

研究報告書

「創薬標的の同定・解析を可能とする革新的ツールの創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 重永章

1. 研究のねらい

本研究では私たちの見出した SEAlide の酸塩基触媒応答型N→Sアシル基転移反応(図1)を基盤とし、生物活性化合物が標的とするタンパク質の高効率同定を可能とするトレーサブルリンカー、および標的タンパク質の機能解明に資する標的タンパク質ラベル化試薬の開発を目指した。

生物活性化合物が標的とするタンパク質(標的タンパク質)の同定・機能解明は、これら化合物を医療応用へつなげるためには必要不可欠である。標的タンパク質の同定には、プロテオーム中の標的タンパク質の精製が必須となる。しかし多くの場合、容器などに吸着されていた非標的が標的に混入するため、その同定は困難を伴う。そこで私は、標的タンパク質の精製にあわせて標的タンパク質選択的ラベル化が可能となれば、ラベルを指標とした標的・非標的の区別が可能となることから、その後の同定も容易となると考えた。そこで本研究では1つ目のツールとして、標的タンパク質の精製・ラベル化をワンステップで可能とする高機能性リンカーであるトレーサブルリンカーの開発を計画した。

また、生物活性化合物を創薬研究へ展開するうえで、標的タンパク質上の生物活性化合物結合部位の知見が求められる。あわせて、標的タンパク質の機能解明も求められるが、その際は単離・精製した標的タンパク質の機能のみではなく、生細胞内での機能も明らかにすることが望ましい。このためには、細胞内での標的タンパク質選択的ラベル化法が必須となる。そこで本研究では2つ目のツールとして、細胞内でも使用可能な、新たな標的タンパク質ラベル化試薬の開発を計画した。

本研究では上述トレーサブルリンカーおよび標的タンパク質ラベル化試薬の創製を、私たちの見出した SEAlide の酸塩基触媒応答型アシル基転移反応を基盤として目指すこととした。

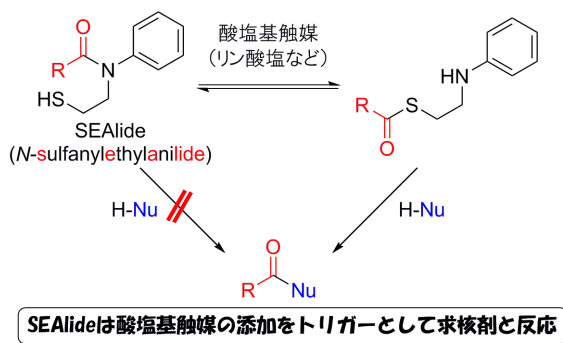


図1. SEAlide の酸塩基触媒応答型反応 (Nu: 求核性官能基)

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では SEAlide を基盤とした2つのツール、すなわちトレーサブルリンカーおよび細胞内標的タンパク質ラベル化試薬の開発を行った。前者の研究ではトレーサブルリンカーを設計・合成し、これを用いた細胞抽出液中の標的タンパク質の精製に成功するとともに、ラベルを指標とした標的・非標的の判別が可能であることを実証した(5. 主な研究成果リスト (1))

論文(原著論文)発表 1)。後者については標的タンパク質ラベル化試薬を設計・合成し、タンパク質混合物中の標的タンパク質選択的ラベル化が可能であることを証明した。さらに本試薬を基盤とし、赤血球細胞内での標的タンパク質選択的ラベル化を達成した(5. 主な研究成果リスト (1)論文(原著論文)発表 2)。また、本ラベル化試薬によるラベル化が標的タンパク質の生物活性化合物結合部位の近傍で起こることを見出し、この性質を利用して統合失調症に関与する酵素である D-アミノ酸酸化酵素の阻害剤結合部位を解明した(投稿準備中)。

(2) 詳細

研究テーマ A「トレーサブルリンカーの開発」

プロテオーム中に含まれる生物活性化合物が標的とするタンパク質を精製する方法として近年、クリーバブルリンカーを用いた方法が汎用されている(図2)。この方法では、まず標的未知の生物活性化合物上へ光親和性部位およびアルキンを導入した後、これをプロテオームへ添加し紫外線を照射する。すると、プロテオーム中の標的タンパク質のみがアルキンを提示した状態となる。ここへ、一方にビオチンを、他方にアジドを有するクリーバブルリンカーを加えたのち、クリック反応により標的タンパク質をビオチン化する。最後にビオチン化標的タンパク質をアビジンビーズへ吸着させたのち夾雑物を洗い流し、リンカーを切断すると標的タンパク質が得られるという手法である。本手法は非常に実用性が高いものの、容器などに吸着されていた非標的タンパク質が最終精製物に混入し、いずれが真の標的タンパク質か判別困難な場合があるという課題が残っていた。

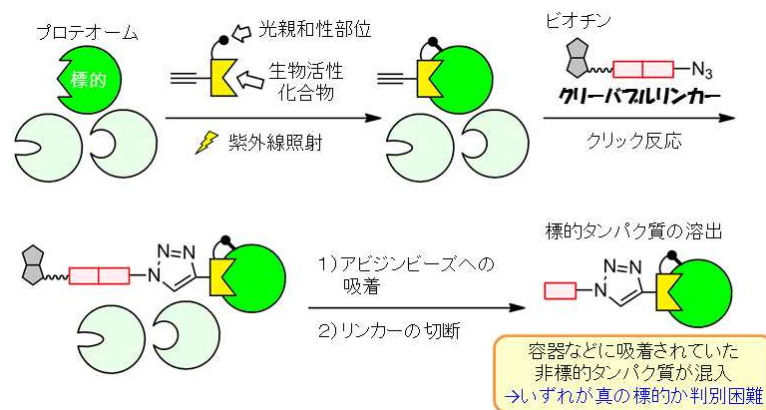


図2. 従来のクリーバブルリンカーを用いた標的タンパク質精製法

そこで私は、リンカー切断の際に標的タンパク質のみが選択的にラベル化できれば、ラベルを指標とした標的・非標的の簡便な区別が可能になると考えトレーサブルリンカーを設計した(図3)(5. 主な研究成果リスト (1)論文(原著論文)発表 1)。トレーサブルリンカーは SEALide を挟み、一方にアジドを、他方にビオチンを有する。これを、アルキンを導入したタンパク質とのクリック反応に付したのち、生じるビオチン化標的タンパク質をアビジンビーズへ吸着させる。ここまで酸塩基触媒が存在しないため、トレーサブルリンカーは安定に取り扱うことができる。続いて、酸塩基触媒であるリン酸塩および求核性部位を有するラベル化試薬を加

える。すると、トレーサブルリンカーがチオエステルへと活性化されたのちラベル化試薬と反応し、リンカー切断に伴いラベル化された標的タンパク質が溶出する設計である。

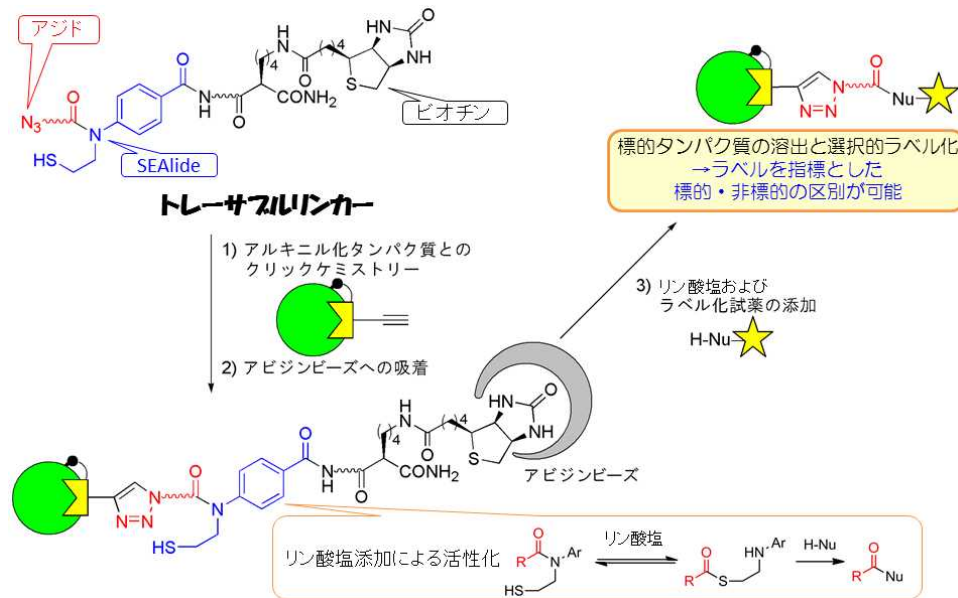


図3. トレーサブルリンカーの分子設計 (Ar: 芳香環; Nu: 求核性官能基)

実験結果を図4に示す。本実験では、細胞抽出液に含まれるアルキニル化標的タンパク質の精製・ラベル化に挑戦した。この結果、標的タンパク質を含む3種のタンパク質が取り出された。従来のクリーバブルリンカーを用いた場合、この3種のうちのいずれが真の標的かは分からない。しかしトレーサブルリンカーを用いた場合、同じサンプルのラベル部分を可視化することにより、標的と非標的を簡単に区別することに成功した。現在、トレーサブルリンカーを用いた標的未知生物活性化合物の標的タンパク質同定を目指した研究が進行中である。

研究テーマ B「標的タンパク質ラベル化試薬」

本テーマでは SEALide を基盤とした標的タンパク質ラベル化試薬を開発したのち、これを用いた細胞内での標的タン

パク質のラベル化(研究テーマ B-1)およびタンパク質の生物活性化合物結合部位の同定(研究テーマ B-2)に挑戦することとした。ラベル化試薬の分子設計を図5に示す(5. 主な研究成果リスト (1)論文(原著論文)発表 (2)。ラベル化試薬として SEALide を挟み、一方に標的タンパク質に結合する生物活性化合物誘導体を、他方にラベルを導入した化合物を設計した。本試薬をタンパク質へ加えると、生物活性化合物誘導体を介して標的タンパク質に選択的に結合する。つづいて、タンパク質表面には酸性・塩基性官能基が多数存在することから標的タンパク質自身が酸塩基触媒として働き、ラベル化試薬をチオエステルへと活性化する。この結果、ラベル部分が近傍の標的タンパク質求核性官能基と反応し、標的タンパク質

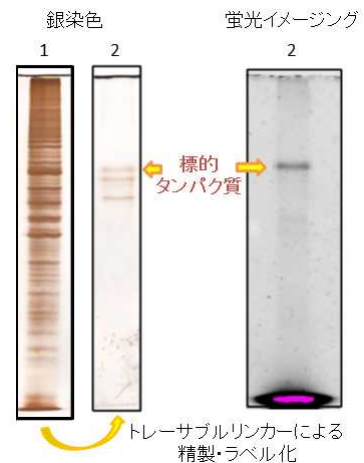


図4. トレーサブルリンカーによる標的タンパク質の精製・ラベル化 (1: アルキニル化標的タンパク質を含む細胞抽出液; 2: トレーサブルリンカーを用いた精製・ラベル化後のサンプル)

選択的ラベル化が達成されると考え研究を開始した。

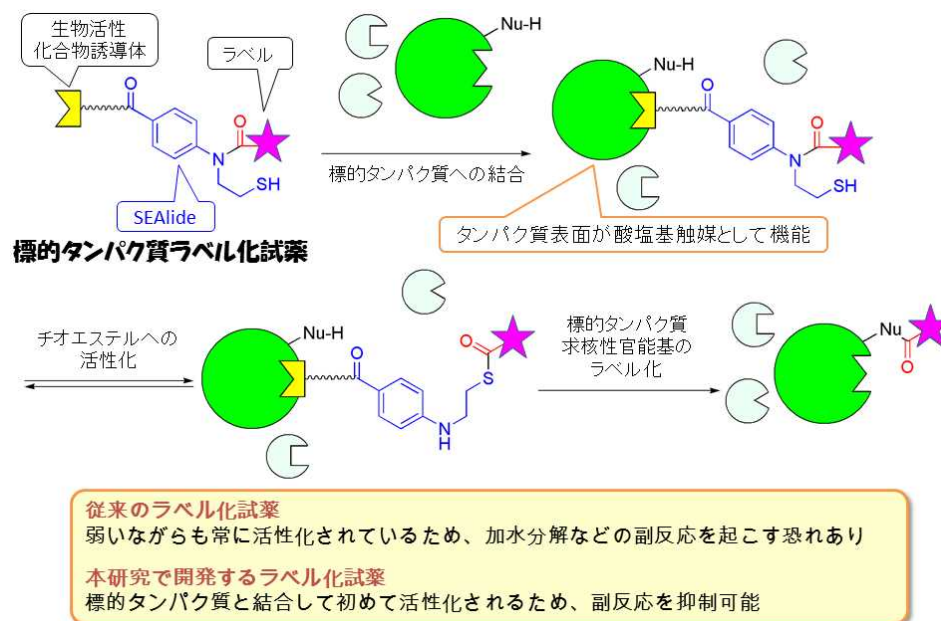


図5. 標的タンパク質ラベル化試薬の分子設計 (Nu: 求核性官能基)

研究テーマ B-1「細胞内での標的タンパク質ラベル化試薬」

本テーマでは、赤血球細胞内に含まれる炭酸脱水酵素のラベル化に挑戦した(5. 主な研究成果リスト (1)論文(原著論文)発表 (2)。生物活性化合物誘導体として炭酸脱水酵素の選択的阻害剤であるベンゼンスルホンアミドを、ラベルとしてビオチンを有するラベル化試薬を合成し、これを用いた細胞内でのラベル化実験を行った(図6)。この結果、赤血球細胞内での標的タンパク質選択的ラベル化に成功した。さらに、標的タンパク質の生物活性化合物結合部位近傍にラベルが導入されることを見出した。そこでこの性質を利用し、ラベル導入位置からタンパク質の生物活性化合物結合部位を明らかにする研究(研究テーマ B-2)に着手した。

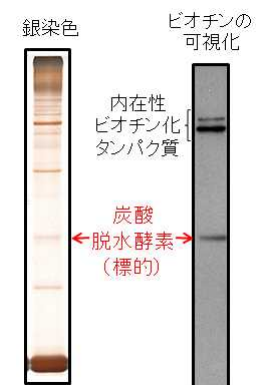


図6. 赤血球細胞内での標的タンパク質ラベル化

研究テーマ B-2「タンパク質の生物活性化合物結合部位の同定」

本テーマでは統合失調症関連酵素であるD-アミノ酸酸化酵素(DAO)の阻害剤結合部位の解明を目的とした。すなわち、私の所属する研究室が所有する化合物ライブラリから見出されたDAO阻害剤がDAOのどこへ結合するのかを明らかにするため、タンパク質ラベル化実験およびin silicoドッキングスタディーの両面から研究を行った。すると両実験の結果は完全に一致し、当初予測された結合部位に加え、新たな結合部位を明らかにすることに成功した(論文執筆中)。

3. 今後の展開

本研究ではトレーサブルリンカーおよび標的タンパク質ラベル化試薬の開発に成功した。こ

れらツールはまだ開発されたばかりであるため、これらツールを用いた未知標的タンパク質の同定や機能解明には至っていない。そこで、本さがけ研究終了後もこれらツールを用いた未知標的・機能解明研究を継続するとともに、積極的にバイオ系研究者への技術導出を行う計画である。特に、現在まではアカデミアへの導出を行ってきたが、今後は SciFoS (Science For Society) 活動で得た経験および人的ネットワークを活かして製薬企業との共同研究についてもその可能性を探り、アカデミアおよび企業のそれぞれ異なった視点からのフィードバックをいただくとともに、これらを基にトレーサブルリンカーおよび標的タンパク質ラベル化試薬の更なる改良を行い、真に実用的なツールへと昇華させていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況:

本研究では私たちの見出した SEAlide の反応性に着目して設計した2つのツール、すなわちトレーサブルリンカーおよび細胞内標的タンパク質ラベル化試薬の開発という当初の目的を達成することができた。さらにラベル化試薬を用い、統合失調症に關与する酵素であるD-アミノ酸酸化酵素の新たな阻害剤結合部位を明らかにすることに成功した。期間内での生物活性化合物の未知標的タンパク質同定・機能解明に至らなかった点は反省すべきであるものの、本同定・機能解明研究を推進するため、さがけ本領域関係者をはじめとする様々なバイオ系研究者と積極的に共同研究を開始し現在も継続していることは、今後の大きな財産になるとともに、当初の計画よりも時間はかかろうとも未知標的タンパク質同定・機能解明につながるものと確信している。

研究実施体制および研究費執行状況:

私および大学院生2名を中心として研究を遂行した。研究費執行状況については、特に問題などなかった。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果:

本研究で開発に成功したトレーサブルリンカーおよび標的タンパク質ラベル化試薬は、創薬標的タンパク質の同定や機能解明を可能とするツールであり、その成果は天然資源に乏しい我が国の成長牽引産業にすべき創薬に直接的に資するものである。これらツールは開発されたばかりであるため、本ツールを用いた未知標的タンパク質の同定および機能解明にはまだ至っていない。そこで、本さがけ研究終了後もこれらツールを用いた未知標的・機能解明研究を継続するとともに積極的にバイオ系研究者への技術導出を行い、これらツールを真に実用的なものへと昇華させることを経て、今後の創薬研究や標的・機能解明のためのデファクトスタンダードツールに位置づけられることを目指したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

生理活性化合物の標的の同定は、薬の作用・副作用の分子レベルでの作用機序解明や対象疾患の絞込み、化合物を使ったバイオロジーのさらなる理解などのために極めて重要である。よって標的の同定方法については、多種多様な方法が既に報告されている。しかしながら、例えば生理活性化合物が比較的low分子であり、その標的が精製が難しいタンパク質である場合において、その標的の同定は必ずしも容易ではない。即ち、生理活性化合物の誘導体化合物を結合させた担体に、標的タンパク質を含む細胞抽出液を加え、特異的に結合・溶出するアフィニティクロマトグラフィーの原理は確立しているが、標的タンパク質以外の複数種類のタンパク質なども(担体や容器への非特異的結合などにより)溶出画分に混入することは珍しくない。

本研究はこのような重要な問題点の解決を目指し、本研究者らが見出した SEAlide (N-sulfanylethylaniilide)の酸塩基触媒応答型N→Sアシル基転移反応を利用して、標的タンパク質の高効率同定のためのトレーサブルリンカー、および標的タンパク質の機能解明のためのラベル化試薬の開発を目指したものである。

トレーサブルリンカーは溶出された標的タンパク質が蛍光ラベルされているという特徴があり、実際にタンパク質混合物中の標的タンパク質の選択的ラベル化が可能であることが示された。

ラベル化試薬については、赤血球細胞内に含まれる炭酸脱水酵素の選択的ラベル化に成功した。また、統合失調症関連酵素であるD-アミノ酸化酵素(DAO)の阻害剤の新たな結合部位の同定にも成功したことから、ラベル化試薬の創薬への波及効果も期待される。

特定の生理活性化合物について、その未知の標的タンパク質の同定・機能解明までは残念ながら達成出来なかったが、本さがけ研究をきっかけとして、領域内外の研究者と多くの共同研究を開始しており、今後の展開が期待される。標的が未知の天然・人工の生理活性化合物や薬剤は多数あることから、さがけ研究で培ったプローブ設計や有機合成の経験とアイデアを活かして、共同研究もより積極的におこない、創薬標的の同定・解析の成功例を増やして欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Morisaki, T.; Denda, M.; Yamamoto, J.; Tsuji, D.; Inokuma, T.; Itoh, K.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “N-Sulfanylethylaniilide-based traceable linker for enrichment and selective labelling of target proteins” *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6911–6913.
2. Denda, M.; Morisaki, T.; Kohiki, T.; Yamamoto, J.; Sato, K.; Sagawa, I.; Inokuma, T.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Labelling of endogenous target protein via N-S acyl transfer-mediated activation of N-sulfanylethylaniilide” *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6244–6251. (Highlighted in Current Hot Articles in Organic & Biomolecular Chemistry)
3. Eto, M.#; Naruse, N.#; Morimoto, K.; Yamaoka, K.; Sato, K.; Tsuji, K.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Development of an anilide-type scaffold for the thioester precursor N-sulfanylethylcoumarinyl amide” *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4416–4419. (#equal contribution)
4. Yamamoto, J.#; Maeda, N.#; Komiya, C.; Tanaka, T.; Denda, M.; Ebisuno, K.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Development of a

fluoride-responsive amide bond cleavage device that is potentially applicable to a traceable linker” *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5122–5127. (*equal contribution)

5. Yamamoto, J.; Denda, M.; Maeda, N.; Kita, M.; Komiya, C.; Tanaka, T.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Development of a traceable linker containing a thiol-responsive amino acid for the enrichment and selective labelling of target proteins” *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3821–3826.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表など

1. 重永 章「N-S アシル基転移反応を基盤としたタンパク質完全化学合成法の開拓」有機合成化学協会中国四国支部主催第74回パネル討論会『次世代を切り拓く全合成研究の若い力』(徳島)、2016年10月1日
2. 重永 章、大高 章「ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー研究のための基盤技術の開拓」日本薬学会第136年会(シンポジウム「疾患代謝」から解明される生命現象と創薬研究への応用)(横浜)、2016年3月26-29日
3. 重永 章「ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー研究のための基盤技術の開拓」名古屋大学大学院生命農学研究科食品機能化学特別セミナー(名古屋)、2015年10月16日
4. 重永 章「「さきがけ」採択の体験談と申請に向けたアドバイス」第2回研究推進セミナー—大型競争的資金の獲得にむけて—(徳島)、2015年7月28日
5. 重永 章「Peptide/Protein-based Chemical Biology のための基盤技術の開発」第18回スクリプス・バイオメディカルフォーラム(大阪)、2014年11月22日
6. 重永 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開」2014年日本化学会中国四国支部大会(若手セッション「ペプチド・タンパク質科学における若手研究者の化学的アプローチと今後の展望」)(山口)、2014年11月8-9日

著作物

1. Shigenaga, A.*; Yamamoto, J.; Kohiki, T.; Inokuma, T.; Otaka, A.* “Invention of stimulus-responsive peptide-bond-cleaving residue (Spr) and its application to chemical biology tools” *J. Pept. Sci.* in press (doi: 10.1002/psc.2961) (Akabori Special Issue, invited review).
2. 重永 章、大高 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開」化学工業(特集 ペプチド化学の新潮流(1)) **2014**, *65*, 849–856.
3. 重永 章、山本 純、大高 章「生物活性小分子の結合パートナータンパク質を知りたい—リンカー分子を用いたタンパク質精製法—」実験医学増刊号 驚愕の代謝システム～メタボロームの階層から解き明かす疾患研究の新たなステージ～(末松 誠、杉浦悠毅編)、羊土社、150(2482)–156(2488)、**2014**.