

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25708026

研究課題名(和文) 超分子戦略に基づく可逆的タンパク質性因子受容体活性化のリアルタイムイメージング

研究課題名(英文) Real time and reversible imaging of cytokine receptors on living cells based on supramolecular approaches

研究代表者

高岡 洋輔 (Takaoka, Yousuke)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80599762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛋白質性因子とその受容体に代表される蛋白質間相互作用を標的として、これを制御、解析する化学的な方法論を開発した。さらに生細胞上で受容体との結合部位の同定、及び活性化のリアルタイムイメージングに成功した。さらに自己集合性ケミカルプローブの開発により、世界で初めて細胞内で蛋白質と小分子リガンドとの結合に伴い可逆的に作動する、超分子的方法の開発にも成功した。これらの知見を生かし、細胞内在性の蛋白質を特異的に化学修飾する方法論の開発や、植物ホルモン受容体が引き起こす蛋白質間相互作用の解析方法へと拡張することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, I succeeded in development of various chemical methodologies for protein-protein interactions (PPIs), such as cytokine-receptor interaction, or antigen-antibody interaction. Moreover, I realized the identification of interaction site by using PPI-based chemical modification method on living cells, and real-time imaging of the receptors on living cells. Additionally, development of self-assembling nanoprobe for live imaging of protein activity have been achieved, and this is the first example of reversible turn-on nanoprobe inside the live cells. Finally, based on these fundamental analyses, I succeeded in development of analysis methods for phytohormone receptors which cause protein-protein interaction and regulate life cycle in planta.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛋白質間相互作用 ケミカルバイオロジー 超分子 蛋白質化学修飾

1. 研究開始当初の背景

サイトカインに代表される蛋白質性因子は免疫、炎症などに関わる分泌タンパク質群の一種であり、多くの種類が存在する。典型的な例としては、膜上にあるチロシンキナーゼ型受容体に結合して働き、それぞれに特有の細胞内シグナル伝達を引き起こして、結果的に細胞の増殖や分化、細胞死などを起こす。このように細胞内でのメカニズムは比較的少ない種類の分類分けができる一方、サイトカイン自体が多機能的であり一つの分子が細胞状態によって異なる効果を生み出すとともに、他のサイトカインの発現を調節するなどのサイトカインカスケードをもたらすなど、そのメカニズムは非常に複雑である。このような多種類のサイトカインが時空間的に制御され分泌されているため、免疫応答の厳密な理解は困難を極める。

サイトカインがその受容体(レセプター)をいつ・どこで活性化しているかをライブイメージング可能となれば、免疫システムやガン増殖などの厳密な理解に繋がる。これまでに報告されているサイトカインレセプターのイメージング法として、レセプターの細胞質ドメインを蛍光タンパク質などで置き換えたキメラタンパク質センサーが挙げられる (Y. Umezawa et al., *ACS Chem. Biol.*, 3, 352 (2008)など)。これらの手法はごく微量のサイトカインを検出する上で強力な手段と考えられる一方、レセプター側に変異を加えることで、その後のサイトカインカスケードに関する知見を得難い。一方サイトカインに蛍光タンパク質などを融合する方法も考えられるが、一般にサイトカインは 8~30kDa と小さなオリゴペプチドであるため、それ以上に大きな蛍光タンパク質は本来のサイトカイン：レセプター間相互作用を阻害することが容易に予想される。すなわち、サイトカイン及びその受容体に関わるシグナル伝達を正確に解析するには、それぞれの蛋白質の活性、及び蛋白質間の相互作用を損なうことなく高機能化する手法が望まれる。ただし、内在性のこれらの蛋白質を高機能化する方法論は研究開始当初には報告例が存在しなかった。また、サイトカインとその受容体が起こす「蛋白質間相互作用」自体、制御や解析が困難な対象であり、本研究では蛋白質間相互作用の解析技術の確立も目指して、複合的な検討を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、蛋白質性因子に対する細胞内在性の受容体が、いつどこで活性化されるかを解析する技術を開発することなどを目標として、受容体のケミカルラベルや可視化、相互作用の解析方法等の確立を目的とした。またここで挙げた蛋白質性因子とその受容体の相互作用は、多くの薬剤標的となって

きつつある蛋白質間相互作用であり、これを制御する技術開発にも取り組んだ。例えば抗原/抗体の相互作用や、植物ホルモン受容体などがその例であり、いずれも近年の薬剤/農薬開発の重要な標的分子群である。

3. 研究の方法

モデルとなる蛋白質間相互作用として、サイトカインである上皮成長因子とその受容体 (EGF/EGFR)、ケモカインとその受容体、抗原/抗体の複数の組み合わせ、及び、植物ホルモンの受容体を標的として、片方の蛋白質に機能性分子を導入する方法を開発する。ここではさらに、細胞系で蛋白質を化学修飾する方法論にも拡張し、包括的に蛋白質を解析する技術へとつなげると同時に、相手の蛋白質との相互作用について、生細胞での可視化、相互作用部位の同定、及び、蛋白質間相互作用に基づいて化学修飾を行う方法論などを開発する。これらの知見とともに、細胞内外の蛋白質活性を検出する超分子プローブの開発も行い、細胞内で特異的な蛋白質機能解析法へと拡張する。一方、蛋白質間相互作用の解析及び制御技術は動物細胞にとどまらず、植物の生長や分化など生活環を制御する植物ホルモンにも見られる重要な生理現象であり、蛋白質間相互作用の解析及び制御技術は、植物生長制御にも繋がるものである。この背景に基づき、さらに植物ホルモン受容体を標的とした活性制御技術の開発にも取り組む。このように多くの種類の蛋白質間相互作用を網羅しそれぞれにフィードバックするで、蛋白質間相互作用を化学的な視点で制御/解析する技術の確立を目指した。

4. 研究成果

蛋白質間相互作用を起こす片方の蛋白質について、構造と活性を保持したままの人工機能化法を開発した。さらに、生細胞上でその受容体を特異的に化学修飾する方法を開発し、相互作用部位の同定などにつなげることができた (JACS 2015, 2013 など)。これらの成果をサイトカイン及びケモカインにも適用範囲を広げ、その受容体の効率的な機能化へとつなげた。また同時に、細胞内の蛋白質の化学修飾法を複数開発し、そのまま可視化したり、活性の検出などに成功した (BMC, 2017, Chem. Sci. 2015, ChemCommun, 2013 など)。自己集合性の超分子集合型プローブの開発にも従事し、世界で初めて細胞内で、蛋白質とリガンド小分子との結合に伴い可逆的に作動する超分子集合体の開発に成功した (JACS 2014, Chem. Eur. J, 2013 など)。

さらにこれらの知見を生かし、植物ホルモン受容体の相互作用解析方法の開発 (RSC Adv. 2017, 複数の招待講演で一部の成果を報告)、及びその相互作用の人為的な制御へとつなげることに成功した (論文未発表)。これらの成果は、動物/植物に限らず、生命現象の根幹を成し、かつ次世代の薬剤標的となりつ

つある蛋白質間相互作用の自在制御に向けて、さらなる技術革新につながる大変重要な知見が得られた。

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 17 件)

1) Y. Takaoka, Y. Nukadzuka, M. Ueda, Reactive group-embedded affinity labeling reagent for efficient intracellular protein labeling, *Bioorg. Med. Chem.* In press (2017). (査読有)
DOI: 10.1016/j.bmc.2017.02.059

2) H. Oishi, Y. Takaoka, H. Saito, T. Nishimaki-Mogami, H. Saito, M. Ueda, A Novel Nuclear receptor Ligand, Digoxigenin, is a Selective Antagonist of Liver-X-receptors, *Chem. Lett.* 46, 313-314 (2017). (査読有)
DOI: 10.1246/cl.161071

3) 高岡洋輔, 植物細胞内分子イメージングへの挑戦、化学と工業、74, 238-239 (2017). (査読無)

4) S. Egoshi, Y. Takaoka, H. Saito, Y. Nukadzuka, K. Hayashi, Y. Ishimaru, H. Yamakoshi, K. Dodo, M. Sodeoka, M. Ueda, Dual function of coronatine as a bacterial virulence factor against plants: possible COII/JAZ independent role, *RSC Adv.*, 6, 19404-19412 (2016) (査読有)
DOI:10.1039/c5ra20676f

5) Y. Takaoka, M. Shigenaga, Y. Nukadzuka, M. Imai, Y. Ishimaru, K. Saito, R. Yokoyama, K. Nishitani, M. Ueda, Protein Ligand-tethered Synthetic Calcium Indicator for Localization Control and Spatiotemporal Calcium Imaging in Plant Cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26, 9-14 (2016) (査読有)
DOI:10.1016/j.bmcl.2015.11.055

6) Yuki Yasueda, Tomonori Tamura, Keiko Kuwara, Yousuke Takaoka, Itaru Hamachi, Biomembrane-embedded Catalysts for Membrane-associated Protein Labeling on Red Blood Cells *Chemistry Letters*, 44 (12), 1673-1675, (2015) (査読有)
DOI:10.1246/cl.150797

7) Takahiro Hayashi, Yuki Yasueda, Tomonori Tamura, Yousuke Takaoka, and Itaru Hamachi, Analysis of Cell-Surface Receptor Dynamics through Covalent Labeling by Catalyst-Tethered Antibody *J. Am. Chem. Soc.*, 137 (16),

5372-5380 (2015) (査読有)
DOI:10.1021/jacs.5b02867

8) Yousuke Takaoka, Yuki Nishikawa, Yuki Hashimoto, Kenta Sasaki and Itaru Hamachi, Ligand-directed dibromophenyl benzoate chemistry for rapid and selective acylation of intracellular natural proteins *Chem. Sci.*, 6, 3217-3224 (2015) (査読有)
DOI:10.1039/c5sc00190k

9) 高岡洋輔 飛翔する若手研究者：合成ナノプローブによる細胞内タンパク質可逆センシング 化学と工業 68号 737-738 (2015年8月) (査読なし) DOI:なし

10) Song Zhining, Yousuke Takaoka, Yoshiyuki Kioi, Kazuhiro Komatsu, Tomonori Tamura, Takayuki Miki, Itaru Hamachi ; Extended Affinity-guided DMAP Chemistry with Finely-tuned Acyl Donor for Intercellular FKBP12 Labeling *Chem. Lett.* 44:333-335(2015) (査読有) DOI : 10.1246/cl.141065

11) Yoshii, T., Mizusawa, K., Takaoka, Y., Hamachi, I. ; Intracellular Protein-responsive Supramolecules: Protein Sensing and In-cell Construction of Inhibitor Assay System *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 16635-16642 (2014) (査読有)
DOI:10.1021/ja508955y

12) K. Yamaura, K. Kuwata, T. Tamura, Y. Kioi, Y. Takaoka, S. Kiyonaka, I. Hamachi; Live Cell Off-target Identification of Lapatinib Using Ligand-Directed Tosyl Chemistry *Chem. Commun.*, 50, 14097-14100 (2014) (査読有)
DOI:10.1039/C4CC05885B

13) 高岡洋輔, 浜地格; In Cell NMR に向けた化学-生物学的アプローチ 生体の科学, Vol.65, No.2 ,113-118, 医学書院 (2014) (査読なし)
DOI:なし

14) Matsuo, K., Kamada, R., Mizusawa, K., Imai, H., Takayama, Y., Narazaki, M., Matsuda, T., Takaoka, Y., Hamachi, I.*
“Specific Detection and Imaging of Enzyme Activity by Signal Amplifiable Self-Assembling 19F-MRI Probes” *Chem. Eur. J.*, 19, 12875-12883 (2013) (査読有)
DOI:10.1002/chem.201300817

15) Hayashi, T., Sun, Y., Tamura, T., Kuwata, K., Song, Z., Takaoka, Y., Hamachi, I.*
“Semisynthetic Lectin-Dimethylaminopyridine Conjugates for Labeling and Profiling Glycoproteins on Live Cell Surfaces” *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 12252-12258 (2013) (査読有)

DOI:10.1021/ja4043214

16) Takaoka, Y., Fukuyama, Y., Matsuo, K., Hamachi, I. "Disassembly-driven Turn-on Sensing of Enzyme Activity by using Substrate-based Fluorescent Nanoprobe" *Chem. Lett.*, 42, 1426-1428(2013) (査読有)
DOI:10.1246/cl.130697

17) Moriwaki, Y., Terada, T., Caaveiro, J. M. M., Takaoka, Y., Hamachi, I., Tsumoto, K., Shimizu, K. "Heme Binding Mechanism of Structurally Similar Iron-Regulated Surface Determinant Near Transporter Domains of *Staphylococcus aureus* Exhibiting Different Affinities for Heme" *Biochemistry*, 52, 8866-8877 (2013)
(査読有) DOI:10.1021/bi4008325

[学会発表] (計 29 件)

1) 高岡洋輔、岩橋万奈、齋藤大明、林謙吾、江越脩祐、加藤信樹、石丸泰寛、A. Chini, R. Solano, 上田実、植物ホルモン受容体サブタイプ選択的アゴニストの合理的設計とシロイヌナズナにおける機能解析
日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 16 日 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市) (口頭講演)

2) 高岡洋輔、植物ホルモン受容体のケミカルバイオロジー的制御
第 1 回 FRIS 若手研究者学際融合領域研究会 2017 年 3 月 7 日、宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県仙台市) (招待講演)

3) 高岡洋輔、岩橋万奈、齋藤大明、江越脩祐、加藤信樹、石丸泰寛、上田実、ジャスモン酸共受容体サブタイプ選択的アゴニストの合理的設計と in vivo 機能解析
第 51 回植物科学調節学会、2016 年 10 月 28-30 日 高知大学 (高知県・高知市)
(ポスター)

4) 高岡洋輔、植物ホルモン受容体のケミカルバイオロジー的解析と制御、みちのく分析科学シンポジウム 2016、2016 年 10 月 22 日、東北大学青葉山キャンパス (宮城県・仙台市)
(招待講演)

5) 高岡洋輔、内之宮祥平、小林大地、林隆弘、福山嘉明、早坂晴子、宮坂昌之、上田卓見、嶋田一男、浜地格、内在性サイトカイン受容体のケミカルラベルによる生細胞イメージング、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25-27 日、東北大学川内キャンパス (宮城県・仙台市)
(ポスター)

6) Yousuke Takaoka, Development of JAZ-subtype selective agonist based on

Coronatine, PSNA (国際学会)、2016 年 8 月 6-10 日、UC Davis (USA, Davis)
(口頭発表)

7) Yousuke Takaoka, Development of natural products-based chemical tools useful for plant cell biology, 微化研シンポジウム、2016 年 7 月 28 日、微生物化学研究所 (東京)
(招待講演)

8) 高岡洋輔、江越脩祐、岩下利基、林謙吾、鈴木健史、石丸泰寛、上田実、多機能性植物毒素コロナチンの構造活性相関と気孔再開口活性標的探索を目指した分子プローブ開発、第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会年会 2016 年 6 月 14 日 京都テルサ (京都府・京都市)
(ポスター)

9) 江越脩祐、山越博幸、闖闖孝介、岩下利基、鈴木健史、石丸泰寛、高岡洋輔、袖岡幹子、上田実 植物病原菌感染因子コロナチンの COI1-JAZ 非依存的作用に関するケミカルバイオロジー 農芸化学会 2016 2016 年 3 月 29 日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市) (ポスター)

10) 岩橋万奈、江越脩祐、岩下利基、石丸泰寛、齋藤大明、高岡洋輔、上田実 植物ホルモンを基体としたサブタイプ選択的 PPI アゴニストの開発 日本化学会第 96 春季年会 2016 年 3 月 27 日 同志社大学 (京都府・京田辺市) (口頭講演)

11) 今井真輝、重永美由希、糠塚祐希、石丸泰寛、齋藤圭、横山隆亮、西谷和彦、高岡洋輔、上田実 リガンド連結 Calcium Green-1 による植物細胞内の局在制御と Ca²⁺イメージング 日本化学会第 96 春季年会 2016 年 3 月 26 日 同志社大学 (京都府・京田辺市) (口頭講演)

12) 林謙吾、岩下利基、江越脩祐、石丸泰寛、高岡洋輔、上田実 植物毒素コロナチンのケミカルバイオロジー(2) コロナチンの気孔開口活性標的タンパク質の探索 日本化学会第 96 春季年会 2016 年 3 月 24 日 同志社大学 (京都府・京田辺市) (口頭講演)

13) 高岡洋輔、江越脩祐、林謙吾、岩下利基、鈴木健史、石丸泰寛、上田実 植物毒素コロナチンのケミカルバイオロジー(1) コロナチンの多機能性リガンドとしての構造活性相関研究 日本化学会第 96 春季年会 2016 年 3 月 24 日 同志社大学 (京都府・京田辺市)
(口頭講演)

14) Egoshi Syusuke, Dodo Kosuke, Ishimaru Yasuhiro, Iwashita Toshiki, Suzuki Takeshi, Takaoka Yousuke, Sodeoka Mikiko, Ueda Minoru, In vivo Raman imaging in living guard cells for elucidating the localization of the plant toxin coronatine PacifiChem2015 Dec17 2015

Honolulu (USA) (Poster)

15) Toshiki Iwashita, Yousuke Takaoka, Takeshi Suzuki, Ryo Tashita, Syusuke Egoshi, Yasuhiro Ishimaru, Minoru Ueda, Development of bioactivity-controlled molecular probe to reveal the mechanism of stomatal reopening caused by phytotoxin coronatine PacifiChem2015 Dec17 2015 Honolulu (USA) (Poster)

16) Yousuke Takaoka, Toshiki Iwashita, Takeshi Suzuki, Kengo Hayashi, Shusuke Egoshi, Yasuhiro Ishimaru, Minoru Ueda Development of novel fluorescent PPI detection system for subtype selective ligand of phytohormone co-receptor PacifiChem2015 Dec17 2015 Honolulu (USA) (Poster)

17) Nukadzuka Yuuki, Takaoka Yousuke, Ueda Minoru, Development of novel protein labeling method useful for plant chemical biology PacifiChem2015 Dec17 2015 Honolulu (USA) (Poster)

18) Miyuki Shigenaga, Masaki Imai, Yuuki Nukadzuka, Yousuke Takaoka, Minoru Ueda Development of small molecular calcium indicators for plant cell PacifiChem2015 Dec17 2015 Honolulu (USA) (Poster)

19) 高岡洋輔 タンパク質リガンド連結プローブによる動物/植物細胞内ケミカルバイオロジー 理研ケミカルバイオロジー勉強会 2015年11月18日 理化学研究所(埼玉県・和光市)(招待講演)

20) 高岡洋輔、岩下利基、岩橋万奈、鈴木健史、林謙吾、石丸泰寛、江越脩祐、上田実 植物毒素コロナチンの誘導体化による植物ホルモン受容体サブタイプ選択的アゴニスト開発と未知標的探索 第57回天然有機化合物討論会 2015年9月9日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)(口頭)

21) 岩下利基、高岡洋輔、鈴木健史、田下諒、江越脩祐、石丸泰寛、上田実 植物毒素コロナチンの気孔開口誘導メカニズム解明を目指した生理活性制御による新規分子プローブの開発 日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会 2015年6月12日 東北大学川内萩ホール(宮城県・仙台市)(ポスター)

22) 江越脩祐、山越博幸、鬮鬮孝介、岩下利基、鈴木健史、石丸泰寛、高岡洋輔、袖岡幹子、上田実 植物毒素コロナチンの作用部位解明を目指した変異体植物の孔辺細胞In vivo ラマンイメージング 日本ケミカルバイ

オロジー学会第10回年会 2015年6月12日 東北大学川内萩ホール(宮城県・仙台市)(ポスター)(日本ケミカルバイオロジー学会 RSC Molecular Biosystems 賞受賞)

23) 高岡洋輔 岩下利基、岩橋万奈、鈴木健史、林謙吾、江越脩祐、石丸泰寛、上田実 植物ホルモン受容体サブタイプ選択的リガンドスクリーニングのためのPPI蛍光検出法の開発 日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会 2015年6月12日 東北大学川内萩ホール(宮城県・仙台市)(ポスター)

24) 高岡洋輔 自己集合性ケミカルナノプローブによる細胞内タンパク質ラベリングとセンシング 日本化学会第95春季年会 2015年3月26日 日本大学(千葉県・船橋市)(若い世代の特別講演)

25) 高岡洋輔 ケミカルナノプローブによる細胞内タンパク質ラベリングと検出 第2回慶應有機化学若手シンポジウム 2014年5月10日 慶應義塾大学(神奈川県・横浜市)(招待講演)

26) 高岡洋輔 改良型リガンド指向性触媒反応による細胞内標的タンパク質の効率的ラベル化技術の構築 天然物ケミカルバイオロジー第6回公開シンポジウム 2014年5月28日 名古屋大学(愛知県・名古屋市)(ポスター)

27) 高岡洋輔、橋本侑樹、佐々木謙太、西川雄貴、浜地格 リガンド指向型化学の新展開(4) 自己集合性ジブロモフェニル エステルラベル化剤による細胞内蛋白質ラベル 日本化学会春季年会 2014年3月29日 名古屋大学(愛知県・名古屋市)(口頭)

28) 高岡洋輔、浜地格 細胞内蛋白質の選択的修飾法と質量分析 蛋白質科学会 2013年6月14日 とりぎん文化会館(鳥取県・鳥取市)(招待講演)

29) Takaoka, Y. Hamachi, I. Self-Assembling Fluorescent Turn-on Nanoprobes for Specific Protein Detection and Imaging ACMS MONODUKURI Strategy Organic Chemistry 2013年7月18日 サザンビーチホテル&リゾート沖縄(沖縄県・那覇市)(ポスター)

[図書](計 1 件)

高岡洋輔、浜地格 高分子学会 高分子「動的な自己集合性ナノ粒子によるタンパク質活性のシグナル OFF/ON イメージング」(2013) 3 査読なし

[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://www.orgchem1.chem.tohoku.ac.jp/orgchem1/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高岡 洋輔

(TAKAOKA, Yousuke)

東北大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：80599762

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし