

研究報告書

「タンパク質の動的機能の理解に基づく新たな疾患バイオマーカー・創薬標的分子探索法の開発」

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: 小松 徹

1. 研究のねらい

ヒト生体内には、数千種類を超える酵素が存在し、これらの機能の異常が疾患と繋がる例は多く知られていますが、いまだ、「疾患との関わりが見出されていない」、「疾患との関わりは知られているがその分子メカニズムが明らかにされていない」、「疾患との関わり、分子メカニズムが明らかにされているが、その機能を制御する手法が確立されていない」といった酵素は数多く存在します。本研究では、酵素の動的機能の理解を可能とするケミカルバイオロジーの研究ツールを開発し、これらの疾患関連酵素の理解を進め、疾患と関連する酵素を「探す」「見る」「操る」ことを目指した研究を進めて参りました。

具体的には、申請者らが開発した、目的の生理活性を有する未知の標的タンパク質をタンパク質の総体(プロテオーム)中から機能に応じた形で見出す新たな探索研究の実験系(蛍光法の利点である高感度測定と、酵素反応のターンオーバーを利用したシグナルの増幅を実現し、プロテオーム中にタンパク質 100,000～1,000,000 分子に1分子以下の割合で存在する微量の酵素を、その機能に応じた形で、網羅的に検出することを可能とするもの)を基盤技術とし、疾患に関連するタンパク質の動的な機能を理解するツール開発と合わせることで、タンパク質の網羅的探索を進め、新たな創薬標的タンパク質、疾患バイオマーカーの確立に繋げていくことを目指して、以下に纏める研究を実施しました。

2. 研究成果

(1) 概要

上記の背景・目的の下、本研究は、大きく2つの方向性をもっておこなわれてきました。一方は、生体中で活性を有する酵素の総体を「enzym-ome」と定義し、これらの網羅的解析により、疾患と関わる酵素活性の異常を効率的に見出し、その活性本体タンパク質を決定していくという手法です。そしてもう一方は、疾患と関わることが知られている代謝物やその代謝活性に着目し、これを担う酵素のはたらきを高感度に可視化する研究ツールを開発し、さらには、その活性を制御する手法を確立するというものです。前者の活性タンパク質探索の研究成果としては、酵素活性の網羅的解析を実施する「enzym-omics」という概念を提唱し、これに用いる方法論を開発し、実際に、(A) 薬剤の選択的活性化に関わる酵素、(B) 肺炎症時に肺胞洗浄液中での活性上昇に関わる酵素、(C) 大腸癌の癌部位で活性上昇が見られる酵素、の発見を実現し、これらを学会発表・論文発表しました。後者の可視化ツール開発・活性制御の研究成果としては、これまでに活性評価法の確立されていなかった、(D) isoaspartyl 基の生成と代謝に関わる酵素、(E) 癌細胞のエネルギー代謝系に関わる酵素、のそれぞれについて、新たな酵素活性評価法を確立し、特許出願すると共に、これらを用いた活性制御化合物

の取得をおこない、その有用性を検証した成果の一部を学会・文献発表しました。また、これ以外にも、酵素活性評価のツール開発を通じたさきがけ内の共同研究を実施し、(F) 細胞表面のプロテアーゼ活性を可視化する蛍光プローブの開発、(G) 細胞表面のタンパク質機能を制御する実験系の構築、などの共同研究成果を得て、これらの成果の一部を学会発表・論文発表しました。

(2) 詳細

活性タンパク質探索の研究成果

研究テーマA「薬剤の選択的活性化に関わる酵素の発見」

生体内の興味深い代謝活性をスクリーニングし、活性本体タンパク質の同定とその利用への展開を目指す enzym-omics 研究の一例として、「種々の反応点を有し、特定の代謝活性によって代謝されると蛍光性を獲得する」という性質を有する pro-fluorescent 蛍光プローブ群(約 60 種類)を開発し、マウスの各臓器間の活性の違いを調べるプロファイリングをおこないました。その結果、肝臓において選択的に蛍光上昇を示す構造として、ピルビン酸のアミド構造を選択的に加水分解するという興味深い活性が見出され、その臓器特異的な活性の責任酵素を、研究代表者らが開発した酵素探索手法を用いて探索した結果、carboxylesterase の特異的なサブタイプがこの活性を担っていることが明らかとなりました。更に、このようにして見出された臓器特異的な活性を利用することで、臓器選択的に狙った分子の機能を発現させるプロドラッグシステムの開発にも成功しました。

enzym-omics の概念提唱をおこない、新たな代謝活性の発見を実現した本研究成果は、*Journal of the American Chemical Society* 誌に掲載されました。

研究テーマB「肺炎症時に肺胞洗浄液中での活性上昇に関わる酵素の発見」

上記のシステムを、肺炎症モデルマウスの肺胞洗浄液(肺内を生理食塩水で洗浄して回収した体液。ヒトでも実際の臨床診断にも用いられる)中の網羅的酵素活性検出へと適用し、マウスの肺炎症時に、肺胞洗浄液中の酵素 acylamino acid releasing enzyme(APEH)の活性が大幅に上昇することを明らかにしました。また、その分子メカニズムについて理解を進め、肺炎症によって肺胞内に APEH 活性を有する免疫細胞が浸潤してくることが、その活性上昇に繋がっていることを確かめました。実際の臨床診断の新たなツールを与えることにも繋がりが得る本成果は、*Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 誌に cover article として掲載され、本研究成果をもって、平成 29 年度薬学会奨励賞を受賞しました。

研究テーマC「大腸癌の癌部位で活性上昇が見られる酵素の発見」

enzym-omics の方法論を更に一般化するため、タンパク質の加水分解によって調整したペプチドライブラリーを用いて、生体サンプル中の 100 種類以上のペプチド代謝活性を同時に評価することを可能とする実験系の開発をおこないました。これを用い、AMED-CREST 疾患代謝領域の浦野泰照教授、東京大学腫瘍外科の渡邊聡明教授らとの共同研究により、大腸癌患者の手術検体中から、癌部位で選択的に上昇している酵素活性を探索する研究を実施し、酵素 neurolysin を見出しました。新たな enzym-omic の方法論の確立から疾患関連タンパク質の

発見までを実現した本成果は、*Journal of the American Chemical Society* 誌に掲載されました。

可視化ツール開発・活性制御の研究成果

研究テーマD「isoaspartyl 基の生成と代謝に関わる酵素の活性評価法の確立」

isoaspartyl 基を選択的にメチル化する酵素 protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) は、2012年に、癌抑制タンパク質 p53 のはたらきを制御する酵素として、癌の悪性化との関わりが示唆されました。しかしながら、いまだその活性評価法や活性制御化合物が見出されていないことが、その詳細な分子メカニズム研究や、これを癌のバイオマーカー、治療標的として確立していく臨床研究に向けたハードルとなっています。本研究で、高い基質認識能を有する加水分解酵素を用いて、特定の基質の isoaspartyl 基のメチル化の有無を見分ける仕組みを確立し、蛍光特性の変化によって酵素 PIMT の活性を高スループットに評価する分子ツールを開発し、特許出願をおこないました。また、東京大学創薬機構との共同研究により、20万化合物のスクリーニングをおこない、世界初の PIMT 阻害剤の発見を実現しました。新規の癌関連タンパク質である PIMT の創薬標的としての有用性を検証するツールを与える本研究成果は、*Angewandte Chemie International Edition* 誌に掲載されました。

研究テーマE「癌細胞のエネルギー代謝系に関わる酵素の活性評価法の確立」

癌細胞の多くは、増殖速度の変化などの特有の性質を実現するために、そのエネルギー代謝系を大きく変化させることが知られています。このような、癌細胞特異的な代謝活性の制御化合物を取得する阻害剤スクリーニング系の開発は、特に癌をはじめとする代謝に関わる疾患治療薬の新たな候補化合物の取得に繋がることが期待されるものですが、現在は、これに用いることができるアッセイ系の多くは、個々の酵素に着目した *in vitro* での酵素アッセイに留まっており、生細胞レベルで目的のエネルギー代謝系を制御する薬剤のスクリーニング系の開発が強く求められています。研究代表者らは、これに用いることができるアッセイ系として、特定の代謝物(input)を細胞に与えた場合に目的の代謝系を介して細胞外に放出される代謝物(output)を高感度検出する pathway-oriented screening という概念を提唱し、これに用いることができる分子ツールを開発し、癌において亢進の見られる代謝系のひとつである解糖系の阻害剤スクリーニング系を確立しました(特許出願済)。これを用いて、東京大学創薬機構との共同研究により、生理活性既知の化合物群の中から、新たに強い解糖系阻害作用を示す薬剤を取得することに成功しました。本成果は、日本薬学会年会などにおいて発表をおこないました。

研究テーマF「細胞表面のプロテアーゼ活性を可視化する蛍光プローブの開発(疾患代謝領域 井上飛鳥研究者との共同研究)」

さきがけ内共同研究として、細胞表面プロテアーゼの活性を評価する分子ツールの設計原理を確立し、種々の疾患との関わりが注目されている細胞表面プロテアーゼの活性を高感度に検出する実験系の確立をおこないました。現在、論文投稿準備中です。

研究テーマG「細胞表面のタンパク質機能を制御する実験系の構築(細胞機能領域 井上 尊生研究者との共同研究)」

さきがけ内共同研究として、有機小分子を使って細胞表面のタンパク質のはたらきを制御する実験系を確立し、任意のタイミングで細胞に対して、他の細胞を貪食する性質を付与する実験系の開発をおこないました。細胞の機能を、有機小分子を用いてコントロールする新たな概念を提唱する本研究成果は、*Science Signaling* 誌の cover article として掲載され、JST よりプレスリリースがおこなわれました。

3. 今後の展開

本研究を通じて、世界に先駆けて「enzym-omics」という概念の提唱をおこない、その方法論と端緒となる成果を報告することを達成しました。これは、従来の遺伝子、mRNA、タンパク質レベルの網羅的解析法、あるいは代謝活性の産物である代謝物をベースとした網羅的解析法とは異なるポイントでの生体サンプルの評価を可能とする概念であり、多くの酵素活性の可視化ツールの開発に携わってきた本研究者においてはじめて達成可能なものであったと考えております。今後は、既に確立されている他の omics 研究の結果との橋渡しをおこないつつ、独自の疾患関連タンパク質の探索法として発展していくと期待されます。

特に、本研究を通じて見出されたシードの活用先としては、以下のものが考えられます。(1) 見出された酵素の活性変化に着目した生物学研究(疾患との関わりでの解明)、(2) 疾患の原因としての可能性が確かめられた場合、これを抑える薬剤を開発する、(3) 見出された酵素活性の更なる高感度・高精度な活性測定系を開発することにより、疾患の早期診断や予後予測などをおこなうバイオマーカーとして確立する。

現在、本研究者が確立した本手法によって、様々な生体サンプルについて、興味深い酵素活性が次々と見つけられつつあり、今後、本手法を通じ、また、更なる手法の発展を図ることで、継続的な疾患関連タンパク質の発見を可能とする研究基盤として発展していくことと期待されます。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さきがけ研究において、本研究者は、酵素活性を視る研究ツールの開発を通じたケミカルバイオロジー研究というフィールドにおいて、*Journal of the American Chemical Society* 誌、*Angewandte Chemie International Editions* 誌、*Science Signaling* 誌などのジャーナルをはじめとする7件の仕事について、責任著者としての論文発表をおこないました。これと併せて、本さきがけ研究の成果を含む研究成果についてまとめた国内の書籍3編(実験医学など)、国際学術誌のレビュー5編(*ACS Chemical Biology* 誌など)を執筆し、関連分野への情報発信に努めました。これらの成果をもって、本研究者の論文被引用数はさきがけ期間を通じて大幅に上昇し、2017年1月現在で1,700件を超え、さきがけ研究者として十分な成果の発信をおこなうことができたと考えています。また、研究成果の波及を目指して、本さきがけ研究を通じて開発された3件の分子ツールに関して、特許出願をおこないました。

代表的な研究成果としては、さきがけ研究開始時から携わった酵素活性の網羅的評価に

基づく探索研究である「enzym-omics」の研究について、その概念提唱にあたる論文を2015年に発表し(この時点では enzym-omics の概念に基づく学術論文は皆無であった)、2017年、その新たな方法論を確立した論文を投稿中(リバイス中)である。更に、これらの方法論に基づいて、疾患に関わる新たな疾患関連タンパク質の候補を見出すことにも成功しており、これらの成果によって、新たな研究のフィールドを拓く仕事に繋がった点は、本さがけ研究の大きな収穫として捉えることができると考えています。

本研究は、手法の立ち上げから自身でおこなってきたこともあり、3年半の研究期間では、見出されたシードを臨床研究での成果として収める段階までには至らず、発表論文も手法開発を中心とした化学系の論文が主となった点は大変残念ではありますが、確立された技術と見出されたシードをもって、今後、精力的な橋渡し研究を進めていくことが可能となると考えています。

(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)

生体内には数千種類の酵素が存在すると予想されているが、その活性、代謝調節における役割や疾患との関連などについては不明な酵素が多い。本研究は、酵素活性の網羅的高感度検出を目的として、多種類の高感度蛍光基質を開発し、これを用いて非変性電気泳動法で分離された酵素の活性を網羅的に測定する手法により、疾患バイオマーカー・創薬標的分子探索法の開発を目指したものである。

このアプローチにより、薬剤の標的候補分子となりそうな臓器特異的なカルボキシエステラーゼや肺炎マーカー候補(平成29年度薬学会奨励賞)、大腸癌マーカー候補などの発見につながった。今後、ヒトでの有用性の検証が期待される成果である。

また、酵素PIMTの活性を高スループットに評価する分子ツールを開発し、世界初のPIMT阻害剤の発見につながったことは、今後の創薬分野にも少なからぬインパクトを与えたと思われる。

さらに、解糖系の阻害剤スクリーニング系を確立し、強い解糖系阻害作用を示す化合物を取得するなど、癌の治療薬への今後の展開が興味深い。

他のさがけ研究者との共同研究にも積極的に取り組み、細胞表面のプロテアーゼ活性を可視化する蛍光プローブの開発や有機小分子を使って細胞表面のタンパク質のはたらきを制御する実験系の確立など、新規研究分野の開拓につながる可能性が期待される。

研究成果による知的財産についても、その確保に努力した。本さがけ研究の成果が認められ、主要な国内・国際学会の招待講演が増え、本分野の有力メンバーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。近年、癌組織において、特定の酵素活性が亢進していることが癌の原因と考えられる症例が数多く知られるようになってきた。今後も酵素活性の網羅的解析を実施する「enzym-omics」により、新たな疾患バイオマーカーの発見や創薬標的分子の同定において、大きな貢献がなされることを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Jun Onagi, Toru Komatsu*, Yuki Ichihashi, Yugo Kuriki, Mako Kamiya, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Hiroyuki Matsuzaki, Keisuke Hata, Toshiaki Watanabe, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano*
“Discovery of cell-type-specific and disease-related enzymatic activity changes via global evaluation of peptide metabolism”
Journal of the American Chemical Society, in press (DOI: 10.1021/jacs.6b11376)
2. Yusuke Kimura, Toru Komatsu*, Kouichi Yanagi, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Hirotsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano*
“Development of chemical tools to monitor and control isoaspartyl peptide methyltransferase activity”
Angewandte Chemie International Edition **2017**, *56*, 153–157.
3. Kentaro Yoshioka, Toru Komatsu*, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano*
“Discovery of pyruvylated peptide-metabolizing enzyme using a fluorescent substrate-based protein discovery technique”
Chemical Communications **2016**, *52*, 4377–4380.
4. Kentaro Yoshioka, Toru Komatsu*, Akihiro Nakada, Jun Onagi, Yugo Kuriki, Mitsuyasu Kawaguchi, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano*.
“Identification of tissue-restricted bio-reaction suitable for in vivo targeting by fluorescent substrate library-based enzyme discovery”
Journal of the American Chemical Society **2015**, *137*, 12187–12190.
5. Hiroki Onuma, Toru Komatsu*, Makoto Arita, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Tetsuo Nagano and Takanari Inoue*
“Rapidly Rendering Cells Phagocytic Through a Cell-surface Display Technique and Concurrent Rac Activation”
Science Signaling **2014**, *7*, 334, rs4.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 3件

1.

発明者: 長野 哲雄, 花岡 健二郎, 小松 徹, 木村 勇亮

発明の名称: 酵素活性検出用試薬

出願人: 東京大学

出願日: 2014/2/28

出願番号: 特願 2014-038427

(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〕

さきがけ研究の成果について、日本薬学会年会、日本生化学会大会などの主要な国内学会において9件の招待講演をおこなった他、5件の国際学会発表(うち1件は招待講演)などの成果発信をおこないました。また、研究代表者は、日本薬学会第136年会(2016年)内のシンポジウム「『疾患代謝』から解明される生命現象と創薬研究への応用」においてオーガナイザーを務めました。

〔受賞〕

本さきがけ研究の成果をもって、平成29年度薬学会奨励賞を受賞しました。

〔著作物〕

1. 小松 徹

「表現型アッセイ①: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』

2. 小松 徹

「代謝活性を視る. 標的酵素を探す. - レポーター基質による代謝活性の評価と探索研究のしくみ」
実験医学増刊 Vol.32 No.15 2014 『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』

3. 小松 徹, 浦野 泰照

酵素のはたきを「見る」ケミカルバイオロジー研究
科学のとびら 60 「天然物の化学 - 魅力と展望」

〔プレスリリース〕

細胞に「食べる」機能を付与 ～細胞に新機能を付与する新しい研究ツール～

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140716/index.html>

(論文発表4の業績に対応. 細胞機能領域 井上尊生研究者との共同)