

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30年度

受付番号 201860553

氏名

大島潤

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: バークレー (国名: アメリカ)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

メチオニン選択的反応を利用した抗体-医薬複合体合成法の開発3. 派遣期間: 平成 30年 5月 9日 ~ 令和 2年 5月 8日

4. 受入機関名及び部局名

カリフォルニア大学バークレー校5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

2018年5月よりタンパク質の修飾反応と抗体を用いた生体内でのカルシウムおよび銅の検出法の開発に取り組んだ。二年前に提案した研究計画、メチオニン選択的反応を用いた抗体医薬品複合体の合成法の開発は協議の結果、2017年に Science 誌に投稿した研究<sup>[1]</sup>の共同研究者が行うことになり、最近その研究結果が米国科学アカデミー紀要に報告されている。<sup>[2]</sup>そこで Chang 研究室では、タンパク質の修飾反応と抗体を利用した生体内での金属の検出方法の開発に焦点を当てることにした。

(1) 「オキサジリジンとチオエーテルとの反応による細胞内 Ca イメージング」<sup>[3]</sup>

カルシウム (Ca) 濃度を可視化するイメージング法は細胞の活性状態を理解するために必要な技術となった。しかし、現在用いられている Ca イメージング法は配位力のあるセンサーの導入が不可欠であり、細胞本来の Ca 濃度に影響を与えることが知られている (Ca buffering)。

本研究では、細胞に内在する Ca 結合タンパク質であるカルモジュリン (CaM) の化学的修飾反応を利用した Ca イメージング法を開発した (図 1a)。CaM 中のメチオニン (チオエーテル) の反応性が Ca 存在下で向上することを利用し、チオエーテル選択的試薬であるオキサジリジン (Ox4)<sup>[1]</sup>

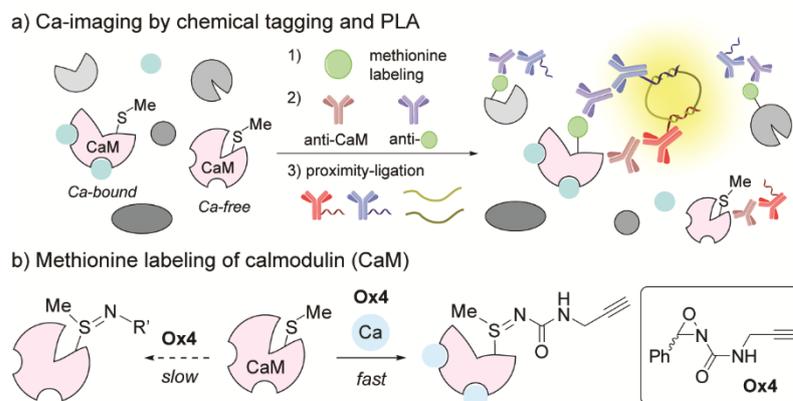


図 1、オキサジリジンと近接ライゲーションアッセイ (PLA) を用いた生体内の Ca (II)イオンの選択的検出法 (a) 開発したアッセイの模式図。(b) カルシウムの有無によるカルモジュリン (CaM) とオキサジリジン試薬 (右、構造式) の反応性の違いを表した図。

が Ca 濃度が高い時に CaM をより効率的に修飾することを見出した (図 1b)。この反応性の向上はカルシウムの結合による CaM の構造変化に伴うものである (図 2a)。この現象は修飾されたカルモジュリンの蛍光ゲル分析および質量分析によって明らかにした (図 2b, c)。

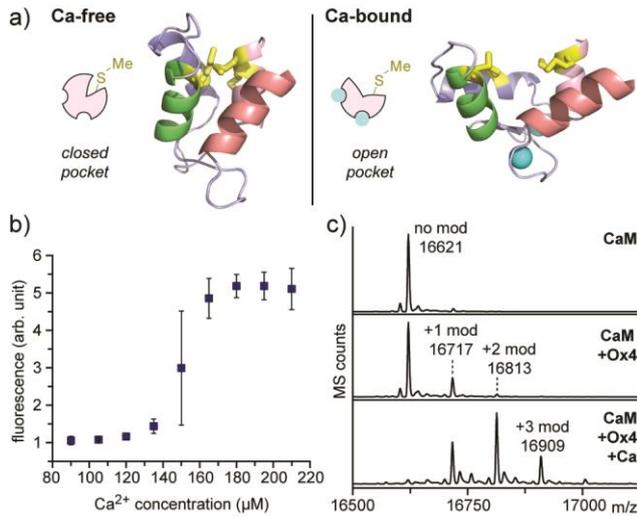


図 2、Ca イオンによるカルモジュリン (CaM) の構造変化およびオキサジリジン (Ox4) への反応性の向上。(a) CaM の結晶構造。(b) Ca の濃度上昇に伴う CaM の Ox4 に対する反応性の向上を表したプロット図。(c) ESI-MS による CaM と Ox4 との反応の分析。

さらに抗体と DNA ハイブリダイゼーションを用いる近接ライゲーションアッセイ (PLA) により、オキサジリジンによって修飾された CaM のみを細胞中で可視化させることができ、様々な細胞株および *in vivo* での Ca イメージングに応用できることが明らかとなった (図 3)。カルシウムの上昇または減少を引き起こすことが知られている試薬で処理された胎児腎細胞 (イオノマイシンまたは BAPTA-AM)、免疫細胞 (コンカナバリン A)、および神経細胞 (塩化カリウムまたはテトロドトキシン) において予期通りの蛍光強度の増減が観測され、開発された方法がこれらの細胞株において適用可能であることを示した (図 3a-d)。またカルシウム濃度および分布の変化をゼブラフィッシュにおいても可視化することに成功した (図 3e, f)。

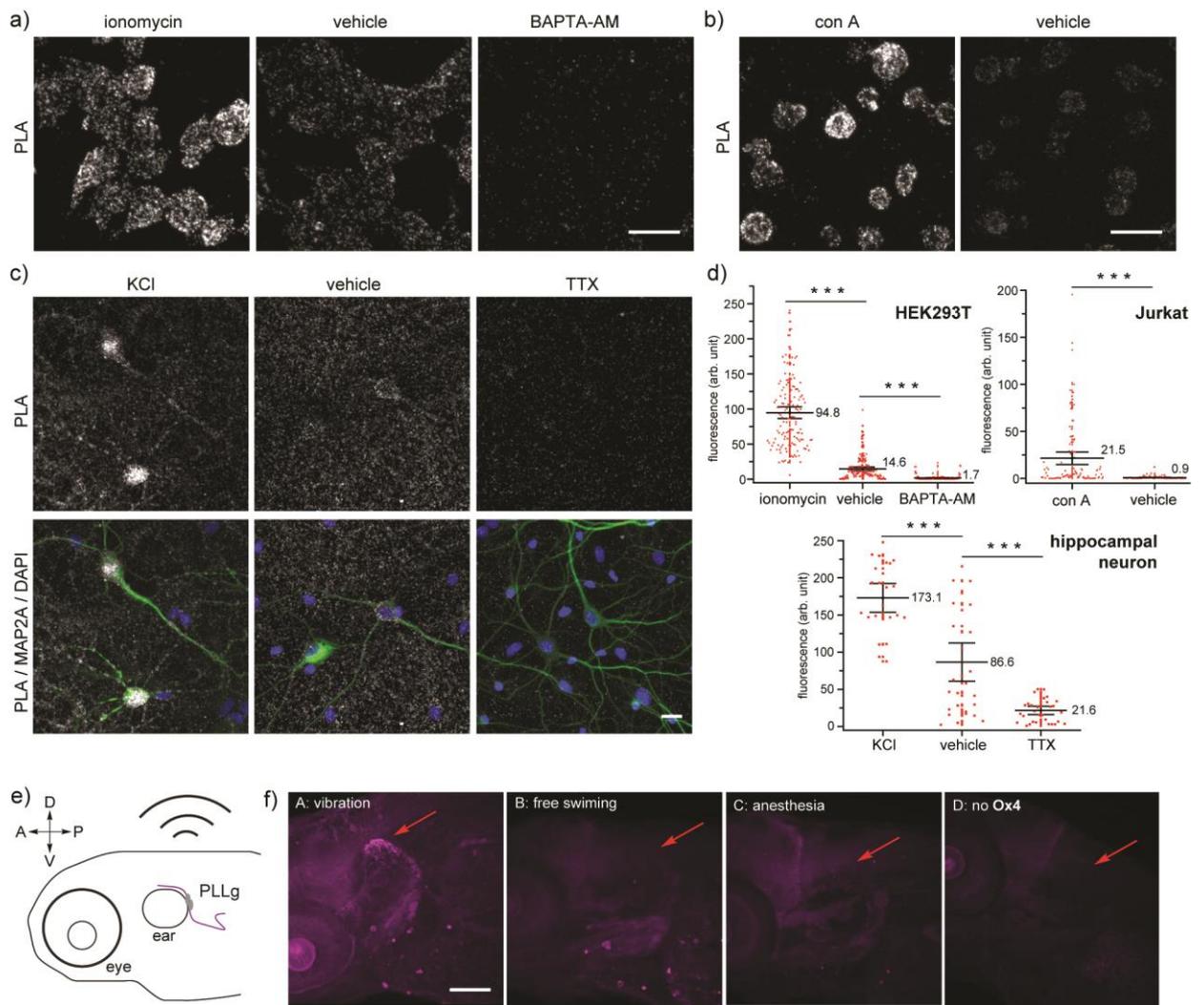


図 3、オキサジリジン (**Ox4**) と近接ライゲーシオンアッセイ (PLA) を用いた生体内の Ca(II)イオンの選択的検出法。PLA による蛍光は白色で示した。Vehicle: DMSO コントロール。(a) イオノマイシンまたは Ca キレーター、BAPTA-AM 存在下でのヒト胎児腎細胞 (HEK293T) の Ca イメージング。(b) コンカナバリン A (con A) 存在下でのジャーカット細胞の Ca イメージング。(c) 塩化カリウム (KCl) またはテトロドトキシン (TTX) 存在下でのラット海馬の培養神経細胞の Ca イメージング。ニューロンおよび細胞核は抗 MAP2A 抗体および DAPI により染色した。(d) 図 3a,b,c の個々の細胞の蛍光強度を定量化したプロット図。(e) ゼブラフィッシュ頭部の模式図。PLLg: posterior lateralis ganglion。(f) 物理的な振動またはトリカイン存在下でのゼブラフィッシュの Ca イメージング。

この Ca イメージングの一連の研究結果は今年 ACS Central Science 誌に報告し、<sup>[3]</sup>研究タイトルが冊子の表紙にも掲載された (<https://pubs.acs.org/toc/acscii/6/1#>)。また山口大学における IoL コロキウム特別講演会 (<http://yulifemol.chem.yamaguchi-u.ac.jp/20191220/>) および 3 つの大学においてこの研究の発表を行った。今後付加用務として、この固定した細胞および生体組織のイメージング法を溶液中で行うための研究を遂行する予定である。

(2) 細胞および生体組織の固定化プロセスと併用可能な生体内銅イオン検出法の開発

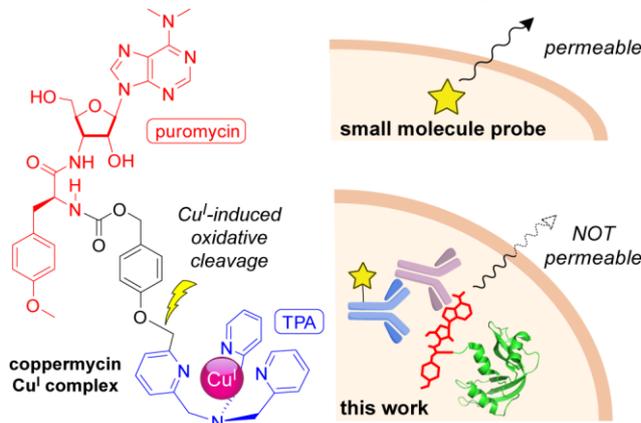


図4、研究の概要図

銅は生体活動に必須な金属イオンであり、セルロプラスミンやスーパーオキシドディスムターゼなどのタンパク質の補酵素として重要な役割を果たしている。一方で、細胞および組織内における銅の代謝異常はパーキンソン病、ウィルソン病などの深刻な健康被害をもたらすことが知られている。

生体内での銅の挙動を理解するためにこれまでに様々な方法が開発されてきた。誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) は試料中の銅を検出する定量分析法として非常に便利であるが、破壊分析であり、かつ生体内における銅の時間変化に伴う局在化に関する情報を得ることはできない。銅選択的な化学発光プローブは

これらの問題点に言及するアプローチであり、Chang 研究室は十年以上にわたり生体内の銅の研究に携わってきた。しかし細胞または生体組織のホルマリンなどによる固定化プロセスと併用可能な蛍光プローブは報告例がなく、銅の検出と免疫染色法を同時に行うことは現在の手法では難しい。また動物実験に用いることのできる近赤外蛍光プローブ<sup>[4]</sup>およびルシフェリンに由来する発光プローブ<sup>[5]</sup>が過去に報告されているが、化学合成が困難である、またはルシフェラーゼの発現が不可欠であるといった問題点があった。

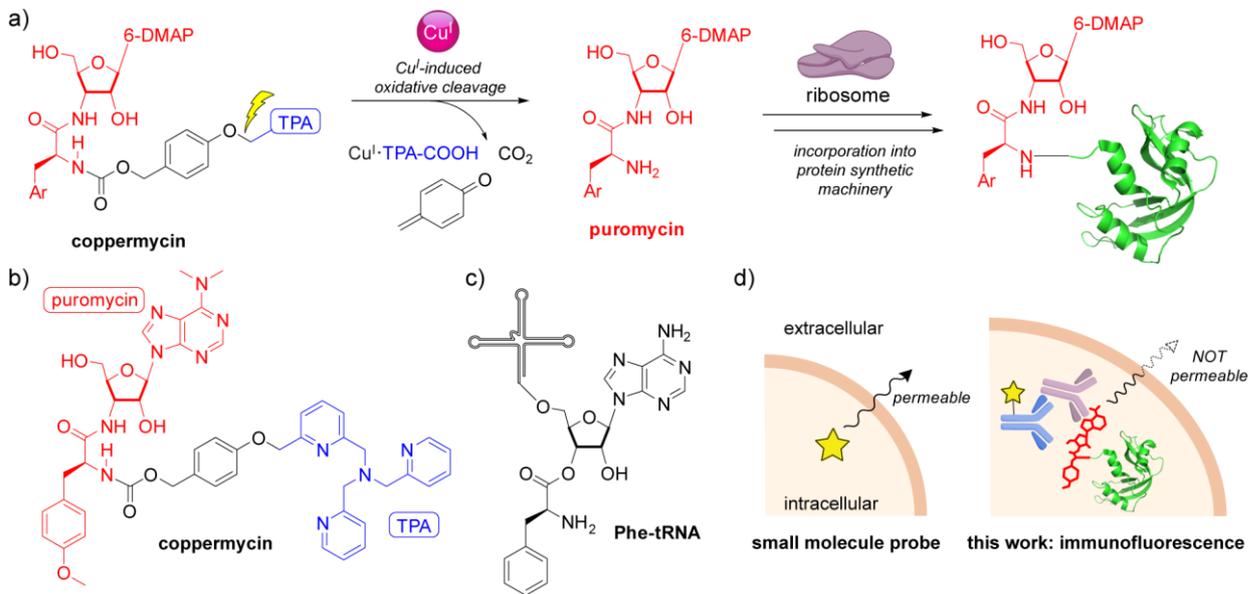


図5、カプマイシンを用いた生体内の銅 (I) の選択的検出法 (a) 反応の模式図 (b) カプマイシンの化学構造 (c) フェニルアラニン-tRNA の化学構造 (d) 従来の蛍光プローブとピューロマイシンプローブの比較図

本研究ではタンパク質合成を阻害するピューロマイシンを銅配位性の置換基で保護した銅 (I) プローブ、カプマイシン (Coppermycin) を合成し、細胞およびマウス組織における性質評価を行った (図4,5)。Chang 研究室ではこれまでにピューロマイシンと呼ばれるタンパク質修飾を伴う抗生物質を用いた化学プローブの開発を行ってきた。<sup>[6,7]</sup>リボソームにおけるタンパク質合成の過程で、ピューロマイシンが基質として認識されることでタンパク質合成を阻害することが知られている (図5b,c、ピューロマイシンと Phe-tRNA の構造類似)。本研究ではそのタンパク質合成阻害に必須であるピューロマイシンの一級アミンを、銅 (I) 選択的キレーター (TPA) でケージすることでタンパク質修飾を伴う銅 (I) センサーとして機能することを期待し研究を進めた。細胞内のタンパク質に導入されたピューロマイシンは固定化プロセス後に免疫染色法によって検出することができ、細胞だけでなく生体組織に応用できる。

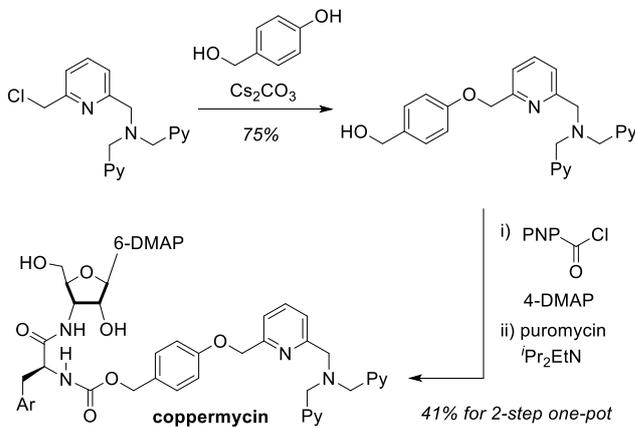


図 6、カパマイシンの合成スキーム。DMAP: dimethylaminopyridine, PNP: para-nitrophenoxyl

カパマイシンの合成は過去に報告されているベンジルクロリド基を有した TPA<sup>[8]</sup>のアルキル化より行った (図 6)。炭酸セシウム存在下 50 度で一晩加熱することでアルキル化が進行し、アルミナカラムクロマトグラフィーによる精製を経てベンジルアルコール中間体を得た。その後、アシル化反応およびピューロマイシンとのカーバメート合成反応をワンポットで行い、アルミナカラムクロマトグラフィーによる精製を通してカパマイシンを単離収率 41%で得ることに成功した。

合成したカパマイシンの *in vitro* での性能を確認するため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて評価を行った (図 7)。その結果、一価の銅およびグルタチオン存在下でカパマイシンがピューロマイシンを

生成することがわかった (図 7a)。反応の初期段階である TPA による銅への配位および酸化的開裂反応は反応開始後 15 分で終了し、キノンメチド放出前の中間体 (puro-phenol) の分解に約 4 時間を要することがわかった。この酸化的開裂反応およびピューロマイシンの放出は他の金属イオンでは進行せず (図 7b)、過剰量のキレーター存在下で銅 (I) の反応が抑制されることから (図 7c)、この過程が銅 (I) 選択的に配位を伴って進行していることが示唆された。

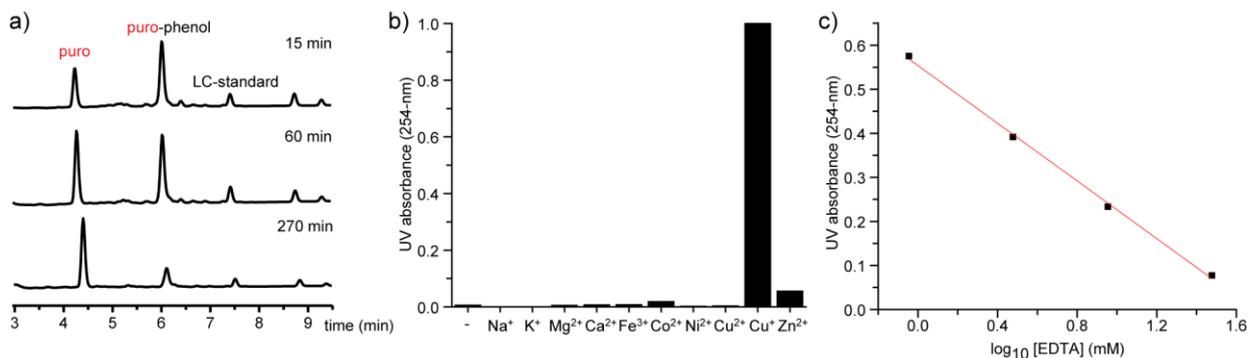


図 7、HPLC を用いたカパマイシンの *in vitro* での性質評価。反応条件：カパマイシン (0.3 mM)、 $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4][\text{PF}_6]$  (0.3 mM)、還元型グルタチオン (5 mM)、酢酸アンモニア緩衝液中、室温。(a) 反応時間毎のクロマトグラム図 (b) HPLC を用いた金属選択性を示す棒グラフ (c) ピューロマイシンの発生量とキレーター濃度の相関を表した図

カパマイシンが免疫染色法を用いることで細胞中の銅濃度の検知に利用できることもわかった (図 8)。細胞内で銅との反応により発生およびリボソームを介してタンパク質に導入されたピューロマイシンの感知には、一次抗体としてマウス由来の抗ピューロマイシン抗体と二次抗体として抗マウス抗体-Alexa488 共役体を利用した。カパマイシンが細胞中の銅の絶対量の変化を検出できるかを知るために、過去に報告された ATP7a および CTR1 遺伝子ノックアウト細胞を用いた。<sup>[9]</sup>ATP7a は細胞中に存在する銅のエクスポーターであり、CTR1 はそれに対して銅を取り込むインポーターとして知られている。銅の排出に用いられる ATP7a を有さない細胞中では銅の量が上昇することが過去に示されている。ワイルドタイプと ATP7a ノックアウトの MEF7 細胞の比較実験において、これらの細胞にカパマイシンを 4 時間作用させた後、ホルムアルデヒドにより固定化し、抗ピューロマイシン抗体による免疫染色を行った。その結果、既存の報告と同様に、ATP7a ノックアウト細胞においてワイルドタイプより高い二次抗体由来の蛍光が検出され、ピューロマイシンの比較的高い導入、すなわち銅の濃度が高いことが示唆された。一方で、ATP7a ノックアウト細胞と同様の実験によって、CTR1 ノックアウト細胞がワイルドタイプに比べて低い蛍光強度が検出され、カパマイシンが銅の検出に成功していることが示された。

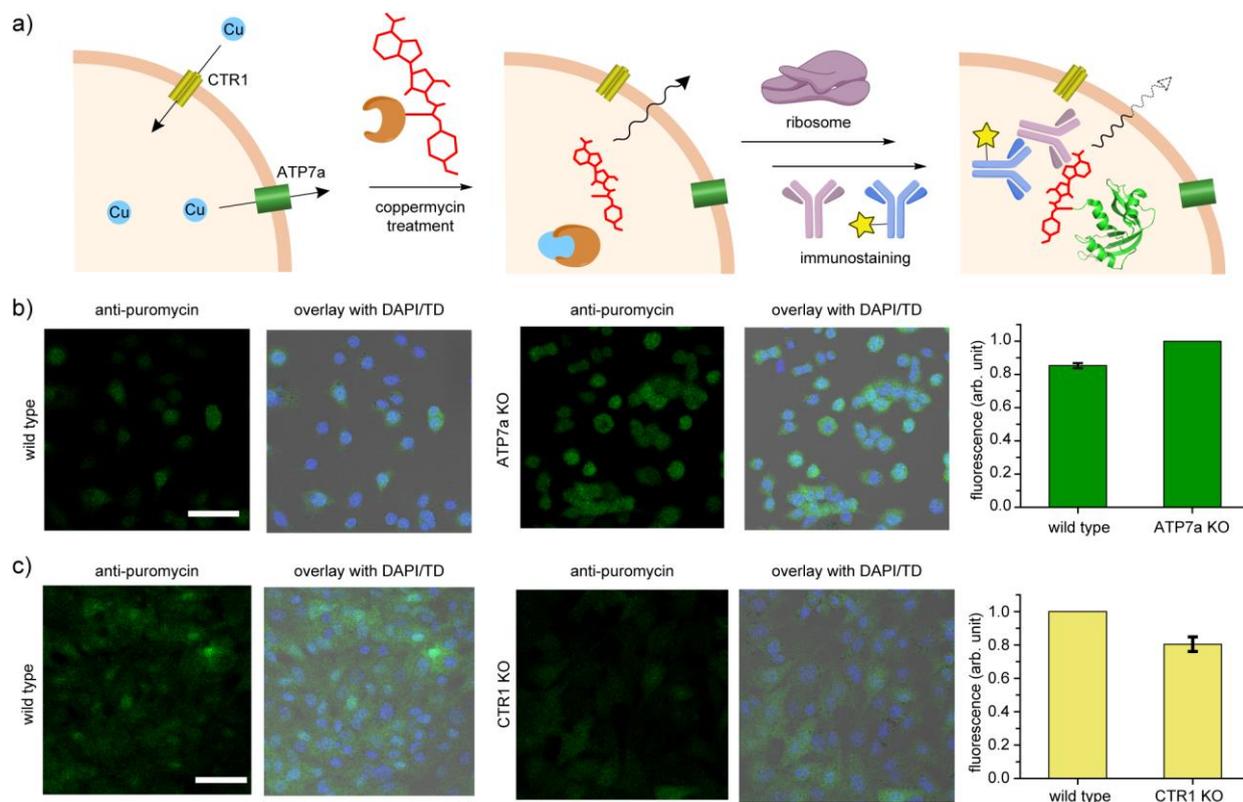


図 8、ノックアウト細胞を用いたカパマイシンの性質評価。反応条件：カパマイシン (3 μM)、37 度、4 時間。(a) 細胞の銅の流れとトランスポーターを表した図 (b) MEF7 ワイルドタイプ (左)、ATP7a (銅エクスポーター) ノックアウト細胞 (中央) の免疫染色図。右：左と中央の細胞図を定量化した棒グラフ。(c) MEF7 ワイルドタイプ (左)、CTR1 (銅インポーター) ノックアウト細胞 (中央) の免疫染色図。右：左と中央の細胞図を定量化した棒グラフ。スケールバー：50 μm、エラーバー：三回の実験データの標準偏差

このカパマイシンの研究に関して、2019 年 3 月に四つの大学および日本化学会春季年会において講演をおこなった。今後、付加用務として論文投稿の準備を継続する予定である。

#### [引用文献]

- [1] S. Lin, X. Yang, S. Jia, A. M. Weeks, M. Hornsby, P. S. Lee, R. V. Nichiporuk, A. T. Iavarone, J. A. Wells, F. D. Toste, et al., *Science* **2017**, *355*, 597-602.
- [2] S. K. Elledge, H. L. Tran, A. H. Christian, V. Steri, B. Hann, F. D. Toste, C. J. Chang, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 5733-5740.
- [3] J. Ohata, L. Krishnamoorthy, M. A. Gonzalez, T. Xiao, D. A. Iovan, F. D. Toste, E. W. Miller, C. J. Chang, *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 32-40.
- [4] T. Hirayama, G. C. Van de Bittner, L. W. Gray, S. Lutsenko, C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 2228-2233.
- [5] M. C. Heffern, H. M. Park, H. Y. Au-Yeung, G. C. V. de Bittner, C. M. Ackerman, A. Stahl, C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 14219-14224.
- [6] B. Spangler, C. W. Morgan, S. D. Fontaine, M. N. Vander Wal, C. J. Chang, J. A. Wells, A. R. Renslo, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 680-685.
- [7] C. Yik-Sham Chung, G. A. Timblin, K. Saijo, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 6109-6121.
- [8] S. J. A. Pope, R. H. Laye, *Dalton Trans.* **2006**, *0*, 3108-3113.
- [9] S. Jia, K. M. Ramos-Torres, S. Kolemen, C. M. Ackerman, C. J. Chang, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1844-1852.