナルの増幅をもって活性の検出をおこなうことを可能とし、生体内に存在するごく微量のタンパク質について、その活性に基づく探索、同定をおこなう実験系を確立することに成功した。これを利用して、複数のタンパク質の機能を新たに同定することに成功したが、これに関する詳細は「4. 研究成果」に述べる。

4. 研究成果

第1項：CALS法の確立に向けた精査

上述のモデル系を用いて、光増感剤の結合の有無を酸化修飾の違いによって見分けることが可能となり、本光増感反応のタンパク質の印づけとしての有用性を示唆する結果を得ることができた。しかしながら、これと併せて、本手法をより高次の細胞系に利用する際に克服すべき課題として、(1) 色素の細胞内分布による非特異的修飾の発生、(2) 酸化損傷タンパク質に対する代謝修復機構の存在、の2点の問題が明らかとなった。このため、これらに対する対応策の検討を併せておこなった。前者では、このような目的に利用可能な新たな光反応、新たな光増感剤骨格の開発を目指した研究を実施し、この中から、蛍光物質 boron dipyrromethene を母核とした新たな光反応を見出し、これを利用した研究

展開をおこなった。これに関する研究成果は、新規骨格の開発、光反応の精査に関する知見と併せて、*Angewandte Chemie International Edition* 誌に投稿予定である。後者の検討については第2項においておこなった。

第2項：酵素活性に基づくタンパク質探索法の開発

新たに開発した酵素活性に基づくタンパク質探索法は、従来の手法では検出が困難であったごく微量の酵素についても、活性に基づく検出を可能とすることが確かめられた。これを利用して、(1) 好中球の走化性因子の代謝不活性化を担う酵素の探索、(2) 酸化損傷によって生じる特異的構造の代謝活性を有する酵素の探索（第1項の研究より）、を実施し、それぞれ活性本体タンパク質の同定をおこなうことに成功した。前者に関する研究成果は *Journal of the American Chemical Society* 誌に投稿し、注目すべき論文である spotlight article として掲載された。後者に関する研究成果は各種学会において発表をおこない、今後、学術論文に投稿予定である。

以上のとおり、本研究期間中に、有機小分子の機能を活用した新規タンパク質の探索法の確立に向けて、多数の研究を実施し、数多くの興味深い知見を得ることに成功した。今後、ここで見出された知見、確立された実験系を利用することにより、新たな創薬標的タンパク質の発見の実現が強く期待される。

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13件)

1. Takuya Terai, Rie Tomiyasu, Tomoe Ota, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Kenjiro Hanaoka, Yasuteru Urano, Tetuo Nagano “TokyoGreen derivatives as specific and practical fluorescent probes for UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1” *Chemical Communications*, 49, 3101-3103 (2013).
2. Shodai Takahashi, Wen Piao, Yuriko Matumura, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Toshiaki Kamachi, Masahiro Kohno, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka “Reversible off-on fluorescence probe for hypoxia and imaging of hypoxia-normoxia cycles in live cells” *Journal of the American Chemical Society*, 134, 19588-19591 (2012).
3. Takuya Myochin, Kenjiro Hanaoka, Toru

- Komatsu, Takuya Terai, and Tetsuo Nagano
“Design strategy for a near-infrared (NIR) fluorescence probe for matrix metalloproteinase utilizing highly cell-permeable boron dipyrromethene (BODIPY)”
Journal of the American Chemical Society, 134, 13730-13737 (2012).
4. Tomonori Kobayashi, Toru Komatsu, Mako Kamiya, Cláudia Campos, Marcos González-Gaitán, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano
“Highly activatable and environment-insensitive optical highlighters for selective spatiotemporal imaging of target proteins”
Journal of the American Chemical Society, 134, 11153-11160 (2012).
 5. Yu Kushida, Kenjiro Hanaoka, Toru Komatsu, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kengo Yoshida, Masanobu Uchiyama, Tetsuo Nagano
“Red fluorescent scaffold for highly sensitive protease activity probes”
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 22, 3908-3911 (2012).
 6. Takahiro Egawa, Kazuhisa Hirabayashi, Yuichiro Koide, Chiaki Kobayashi, Naoya Takahashi, Tomoko Mineno, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki, Tetsuo Nagano and Kenjiro Hanaoka
Angewandte Chemie International Edition, 52, 38740-38777 (2013).
 7. Yoshimitsu Sagara, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Takashi Kato and Tetsuo Nagano
“A water-soluble mechanochromic luminescent pyrene derivative exhibiting recovery of the initial photoluminescence color in a high-humidity environment.”
Advanced Functional Materials, 23, 5277-5284 (2013).
 8. Toru Komatsu, Kenjiro Hanaoka, Alexander Adibekian, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Mitsuyasu Kawaguchi, Benjamin Cravatt and Tetsuo Nagano
“Diced electrophoresis gel assay for screening enzymes with specified activities”
Journal of the American Chemical Society, 135, 6002-6005 (2013).
 9. Wen Piao, Satoru Tsuda, Yuji Tanaka, Satoshi Maeda, Fengyi Liu, Shodai Takahashi, Yu Kushida, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Toru Nakazawa, Masanobu Uchiyama, Keiji Morokuma, Tetsuo Nagano, and Kenjiro Hanaoka
“Development of a new class of azo-based fluorescence probes to detect different levels of hypoxia”
Angewandte Chemie International Edition, 52, 13028-13032 (2013).
 10. Yoshimitsu Sagara, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Takashi Kato, and Tetsuo Nagano
“Covalent attachment of mechanoresponsive luminescent micelles to glasses and polymers in aqueous conditions”
Journal of the American Chemical Society, 136, 4273-4280 (2013).
 11. Yuki Ichikawa, Mako Kamiya, Fumiaki Obata, Masayuki Miura, Takuya Terai, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano
“Selective ablation of β -galactosidase-expressing cells with a rationally designed activatable photosensitizer”
Angewandte Chemie International Edition, in press
 12. Yoshimitsu Sagara, Toru Komatsu, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Takashi Kato, and Tetsuo Nagano
“Thermal or Mechanical Stimuli-induced Photoluminescence Color Change of Molecular Assembly Composed of An Amphiphilic Anthracene Derivative in Water”
Chemistry -A European Journal, in press
 13. Hiroki Onuma, Toru Komatsu, Makoto Arita, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Tetsuo Nagano, Takanari Inoue
“Synthetically rerouting phagocytosis by rapidly turning inert cells into “Eat you” mode”
Science Signaling, in press
- [学会発表](計16件)
1. 小松徹, 川口充康, 長野哲雄
「電気泳動による分離に基づく酵素アッセイ法による有機小分子蛍光プローブの新規標的タンパク質の同定と解析」
日本ケミカルバイオロジー学会第7回年回ポスター発表
 2. 小松徹, 川口充康, 長野哲雄
「有機小分子蛍光プローブを用いた電気泳動ゲル内酵素アッセイ法による細胞内酵素活性の網羅的解析」
日本プロテオーム学会2012年大会 口頭発表

発表

3. 小松徹, 川口充康, 吉岡健太郎, 長野哲雄
「有機小分子蛍光プローブを用いたN末端ホルミル化ペプチド代謝酵素の探索と活性イメージングによる機能評価」
第85回日本生化学会大会 口頭発表
4. 小松徹, 川口充康, 長野哲雄
「有機小分子蛍光プローブを用いたホルミル化ペプチド代謝酵素の探索と機能評価」
日本薬学会第133年会 口頭発表
5. 吉岡健太郎, 小松徹, 長野哲雄
「有機小分子蛍光プローブを用いた酸化損傷タンパク質代謝酵素の探索」
日本薬学会第133年会 ポスター発表
6. 吉岡健太郎, 小松徹, 花岡健二郎, 長野哲雄
「有機小分子蛍光プローブを用いた酸化損傷タンパク質の探索」
日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会 ポスター発表
7. 大沼裕樹, 小松徹, 花岡健二郎, 長野哲雄, 井上尊生
「有機小分子による細胞膜外フェノタイプ制御法の開発と応用」
日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会 ポスター発表
8. 大沼裕樹, 小松徹, 花岡健二郎, 長野哲雄, 井上尊生
「有機小分子による細胞膜外フェノタイプ制御法の開発と応用」
第86回日本生化学会大会 口頭発表
9. 吉岡健太郎, 小松徹, 花岡健二郎, 長野哲雄
「有機小分子蛍光プローブを用いた酸化損傷タンパク質の探索」
第86回日本生化学会大会 口頭発表
10. 大沼裕樹, 小松徹, 花岡健二郎, 長野哲雄, 井上尊生
「有機小分子による膜輸送制御に基づく細胞接着能の改変」
第1回バイオ関連化学シンポジウム 若手フォーラム ポスター発表
11. 小松徹, 川口充康, 吉岡健太郎, 花岡健二郎, 長野哲雄
「蛍光プローブの分子標的探索法の開発による疾患バイオマーカー酵素の探索」
第7回バイオ関連化学シンポジウム 口

頭発表

12. 大沼裕樹, 小松徹, 花岡健二郎, 長野哲雄, 井上尊生
「有機小分子による膜輸送制御に基づく細胞接着能の改変」
第7回バイオ関連化学シンポジウム ポスター発表
13. 小松徹, 川口充康, 吉岡健太郎, 花岡健二郎, 長野哲雄
「生体内の代謝活性を可視化する有機小分子蛍光プローブを用いた酵素の網羅的探索法の開発」
第36回日本分子生物学会年会 ポスター発表
14. 大沼裕樹, 小松徹, 花岡健二郎, 長野哲雄, 井上尊生
「有機小分子による膜輸送制御を可能にするCISD法の開発と細胞接着への応用」
第36回日本分子生物学会年会 ポスター発表
15. 吉岡健太郎, 小松徹, 長野哲雄, 花岡健二郎, 浦野泰照
「Diced Electrophoresis Gel (DEG) アッセイ法を用いた酸化損傷タンパク質代謝酵素の探索」
日本薬学会第134年会 ポスター発表
16. 木村勇亮, 小松徹, 長野哲雄, 花岡健二郎, 浦野泰照
「Protein-L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT)の新規活性検出法の開発」
日本薬学会第134年会 口頭発表

〔図書〕(計1件)

小松徹

「表現型アッセイ : アカデミア創薬における創薬標的タンパク質の探索研究」
実験医学 2014年1月増刊号『研究成果を薬につなげる アカデミア創薬の戦略と実例』

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 酵素活性検出用試薬
発明者: 長野哲雄, 花岡健二郎, 小松徹, 木村勇亮
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2014-038427
出願年月日: 2014年2月28日
国内外の別: 国内

○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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松徹 (KOMATSU, Toru)
東京大学大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：40599172

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：