

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」研究領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 生理活性代謝物と標的タンパク質同定のための基盤技術の創出
(英語) Development of Basic Technology for Identification of Bioactive Metabolites and Target Proteins

研究開発担当者 (日本語) 袖岡幹子 袖岡有機合成化学研究室 主任研究員
所属 役職 氏名： (英語) Mikiko Sodeoka, Synthetic Organic Chemistry Laboratory,
Chief Scientist

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 生理活性代謝物と標的タンパク質同定のための基盤技術の創出
開発課題名： (英語) Development of Basic Technology for Identification of Bioactive Metabolites and Target Proteins

研究開発分担者 (日本語) 袖岡幹子 袖岡有機合成化学研究室 主任研究員
所属 役職 氏名： (英語) Mikiko Sodeoka, Synthetic Organic Chemistry Laboratory,
Chief Scientist

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

本研究開発課題では生理活性化合物が標的とするタンパク質やその結合部位を同定し、さらに新規代謝物を同定する、ケミカルバイオロジー研究の基盤技術となる新しいスクリーニング法の開発を行う事をめざして研究を行った。研究グループの分担としては、袖岡グループは独自の生物活性化合物の開発を行いながら、これを用いてスクリーニングの検討を行い、

藤田グループはそのスクリーニングの検討結果に基づいて、より効率的なスクリーニング装置の開発を進めた。

本年度は、生物活性化合物の標的タンパク質結合部位を同定するための技術として、Alkyne-Tag Raman Screening (ATRaS) 法の開発に成功した (*J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 13901-13910)。生物活性化合物の結合部位を同定する際には、化合物で標的タンパク質を標識し、これを酵素消化でペプチド断片へとしたのちに、LC-MS/MS で化合物が標識したペプチドを同定する手法がしばしば用いられる。しかしながら、大量の未修飾ペプチドが存在するため、これが MS での修飾ペプチド検出を妨げることが問題となっている。そこで我々は、アルキンタグを生物活性化合物に導入し、ラマン分光法でアルキンタグを検出することで標識ペプチドを効率的に見出す ATRaS 法を考案し、その検討を行った。まずプロテアーゼの一種である cathepsin B をモデルタンパク質として選び、共有結合型阻害剤 Z-FG-AOMK の結合部位同定を最終目標として種々検討を行った。袖岡グループでは Z-FG-AOMK へのアルキンタグ導入および cathepsin B の標識化条件、さらには LC-MS/MS による解析条件を検討した。藤田グループでは標識ペプチドに含まれるアルキンタグを検出するためのラマン分光法を種々検討し、Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) を利用することで、アルキンのラマン検出感度をこれまでの 100 万倍以上増強できることを見出した。両グループの検討結果を組み合わせることで、最終的に ATRaS 法の最適化に成功し、目標とした Z-FG-AOMK の Cathepsin B 結合部位の同定を達成した。

袖岡グループでは ATRaS 法の効率化を狙い、アルキンタグで標識された分子を効率よく濃縮する手法の開発も進め、あらたな精製手法の概念実証に成功した。さらに、化合物で蛋白質を標識する際に用いる光標識官能基の開発も進め、新たな標識官能基を見出すことにも成功した。また、脂質代謝物の解析を目指し、昨年度に引き続き内因性の脂質分子をプローブ化し、これが細胞内で内因性の脂質分子と同様の代謝を受けることも見出した。

藤田グループでは ATRaS 法の汎用性を向上するためにより高速な装置の開発を昨年度に引き続き進めると共に、研究感度の向上のための新たな試料導入技術の開発もおこなった。今後はこれらを統合させ、本手法の適用範囲を拡大すると共に、実用化を目指したシステム構築を目指す。

英文

This research project focuses on the development of novel screening systems to identify target proteins and binding sites of bioactive compounds or metabolites of endogenous molecules, which could contribute to chemical biology research. Sodeoka group developed original chemical probes and investigated the screening conditions. Fujita group constructed the screening apparatus and improved screening efficiency based on the results of Sodeoka group.

In this fiscal year, we succeeded in developing a novel screening system named Alkyne-Tag Raman Screening (ATRaS), which can determine the binding sites of bioactive compounds (*J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 13901-13910). In general, to determine binding sites, target proteins are labeled with bioactive compounds and digested into peptide mixture, and then labeled peptides are identified by LC-MS/MS analysis. However, large amounts of unmodified peptides often disturb the detection of labeled peptides by mass analysis. To overcome this problem, we created ATRaS, in which alkyne-tagged probes are used to label target proteins and labeled peptides are detected by quantitative Raman analysis. To develop the ATRaS system, we selected cathepsin B, one of the lysosomal proteases, as a model protein and its covalent inhibitor Z-FG-AOMK. To identify the binding site, Sodeoka group synthesized alkyne-tagged derivatives of Z-FG-AOMK and investigated the conditions to label cathepsin B with the alkyne-tagged inhibitor and analyze the peptides by LC-MS/MS. Fujita group examined the detection conditions using Raman spectroscopy and found that Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) improved the detection limit by over 1 million times. By combining the results of the two groups, we finally succeeded in identifying the binding site of Z-FG-AOMK with the ATRaS system.

To improve the efficiency of ATRaS system, Sodeoka group developed a novel method to purify alkyne-tagged molecules. Moreover, Sodeoka group developed a novel functional group for photoaffinity labeling, which can label target proteins of bioactive compounds. In addition, several lipid probes were designed, synthesized, and found to be metabolized in a similar manner to endogenous lipids, indicating the potential usage of these probes for metabolism studies.

Fujita group improved the screening speed of the ATRaS system. The sample preparation methods have also been investigated to improve the sensitivity of Raman tag detection for the practical application of the ATRaS technique.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 7 件）

1. 安藤潤, 袖岡幹子, 藤田克昌. ラマン散乱を利用した細胞分子イメージング. 日本分子イメージング学会機関誌. 2016, 9, 3-11.
2. OTA E, MIKAME Y, HIRAI G, NISHIYAMA S, SODEOKA M. Photochemical and Additive-free Coupling Reaction of α -Cumyl α -Ketoesters via Intermolecular C-H Bond Activation. *Synlett*. 2016, 27, 1128-1132.
3. ANDO J, PALONPON AF, SODEOKA M, FUJITA K. High-speed Raman imaging of cellular processes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2016, 33, 16-24.
4. ANDO J, ASANUMA M, DODO K, YAMAKOSHI H, KAWATA S, FUJITA K, SODEOKA M. Alkyne-Tag SERS Screening and Identification of Small-Molecule-Binding Sites in Protein. *Journal of the American Chemical Society*. 2016, 138, 13901-13910.
5. OHYOSHI T, TAMURA Y, HAYAKAWA I, HIRAI G, MIYAZAWA Y, FUNAKUBO S, SODEOKA M, KIGOSHI H. Total synthesis of natural derivatives and artificial analogs of 13-oxyingenol and their biological evaluation. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2016, 14, 11426-11437.
6. HIKONE Y, HIRAI G, MISHIMA M, IMOMATA K, IKEYA T, ARAI S, SHIRAKAWA M, SODEOKA M, Ito Y. A new carbamidemethyl-linked lanthanoid chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells. *Journal of Biomolecular NMR*. 2016, 66, 99-110.
7. MORITA M, KOJIMA S, OHKUBO M, KOSHINO H, HASHIZUME D, HIRAI G, MARUOKA K, SODEOKA M. Synthesis of the Right-Side Structure of Type B Physalins. *Israel Journal Chemistry*. 2016, 57, 309-318.
8. ANDO J, SEKIYA T, KA D, YAMAKOSHI H, DODO K, SODEOKA M, KAWATA S, FUJITA K. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging of alkyne-tagged small molecule drug in live cells with endocytosed gold nanoparticles. *Proc. SPIE*. 2017, 10046, 1004606.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Alkyne-tag Raman Imaging, 招待講演, SODEOKA M, 5th Annual Symposium of RIKEN 5th-MaxPlanck Joint Research Center, Berlin, Germany, 2016/04/19, 国外.
2. 生命機能解明をめざしたプローブ分子の創製, 招待講演, 袖岡幹子, 第 26 回万有福岡シンポジウム, 福岡, 2016/04/23, 国内.
3. 代謝安定型ガングリオシドの合成と生物活性, 招待講演, 袖岡幹子, 第 17 回関西グライコサイエンスフォーラム, 大阪, 2016/05/14, 国内.
4. Norrish-type II 反応を起こさない α -ケトアミドおよび α -ケトエステルの光反応, 口頭, 太田英介, 三瓶悠, 平井剛, 越野広雪, 長澤和夫, 西山繁, 袖岡幹子, 第 109 回有機合成シンポジウム, 東京, 2016/06/08-09, 国内.

5. 天然物を超える生物活性分子をめざして, 招待講演, 袖岡幹子, 第 51 回天然物化学談話会, 越後湯沢, 2016/07/08, 国内.
6. 有機合成化学から生命科学へのアプローチ, 招待講演, 袖岡幹子, 第 25 回千葉大学大学院薬学研究院 薬友会生涯教育セミナー, 千葉, 2016/07/09, 国内.
7. Rapid SERS imaging of biomolecules using slit-scanning Raman microscopy, 口頭, ANDO J, BANDO K, MOCHIZUKI K, DODO K, YAMAKOSHI H, FUJITA K, SODEOKA M, KAWATA S, The 14th International Conference on Near-field Optics, Nanophotonics, and Related Techniques (NFO-14), Hamamatsu, 2016/09/06, 国内.
8. 生命機能解明をめざしたプローブ分子の創製, 招待講演, 袖岡幹子, 第 33 回有機合成化学セミナー, 北海道, 2016/09/08, 国内.
9. シアリダーゼの機能解析を志向した 3 位修飾型シアル酸誘導体の合成と活性評価, 口頭, 深澤亮, 平井剛, 加藤麻理依, 大沼可奈, 越野広雪, 袖岡幹子, 第 58 回天然有機化合物討論会, 仙台, 2016/09/14-16, 国内.
10. SERS imaging of alkyne-tagged small molecule in cells with gold nanoparticles, 口頭, ANDO J, SEKIYA T, KA D, YAMAKOSHI H, DODO K, SODEOKA M, KAWATA S, FUJITA K, OSJ-OSA Joint Symposia on Plasmonics and Optics, Tokyo, 2016/10/31, 国内.
11. ABA 受容体アンタゴニスト RK460 の全立体異性体合成と活性評価, ポスター, 三瓶悠, 由田和津子, 平井剛, 長澤和夫, 長田裕之, 袖岡幹子, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 東京, 2016/11/14-16, 国内.
12. がん細胞選択的な細胞死誘導活性を有する γ -リノレン酸の機能性誘導体の創製, ポスター, 福島翔, 平井剛, 佐藤綾人, 田村結城, 閻闡孝介, 袖岡幹子, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 東京, 2016/11/14-16, 国内.
13. Click 反応によって連結可能な In-cell NMR 用常磁性金属イオンタグの開発, ポスター, 名取文彦, 彦根佑哉, 平井剛, 三島正規, 伊藤隆, 袖岡幹子, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 東京, 2016/11/14-16, 国内.
14. Turn-On 蛍光アフィニティーラベル化法, 招待講演, 袖岡幹子, 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016/12/01, 国内.
15. Alkyne-Tag Raman Screening, 招待講演, SODEOKA M, Asian Chemical Biology Initiative 2017 Ho Chi Minh Meeting, Ho Chi Minh, Vietnam, 2017/01/21, 国外.
16. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging of alkyne-tagged small molecule drug in live cells with endocytosed gold nanoparticles, 口頭, ANDO J, SEKIYA T, KA D, YAMAKOSHI H, DODO K, SODEOKA M, KAWATA S, FUJITA K, San Francisco, USA, SPIE Photonics West 2017, 2017/01/28, 国外.
17. Development of the Disaccharide-Type Activity-Based Probe for Sialidase, 口頭, 深澤亮, 大沼可奈, 加藤麻理依, 平井剛, 袖岡幹子, 日本化学会第 97 春季年会, 横浜, 2017/03/16-19, 国内.
18. Click 反応によって連結可能な In-cell NMR 用常磁性金属イオンタグの開発, 口頭, 名取文彦, 彦根佑哉, 平井剛, 三島正規, 伊藤隆, 袖岡幹子, 日本化学会第 97 春季年会, 横浜, 2017/03/16-19, 国内.

19. Synthesis of all the possible isomers of RK460 and its activity evaluation, 口頭, 三瓶悠, 由田和津子, 平井剛, 長澤和夫, 長田裕之, 袖岡幹子, 日本化学会第 97 春季年会, 横浜, 2017/03/16-19, 国内.
20. 生細胞に投与した薬剤のアルキン標識・増強ラマンイメージング, 口頭, 安藤 潤, 関谷拓正, Ka Den, 山越博幸, どの 孝介, 袖岡幹子, 河田 聡, 藤田克昌, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 横浜, 2017/03/17, 国内.
21. Pd enolate 錯体を用いたアフィニティー精製法の開発, ポスター, 早水健二, 鬮鬮孝介, 江上寛通, 浅沼三和子, 袖岡幹子, 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017/03/24-27, 国内.
22. β -ケトアミドの Pd エノラートを用いた触媒的不斉付加反応の開発, ポスター, 寺山直樹, 早水健二, 橋爪大輔, 鬮鬮孝介, 袖岡幹子, 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017/03/24-27, 国内.
23. 植物毒素コロナチンの気孔再開口作用機序解明を目指した孔辺細胞 In vivo ラマンイメージング, 口頭, 江越脩祐, 山越博幸, 鬮鬮孝介, 石丸泰寛, 高岡洋輔, 袖岡幹子, 上田実, 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017/03/24-27, 国内.
24. アルキン標識分子の直接的濃縮精製法の開発, 口頭, 大金賢司, 浅沼三和子, 鬮鬮孝介, 袖岡幹子, 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017/03/24-27, 国内.
25. Turn-ON 蛍光アフィニティー標識法を用いた生物活性化合物の標的タンパク質解析, 口頭, 浅沼三和子, 鬮鬮孝介, 大金賢司, 袖岡幹子, 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017/03/24-27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」研究領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 生理活性代謝物と標的タンパク質同定のための基盤技術の創出
(英語) Development of Basic Technology for Identification of Bioactive Metabolites and Target Proteins

研究開発担当者 (日本語) 袖岡幹子 袖岡有機合成化学研究室 主任研究員
所属 役職 氏名： (英語) Mikiko Sodeoka, Synthetic Organic Chemistry Laboratory, Chief Scientist

実施期間： 平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) ラマンスクリーニングのためのラマン分光装置の開発
開発課題名： (英語) Development of a Raman spectroscopy system for Raman screening

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 准教授 藤田克昌
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University, Associate Professor, Katsumasa Fujita

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・袖岡幹子 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 5 件）

1. 安藤 潤, 袖岡幹子, 藤田克昌. ラマン散乱を利用した細胞分子イメージング. *JSMI Report*, 2016, 9, 30-11.
2. ANDO J, PALONPON AF, SODEOKA M, FUJITA K. High-speed Raman imaging of cellular processes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016, 33, 16–24.
3. ANDO J, ASANUMA M, DODO K, YAMAKOSHI H, KAWATA S, FUJITA K, SODEOKA M. Alkyne-tag SERS screening and identification of small-molecule-binding sites in protein. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 38, 13901-10.
4. ICHIMURA T, CHIU LD, FUJITA K, MACHIYAMA H, YAMAGUCHI T, WATANABE T, FUJITA H. Non-label immune cell state prediction using Raman spectroscopy. *Sci. Rep.* 2016, 6, 37562.
5. CHIU LD, ICHIMURA T, SEKIYA T, MACHIYAMA H, WATANABE T, FUJITA H, OZAWA T, FUJITA K. Protein expression guided chemical profiling of living cells by hybrid fluorescence-Raman microscopy. *Sci. Rep.* 2017, 7, 43569.
6. ANDO J, SEKIYA T, KA D, YAMAKOSHI H, DODO K, SODEOKA M, KAWATA S, FUJITA K. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging of alkyne-tagged small molecule drug in live cells with endocytosed gold nanoparticles. *Proc. SPIE.* 2017, 10046, 1004606.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ラマン散乱顕微鏡による細胞/組織の分子イメージング, 口頭, 藤田克昌, 第 55 回生体医工学会大会オーガナイズドセッション, 富山, 2016/4/28, 国内.
2. 自発ラマン散乱を利用した細胞分子イメージング, 招待講演, 藤田克昌, ラマンバイオセンシングコンソーシアム, 東京, 2016/5/10, 国内.
3. ラマン散乱を用いた細胞分析イメージング, 招待講演, 安藤 潤, 藤田克昌, 京都バイオ計測センターシンポジウム, 京都, 2016/8/2, 国内.
4. 顕微鏡の限界を超える: 超解像顕微鏡とラマン散乱顕微鏡, 招待講演, 藤田克昌, 組織細胞化学会総会, 東京, 2016/9/3, 国内.
5. Rapid SERS imaging of biomolecules using slit-scanning Raman microscopy, ポスター, ANDO J, BANDO K, MOCHIZUKI K, DODO K, YAMAKOSHI H, FUJITA K, SODEOKA M, KAWATA S, The 14th International Conference on Near-field Optics, Nanophotonics, and Related Techniques (NFO-14), Hamamatsu, 2016/9/7, 国内.
6. ラマン顕微鏡: 分光分析とイメージングとの融合, 招待講演, 藤田克昌, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム, 金沢, 2016/9/6, 国内.
7. ラマン散乱を用いた生体イメージング, 招待講演, 安藤潤, 藤田克昌, 電気通信学会ソサイエティ大会, 札幌, 2016/9/21, 国内.

8. ラマン散乱を用いた顕微分析イメージング, 招待講演, 藤田克昌, 高分子学会 高分子表面研究会 東京理科大学森戸記念館, 東京, 2016/10/21, 国内.
9. SERS imaging of alkyne-tagged small molecule in cells with gold nanoparticles, 口頭, ANDO J, SEKIYA T, KA D, YAMAKOSHI H, DODO K, SODEOKA M, KAWATA S, FUJITA K, OSJ-OSA Joint Symposia on Plasmonics and Optics, Tokyo, 2016/10/31, 国内.
10. Raman microscopy for imaging cellular dynamics. 招待講演, FUJITA K, 31st International Congress on High-Speed Imaging and Photonics (ICHSIP31), Suita, 2016/11/8, 国内.
11. Raman spectroscopic approaches to label-free cell characterization and finding functional minorities, 招待講演, FUJITA K, 生物物理学会, 筑波, 2016/11/25, 国内.
12. ラマン散乱を利用した高解像度分子イメージング, 招待講演, 藤田克昌, 日本光学会 ナノオプティクス研究グループ 第 23 回研究討論会, 吹田, 2016/11/29, 国内.
13. Raman microscopy beyond the limit, 招待講演, FUJITA K, SCIX, Minneapolis, 2016/9/19, 国外.
14. ラマン散乱による細胞分析イメージング, 招待講演, 安藤潤, 藤田克昌, 電子情報通信学会 第 36 回 POC 研究会, 池田, 2016/11/30, 国内.
15. Improvement of spatial- and temporal-resolution in Raman microscopy, 招待講演, FUJITA K, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium (14th Annual Meeting of the Japan Association of Medical Spectroscopy), Awaji Yumebutai, 2016/12/7, 国内.
16. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging of alkyne-tagged small molecule drug in live cells with endocytosed gold nanoparticles, 口頭, ANDO J, SEKIYA T, KA D, YAMAKOSHI H, DODO K, SODEOKA M, KAWATA S, FUJITA K, SPIE Photonics West 2017, San Francisco, 2017/1/28, 国外.
17. Raman imaging of molecular dynamics during cellular events, 招待講演, FUJITA K, SPIE 2017 Nano-Bio Sensing, Imaging & Spectroscopy, Jeju, 2017/2/23, 国外.
18. 生細胞に投与した薬剤のアルキン標識・増強ラマンイメージング, 口頭, 安藤潤, 関谷拓正, カデン, 山越博幸, だど 孝介, 袖岡幹子, 河田 聡, 藤田克昌. 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 横浜, 2017/3/17, 国内.
19. Raman microscopy for molecular imaging of living cells, 招待講演, 藤田克昌, シンポジウム「生理学研究を深化させる新しい光学技術」第 94 回日本生理学会大会, 浜松, 2017/3/29, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願