

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－スウェーデン研究交流）

1. 研究課題名：「単一分子レベルの酵素反応解析から癌治療法開発までの複合領域研究」
2. 研究期間：平成23年4月～平成26年3月
3. 支援額： 総額 22,500 千円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	阿部 洋	北海道大学大学院薬学研究院	准教授
研究者	伊藤嘉浩	理化学研究所、伊藤ナノ医工学研究室	主任研究員
研究者	柴田綾	理化学研究所、伊藤ナノ医工学研究室	協力研究員
研究者	実吉尚郎	理化学研究所、伊藤ナノ医工学研究室	協力研究員
研究者	伊藤美香	北海道大学大学院薬学研究院	学生
研究者	阿部奈保子	理化学研究所、伊藤ナノ医工学研究室	研究補助員 (パートタイマー)
参加研究者 のべ 7名			

相手側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	Ralf Morgenstern	カロリンスカ研究所	教授
研究者	Jerker Widengren	スウェーデン王立工科大学	教授
研究者	Jie Zhang	カロリンスカ研究所	博士課程学生
研究者	Volodymyr Chmyrov	カロリンスカ研究所/ スウェーデン王立工科大学	博士課程学生
研究者	Per Thyberg	スウェーデン王立工科大学	主任研究員
研究者	Thiemo Spielmann	スウェーデン王立工科大学	博士課程学生
参加研究者 のべ 8名			

5. 研究・交流の目的

グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)の基質となる新規化合物（蛍光化合物、化学発光化合物、核磁気共鳴プローブ、低分子薬剤）を独自の設計理論に基づいて開発し、高度な蛍光分光技術を用いて一分子レベルの酵素反応メカニズムの解析を行う。さらに、得られた知見を基にプローブを用いた癌診断法への応用や、副作用の少ないプロドラッグ化抗癌剤を開発する。本研究計画では、有機合成から、一分子イメージング、酵素化学、創薬研究まで多岐にわたる学際的な研究テーマを遂行するために、理化学研究所(RIKEN)、カロリンスカ研究所(KI)、スウェーデン王立工科大学(KTH)に所属する研究者が協力して研究を行う。新規分子の設計・合成は、RIKENが担当する。GSTに対する生物活性、速度論解析、

細胞イメージング、癌に対する薬効評価は、KI が担当する。超高感度分光法を用いた一分子計測、一分子酵素解析は、KTH が担当する。共同研究を推進することで、蛍光、化学発光、核磁気共鳴の原理に基づいた新たなバイオ技術や癌などの医療診断技術の開発、さらには、既存の抗癌剤の副作用を軽減し特異性を高めたプロドラッグ設計法を考案することを目指す。

6. 研究・交流の成果

6-1 研究の成果

グルタチオントランスフェラーゼは生体内で解毒機構を担う重要な酵素であるが、薬剤耐性の要因ともなっている。また、癌細胞で高発現することから癌のマーカータンパク質となることが期待される。さらに近年、GST が癌細胞のアポトーシスを抑制していることが明らかになり、GST が重要な創薬標的として認識されるようになった。本研究では、GST を標的とした様々な分子プローブ（蛍光、発光、MRI、プロドラッグ）を作成し、その生体内での役割を明らかにすることを目的とした。日本グループが分子プローブの設計、合成、その物理物性の評価を行い、スウェーデングループが分子プローブの生物評価、プローブを利用した GST の機能解明研究を行うことを目的とした。研究期間内にこれらの目的のもとに得られた研究成果を 4 報の論文として共著で発表したもので以下にまとめる。

(a) GST を細胞内で検出できる蛍光分子プローブの設計原理とその機能評価

GST の触媒メカニズムからアリアルスルフォニル(ArS)基が GST の基質となることを予想した。そこで、ArS 保護基を各種蛍光基質(クマリン、ローダミン、クレシルバイオレット)に導入し、その蛍光性をオフにした化合物を設計し、合成した。これら分子は、GST が存在するとその触媒作用により ArS 基が除去され蛍光シグナルを与えた。各種蛍光プローブの GST のサブタイプとの反応性について検討を行った。その結果、合成したプローブは特に α GST に対し高い反応性を示すことが明らかとなった。また、ジニトロベンゼンスルホニル基(DNs 基)で保護したクレシルバイオレット(DNs-CV)は GST 非存在下と比較してその反応効率が 2.4×10^9 倍に増加することが確認できた。さらに、DNs-CV を細胞内に導入したところ、GST 依存的に蛍光シグナルを与えることが明らかとなり、GST を生細胞内でイメージングできるプローブとして利用できることが明らかとなった。

Jie Zhang, Aya Shibata, Mika Ito, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Bengt Mannervik, Hiroshi Abe, Ralf Morgenstern

Synthesis and characterization of a series of highly fluorogenic substrates for glutathione transferases, a general strategy.

Journal of the American Chemical Society, 133(35), 14109-14119, (2011).

(b) GST を検出できる生物発光プローブと MRI プローブの設計原理とその機能評価

GST 活性に基づいて発光する生物発光プローブと、GST 活性を検出できる MRI プローブの合成を行った。生物発光プローブの合成は以下のように行った。不安定なアダマンタン-ジオキセタン誘導体(Ad)に、アリアルスルフォニル基(ANs)を導入することで安定化された誘導体(ANs-Ad)に変換できた。得られた ANs-Ad を GST・GSH で処理したところ、ANs 基は除去され Ad に変換され発光した。その結果、ANs-Ad は、GST に依存して発光する生物発光プローブであることが明らかとなった。本プローブを用いて、これまでの蛍光とは異なり発光に基づいて GST を検出できる。

一方、生体内部の深い領域を観察するためには、蛍光プローブや、発光プローブは不向きであるといえる。そこで、GST 活性由来の MRI シグナルを観測できるプローブの開発を計画した。19F 核は生体内にほとんど存在しないことから、19F MRI 法は、その低いバックグラウンドのために、19F 標識プローブを高感度で検出できる。これまでに 19F MRI を用いた

プローブがいくつか報告されているが、GST を標的とした 19F MRI プローブは報告されていない。7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン (AFC) のアミノ基にアリルスルフォニル基 (ANs) を導入することで、GST の基質となる 19F MRI プローブを設計した。このプローブは、GST によって触媒された GSH の芳香族求核置換反応により、ANs 基が除去され、AFC を生成すると考えられる。19F ケミカルシフト値は、ANs 基の除去により移動し、その移動値によって生体内 GST の検出が可能であると考えられる。実際に合成した ANs-AFC を用いて、GST 触媒下で核磁気共鳴シグナルを観測したところ、GST の触媒活性依存的にシグナルを発生することを確認できた。

Mika Ito, Aya Shibata, Jie Zhang, Michio Hiroshima, Yasushi Sako, Yukiko Nakano, Kyoko Kojima-Aikawa, Bengt Mannervik, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Ralf Morgenstern, Hiroshi Abe

Universal Caging Group for In Cell Detection of Glutathione Transferase Applied to 19F NMR and Bioluminescent Probes
ChemBioChem 13 (10) 1428-1432, (2012)

(c) GST 活性に基づいて活性化されるプロドラッグの開発

抗がん剤として知られるドキソルビシン (DOX) は、毒性が高いことで知られる。そこで、癌細胞で高発現している GST 依存的に活性化される DOX のプロドラッグの開発を試みた。DOX は DNA に結合して活性を発揮するが、その際に構造に含まれるアミノ基が重要な役割を果たしている。そこで、DOX のアミノ基に DN_s 基を導入すること (DN_s-DOX) でその機能を阻害できると考えた。DN_s-DOX の DN_s 基は GST により除去されるので、free の DOX となり薬効を示す。そこで DN_s-DOX の薬効を、GST 低発現細胞と GST 高発現細胞で評価したところ、GST 高発現細胞でその毒性が高いことが明らかとなった。その他、GST 阻害剤などを用いた実験から、DN_s-DOX は、GST 依存的に毒性を示すことが明らかとなった。

Katarina Johansson, Mika Ito, Carolien M. S. Schophuizen, Sherin Mathew T, Vanina D. Heuser, Jie Zhang, Miyuki Shimoji, Marie Vahter, Wee Han Ang, Paul J. Dyson, Aya Shibata, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe, Ralf Morgenstern

Characterization of New Potential Anticancer Drugs Designed To Overcome Glutathione Transferase Mediated Resistance

Molecular Pharmaceutics., 8(5), 1698-1708, (2011).

(d) GST 検出プローブのサブタイプの詳細な解析

蛍光プローブの GST サブタイプ特異性を構造とその反応活性の観点から解析した。ミカエリスメンテン式による酵素解析の結果、蛍光化合物の発色団構造は GST に対する親和性 (K_m) に重要であること、ArS 基は反応活性 (k_{cat}) に重要であることが明らかとなった。特に、DN_s で保護したクレシルバイオレット (DN_s-CV) は、α GST に対して他のサブタイプの 10 倍から 100 倍の活性を示したことから α GST に対して有用なプローブであるといえる。DN_s-CV を用いて、乳がん細胞内の GST イメージングに成功した。

Aya Shibata, Yukiko Nakano, Mika Ito, Mika Araki, Jie Zhang, Yasuhiko Yoshida, Satoshi Shuto, Bengt Mannervik, Ralf Mogenstern, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe

Fluorogenic probes using 4-substituted-2-nitrobenzenesulfonyl derivatives as caging groups for the analysis of human glutathione transferase catalyzed reactions

Analyst, 138, 7326-7330 (2013).

6-2 人的交流の成果

2011年度に日本グループの博士課程学生がスウェーデンに滞在し研究を行った。日本側の研究代表者は、スウェーデンを訪問し、研究発表及び研究打ち合わせを行った。また、スウェーデンで他の研究者の紹介を受け、共同研究を新たに始めた。2013年度にはスウェーデングループの研究代表者が日本を訪問し研究発表・研究打ち合わせを行った。スウェーデングループは GST 研究を専門としており今後も継続予定である。一方、日本グループでは、本研究交流の結果、GST 関連研究が今後継続していくべき重要な研究テーマとなった。今後も、スウェーデングループが生物学的評価、日本グループが分子設計・合成・物性評価の役割分担で継続的に研究を進めていく予定である。2014年度も、日本グループの代表が研究打ち合わせ・講演を目的にスウェーデンを訪問予定である。

7. 主な論文発表・特許等（5件以内）

相手側との共著論文については、その旨を備考欄にご記載ください。

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、出願番号、出願人、発明者等	備考
論文	Jie Zhang, Aya Shibata, Mika Ito, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Bengt Mannervik, Hiroshi Abe, and Ralf Morgenstern Synthesis and characterization of a series of highly fluorogenic substrates for glutathione transferases, a general strategy <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 133(35), 14109-14119, (2011)	
論文	Katarina Johansson, Mika Ito, Carolien M. S. Schophuizen, Sherin Mathew T, Vanina D. Heuser, Jie Zhang, Miyuki Shimoji, Marie Vahter, Wee Han Ang, Paul J. Dyson, Aya Shibata, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe, Ralf Morgenstern Characterization of New Potential Anticancer Drugs Designed To Overcome Glutathione Transferase Mediated Resistance <i>Molecular Pharmaceutics.</i> , 8(5), 1698-1708, (2011).	
論文	Mika Ito, Aya Shibata, Jie Zhang, Michio Hiroshima, Yasushi Sako, Yukiko Nakano, Kyoko Kojima-Aikawa, Bengt Mannervik, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Ralf Morgenstern, Hiroshi Abe Universal Caging Group for In Cell Detection of Glutathione Transferase Applied to 19F NMR and Bioluminogenic Probes <i>ChemBioChem</i> 13 (10) 1428-1432, (2012)	
論文	Aya Shibata, Yukiko Nakano, Mika Ito, Mika Araki, Jie Zhang, Yasuhiko Yoshida, Satoshi Shuto, Bengt Mannervik, Ralf Mogenstern, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Fluorogenic probes using 4-substituted-2-nitrobenzenesulfonyl derivatives as caging groups for the analysis of human glutathione transferase catalyzed reactions <i>Analyst</i> , 138, 7326-7330 (2013).	
特許	チオール検出法、阿部洋、伊藤嘉浩、柴田綾、伊藤美香、登録番号US 8187825, PCT/JP2009/51579	