

チロシンキナーゼ型受容体の  
ケミカルバイオエンジニアリング

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程脳神経医学専攻

指導教員 廣瀬 謙造 教授

伊佐 真幸

## 要旨

チロシンキナーゼ型受容体 (RTK) 由来のシグナル制御を行うことは、基礎研究や臨床研究の発展に非常に有用であるため、ケミカルバイオエンジニアリングを用いた二つの新規手法の確立を目指した。第一に、局所における RTK の役割を解明するため、光照射依存的な RTK の活性化法を開発し、光照射を行った範囲の細胞の RTK シグナル誘導法を確立した。第二に、癌で問題となる RTK の一種の HER2 の内在化誘導薬を探索するため、pH 感受性蛍光色素を用いたスクリーニング手法を確立し、約 1 万化合物のスクリーニングを実施した。本手法を用いることで、今後 RTK の局所シグナルの役割の解明や、リード化合物を基にした創薬が期待される。

## 略称

17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
Akt	protein kinase B
AM	acetoxymethyl ester
AraC	cytosine arabinoside
AraF	L-arabinose-binding periplasmic protein
AVG	average
BOP	(benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate
BSA	bovine serum albumin
CCD	charge coupled device
CID	chemical inducible dimerizer
DCM	dichloromethane
DIEPA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMEM	dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EGFR	epidermal growth factor receptor
Erk	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
FKBP12	FK506-binding protein
FRB	FKBP-rapamycin-binding domain of mTOR
FL	fluorescein
GFP	green fluorescent protein
GTPase	guanosine triphosphatase
HA	hemagglutinin

HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate methanaminium
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectroscopy
HSP90	heat shock protein 90
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
NA	numerical aperture
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase receptor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR $\beta$	platelet derived growth factor receptor $\beta$
PeT	photoinduced electron transfer
PFA	paraformaldehyde
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PLC	phospholipase C
PVDF	polyvinylidene difluoride
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	receptor tyrosine kinase
scFv	single chain variable fragment
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	tris-buffered saline

TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TRITC	tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate
TrkB	tropomyosin-related kinase B
UV	ultraviolet
VEGFR	vascular endothelial growth factor
VSVG	fusogenic envelope G glycoprotein of the vesicular stomatitis virus
WSC	water-soluble carbodiimide

## 【目次】

要旨	2
略称	3
目次	6
序論	8
第一章 「光依存的なチロシンキナーゼ型受容体活性化の制御」	13
1.1 序文	14
1.2 方法	17
1.3 結果	34
1.4 考察	46
第二章 「HER2 内在化誘導薬の探索」	51
2.1 序文	52
2.2 方法	56
2.3 結果	64
2.4 考察	73
結論	78
謝辞	81

参考文献	82
図説	96
付録	124

## 序論

チロシンキナーゼ型受容体 (receptor tyrosine kinase: RTK) は細胞増殖、細胞遊走、細胞骨格の再構成、形態変化、DNA 合成等の様々な細胞応答を調節している。RTK は 1 回膜貫通型の糖タンパク質で、細胞内領域にチロシンキナーゼ活性を持っている。RTK を介したシグナル伝達は栄養因子等のリガンドが受容体の細胞外領域に結合することで誘導される単量体受容体の二量体化によって開始される<sup>1</sup>。続いて受容体の細胞内領域の自己リン酸化が起こり、リン酸化チロシンを認識する Src ホモロジー 2 (Src homology 2: SH2) ドメインを持つ下流シグナル伝達誘導分子と結合する。SH2 ドメイン含有分子としてはホスホリパーゼ C (Phospholipase C: PLC)、ホスファチジルイノシトール-3'-キナーゼ (phosphatidylinositol 3 kinase: PI3K)、p21ras guanosine triphosphatase (GTPase) 活性化タンパク質、増殖因子受容体結合タンパク質 2 (Growth factor receptor-bound protein 2: Grb2) が知られており、それらのタンパク質が下流にシグナルを伝達し、血管、免疫および神経系等の様々な生理機能を制御している<sup>2-4</sup>。

これまでの研究では RTK 活性や下流シグナルの研究は薬理学的手法や遺伝学的な手法が用いられおり、RTK 活性の時空間パターンを解明することは困難



であった<sup>5,6</sup>。具体的には、薬物処理によるパフアーピペット<sup>7</sup>を用いた薬物投与では細胞内の数  $\mu\text{m}$  という局所への投与は困難であり、また投与した薬物が周辺へ拡散してしまい、限局した範囲で薬物を作用させることは難しい。siRNAを用いたノックダウンによる手法を行った場合は、目的の RTK 分子を細胞から十分量減少させるためには数時間から数日を要するので、秒や分のオーダーで生じる RTK シグナル活性の増減を解析することは極めて難しい。さらに細胞遊走や軸索伸長などで多く用いられている薬物をコートしたビーズ<sup>8-12</sup>の使用では、RTK の活性化を時間的に制御することが難しい。

以上のように、技術的な問題があり、RTK の局所的な役割を解明することは、従来の手法では困難であった。一方で、近年分子生物学的な手法と化学的な手法を組み合わせたケミカルバイオエンジニアリングと呼ばれる手法を適応することで、RTK を人工的に改変、修飾して RTK の機能や反応を分子レベルから扱い、RTK のシステム制御機構を解明しようとする研究が行われている。RTK の活性を人為的に正や負に制御することはこれらの生理機能を制御する細胞内シグナルを理解するための基礎研究の進展のみならず、病態を対象とした研究においても有用な技術となりうる。細胞内の  $\mu\text{m}$  オーダーの局所での RTK 活性の時空間パターンは、神経の軸索伸長や細胞運動の方向決定等を含む様々な細胞応答の決定的な要因であると考えられており、今後の研究の進展が期待されて

いる<sup>7,8,10,13,14</sup>。RTK のケミカルバイオエンジニアリングの手法を利用したアプローチでは、FKBP12 (FK506-binding protein) との結合サイトを二つ持っているラパマイシン誘導体を用いて、FKBP12 融合 RTK を特異的に架橋し融合 RTK の二量体化を惹起することで、特異的に融合 RTK のシグナル誘導を行い、RTK のシグナルの評価が行われている<sup>15</sup>。しかしながら、このような既存のケミカルバイオエンジニアリングの手法では細胞内局所での RTK の活性化制御は実現しておらず、細胞内局所における RTK の生理学的、生化学的な実態については理解が進んでいない。この問題を解決するためには目的の RTK 分子を高い時間分解能で限局した場所で活性化する手法の確立が必要である。本研究ではケミカルバイオエンジニアリングを用いて、細胞内の局所で RTK シグナル活性化を誘導する方法論の確立を目指した。

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR)、血管内皮細胞増殖因子受容体 (Vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR)、血小板由来成長因子受容体 (Platelet derived growth factor receptor: PDGFR) などの RTK のシグナル亢進は、転写因子の活性化によって細胞増殖、細胞分化に関連する遺伝子の発現増加、アポトーシス阻害作用、血管新生促進作用が生じ、癌の悪性化をもたらしている<sup>16-19</sup>。RTK の中でも EGFR ファミリーの HER2 タンパク質は卵巣がん、乳がん等で過剰発現が認められ、細胞増殖の制御に深く関わってい

る<sup>18,20,21</sup>。また HER2 を過剰発現しているがんは進行が早く、転移能が高いことが知られている<sup>22</sup>。免疫組織化学染色や蛍光 in situ ハイブリダイゼーション検査によって HER2 の過剰発現もしくは HER2 遺伝子の増幅が確かめられた乳がんに対しては、HER2 のチロシンキナーゼ活性を低下させることによって、乳がん細胞の増殖を抑えることが治療のコンセプトとして有効であるとされている。特に HER2 に対するヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ（ハーセプチン<sup>®</sup>）は HER2 の分子標的薬として用いられて良好な治療成績が得られている。しかしながらトラスツズマブはタンパク質であるため品質管理が困難で生産のコストが高い。この点において小分子化合物の医薬の利用が望ましい。現在小分子化合物である熱ショックタンパク質 90（heat shock protein 90: Hsp90）阻害薬である 17-Allylamino-17-demethoxy-geldanamycin（17-AAG）が、HER2 陽性転移性乳がんの治療薬として第 II 相試験まで進んでいる<sup>23</sup>。HER2 過剰発現の乳がん細胞において、17-AAG は Hsp90 の機能を阻害することで、HER2 の正常なコンフォメーションを維持阻害する。これによって、HER2 の内在化及び分解系での分解を誘導することで抗腫瘍効果を示す<sup>24-29</sup>。抗癌剤治療においては標的の異なる薬物を併用することで相乗効果が期待できるため、Hsp90 以外の分子を標的とした小分子化合物ベースの治療薬の開発が期待されている<sup>30</sup>。

膜タンパク質の機能抑制は細胞膜上から細胞内にエンドサイトーシスされ、細胞内の酸性小胞に取り込まれる過程が必須である。そこで、本研究ではケミカルバイオエンジニアリングを用いて、HER2 の内在化を特異的かつ効率的に検出する手法を開発し、これを用いて HER2 の内在化を効率良く誘導する小分子化合物を探索することを目的とした。これによって、HER2 を過剰発現している癌に対する治療薬となるシード化合物が得られると期待した。

## 第一章 「光依存的なチロシンキナーゼ型受容体活性化の制御」

## 1.1 序文

神経の軸索伸長や細胞運動の方向決定等を含む様々な細胞応答は、細胞内の  $\mu\text{m}$  オーダーの局所での RTK の活性化パターンが重要であると考えられているが、既存の方法では細胞内局所での RTK の活性化を制御することは困難であり、局所における RTK の生理学的、生化学的な実態については理解が進んでいない。近年タンパク質の活性化を時間や場所を自在に制御するため、光を用いた手法がいくつか報告されている。光は顕微鏡下で強度、波長、照射位置を容易に変えることが可能であるため、時空間的な制御を行うスイッチとして適している。これまでに有機化学的に合成した保護基や植物の光受容体などの光感受性の分子を応用して、光を介したタンパク機能の調節が実現されている。

光を用いたタンパク質の活性化方法として、植物の光受容体である青色光に反応する Phototropin や、赤色光に反応する Phytochrome の可逆的な構造変化を利用した方法が報告されている<sup>31-36</sup>。Phototropin の Light oxygen voltage (LOV) 領域は光照射を行う前は、C 末の  $\alpha$  ヘリックスと結合している。ここで青色光を照射することにより、LOV 領域と  $\alpha$  ヘリックスの結合が解除されるという、光照射依存的な構造変化を利用した方法がある。Rho GTPase である Rac1 の常時活性化型を  $\alpha$  ヘリックスと連結させて、青色光照射前は LOV 領域で他の分子と

の相互作用を阻害した状態で青色光を照射することで初めて阻害作用が無くなり **Rac1** が活性化するという方法である<sup>31</sup>。

有機小分子であるケイジド化合物を用いたタンパク間相互作用の制御法がある。この方法はタンパク質二量体誘導化合物 (chemical inducible dimerizer: **CID**) に光解離性の保護基を結合させることで、**CID** の活性を失わせておき (ケイジド化)、光照射依存的に保護基を外すことで、初めて **CID** の活性を発現させ、タンパク質間の架橋を実現する方法である。**CID** の中でも多く利用されているのがマクロライド系抗生物質であるラパマイシンである。ラパマイシンは **FKBP12** と **FKBP-rapamycin-binding domain of mTOR (FRB)** の両者と結合可能であるため、活性化させたい標的タンパク質を融合させた **FKBP** とその標的タンパク質を活性化させるタンパク質を融合させた **FRB** を発現させることでラパマイシン依存的なタンパク間相互作用を実現している。また **FKBP12** を膜に固定しておき、**FRB** と常時活性型 **Rac** 等のタンパク質の融合分子をラパマイシン依存的に膜移行させることで、細胞応答の誘導が行われてきた<sup>37-39</sup>。近年はこれらのラパマイシンをケイジド化することで、光応答性に保護基を外し、ラパマイシンを活性化させ、**FKBP12** と **FRB** を結合させるというものである<sup>40,41</sup>。

**CID** を用いて **RTK** の二量体化を誘導し、**RTK** 活性化を誘導する方法が複数報告されている<sup>15,42-45</sup>。これらの方法は **RTK** の細胞内シグナル伝達に重要な細

胞内領域の C 末に FKBP や FRB を連結したキメラ RTK を発現させ、ラパマイシンやこれらの誘導体分子でキメラ RTK 間の二量体化を誘導するというものである。しかしながら、このコンセプトでこれまでに RTK を局所的に活性化させる方法は実現していない。

本研究では RTK の局所的な制御を行うために、ケイジド化した人工リガンドを用いて、光照射依存的に RTK の細胞外領域を架橋し、RTK シグナルの誘導を惹起する手法の確立を目指した。具体的には RTK の細胞外領域を人工リガンドを認識する抗一本鎖抗体 (single chain variable fragment: scFv) で置き換えたキメラ受容体を用いることにした。リガンドは光応答性の解離基であるニトロベンジル基を用いてケイジド化することで、光照射前は保護基を有しているため受容体との結合が出来ないが、光照射を行うことで初めてキメラ受容体のリガンドとしての結合能を有するように設計した (Fig. 1A)。

設計したケイジドリガンドとキメラ受容体とを組み合わせることで、光照射依存的に細胞内受容体のリン酸化や細胞内カルシウム濃度上昇が誘導できるかどうか検証した。その結果、光照射依存的に細胞内受容体のリン酸化や細胞内カルシウム濃度上昇が認められ、RTK 由来の特異的なシグナルの活性化を光照射依存的に誘導できることが確認された。



## 1.2 方法

### 細胞

マウス線維芽由来細胞株 NIH3T3 細胞は 10% のウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) (ナカライ) 中にて、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で培養を行った。初代培養海馬神経細胞及び初代大脳皮質神経細胞は胎生 21 日齢 Sprague-Dawley ラット (日本エスエルシー) から海馬及び大脳皮質を切り出し、トリプシン消化をした後に分散させ、海馬神経細胞はカバーガラス、大脳皮質神経細胞はプラスチックボトムディッシュにて、それぞれ単層のグリア細胞上で培養を行った。培養は 2% B-27 サプリメント (Invitrogen)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen)、0.25% Glutamax (Invitrogen) を加えた Neurobasal A 培地 (Invitrogen) 中にて、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で行った。培養開始 3 日後に cytosine arabinoside (AraC, 終濃度 2 μM, Sigma aldrich) を加え、グリア細胞の増殖を抑制した。その後、2-3 日毎に培地を半量ずつ交換した。動物の取り扱いは、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに従った。

血小板因子由来栄養因子受容体キメラ受容体発現プラスミドの作製

PDGFR $\beta$  をコードしている cDNA フラグメントは PDGFR $\beta$ -F と PDGFR $\beta$ -R のプライマーペア (Table 1) を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) によって MGC クローンライブラリーより増幅した。抗フルオロセイン scFv である 4M5.3 をコードしている cDNA フラグメントは 4M5.3-F と 4M5.3-R のプライマーペアを用いた PCR によって pRS316-4M5.3MYC (K. D. Wittrup 教授より供与) を鋳型として増幅した。増幅した PDGFR $\beta$  と scFv をコードしている cDNA フラグメントをフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した後に、それぞれ両端を BsmI と NotI、SalI と SfiI で切断し、pDisplay ベクター (Invitrogen) の BsmI/NotI、SalI/SfiI サイトに挿入した (pDisplay-4M5.3 $\Delta$ PR/L13)。キメラ受容体発現領域は pDisplay-4M5.3MYC から EcoRI と NotI で切り出し、pMX ウイルスベクターに組み入れた (pMX-4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21)。pMX-4M5.3MYC を鋳型に FLAG-F と FLAG-R または V5-F と V5-R のプライマーペアを用いたインバース PCR を行い、環状化することで FLAG エピトープまたは V5 エピトープをコードしている cDNA を 4M5.3 と MYC との間に組み入れた (pMX -4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21、pMX-4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L27)。MYC、FLAG、V5 の各エピトープのアミノ酸配列は EQKLISEEDL、DYKDDDDK、GKPIPNPLLGLDST である。MYC、FLAG、V5 を持つ PDGFR $\beta$  キメラ受容体を

それぞれ 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L13、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L27 と名付けた。

#### 神経栄養因子受容体キメラ受容体発現プラスミドの作製

脳由来神経栄養因子受容体 (Tropomyosin-related kinase B: TrkB) をコードしている DNA フラグメントは TrkB-F と TrkB-R のプライマーペアを用いた PCR によって pEGFP N1-TrkB (Rosalind A. Segal 教授より供与) を鋳型として増幅した。増幅した cDNA フラグメントをフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した後に、両端を XhoI と NotI で切断し、pBluescript SK(-) ベクター (Stratagene) の XhoI/NotI サイトに挿入した (pBluescript SK(-)  $\Delta$ TrkB)。TrkB を BsmI で切りだすために、内在する BsmI サイトを除去する必要があるため、pBluescript SK(-)  $\Delta$ TrkB を鋳型とし、TrkB-F と TrkB-R のプライマーペアを用いてインバース PCR を行い、環状化した (pBluescript SK(-)  $\Delta$ mTrkB)。TrkB をコードしている cDNA フラグメントは pBluescript SK(-)  $\Delta$ mTrkB から BsmI と NotI で切り出し、PDGFR $\beta$  を BsmI と NotI による切断で除去した pMX -4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 ベクターの BsmI/NotI サイトに組み入れた (pMX -4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21)。

4M5.3- $\Delta$ TrkB をコードしている cDNA フラグメントは 4M $\Delta$ TB-F と 4M $\Delta$ TB-R のプライマーペアを用いた PCR によって pMX -4M5.3 $\Delta$ TrkB/L21 を鋳型として増

幅した。増幅した DNA フラグメントをフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した後に、BamHI と EcoRI で切断し、pBluescript SK(-) ベクターの BamHI/EcoRI サイトに挿入した (pBluescript SK(-) 4M5.3-ΔTrkB)。

4M5.3-ΔTrkB は pBluescript SK(-) 4M5.3-ΔTrkB から BsmI と MluI で切り出し、pLenti6PW TGB ウイルスベクター (京都大学金子武嗣教授より供与) の BsmI/MluI サイトに組み入れた (pLenti- 4M5.3ΔTrkB)。TrkB キメラ受容体を 4M5.3-ΔTrkB/L21 と名付けた。

#### Akt-PH GFP 発現プラスミドの作製

pLenti6PW TGB ウイルスベクターを XhoI で切断し attB2 サイトを切り出した (pLenti6PW TGB attB2(-))。更に pLenti6PW TGB attB2(-) を EcoRV と SalI で切断した後に Klenow Fragment で末端を平滑化することで、attB1 配列を切り出した (pLenti6PW TGB attB(-))。ccdB をコードしている cDNA フラグメントは ccdB-F と ccdB-R のプライマーペアを用いた PCR によって MGC クローンライブラリーより増幅した。増幅した ccdB をコードしている cDNA フラグメントをフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した後に、MluI、EcoRV で切断し、pLenti6PW TGB attB(-) の MluI/SmaI サイトに挿入した (pLenti6PW ccdB)。

Akt-PH green fluorescent protein (GFP) をコードする cDNA フラグメントは

AktGFP-F と AktGFP-R のプライマーペアを用いた PCR によって pcDNA Akt PH-GFP (Tamas Balla 教授より供与) を鋳型として増幅した。増幅した cDNA フラグメントをフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した後に、pDONR 222 (Invitrogen) と共に BP クロナーゼ (Invitrogen) で相同組換え反応を行い、pDONR 222 に Akt-PH GFP を挿入した (pDONR 222 Akt-PH GFP)。続いて pDONR 222 Akt-PH GFP を pLenti6PW ccdB と共に LR クロナーゼ (Invitrogen) で反応を行い、pLenti6PW に Akt-PH GFP を挿入した (pLenti Akt-PH GFP)。

#### AraF システイン変異体発現プラスミドの作製

L-Arabinose-binding periplasmic protein (AraF) をコードしている DNA フラグメントは AraF-F と AraF-R のプライマーペアを用いた PCR によって大腸菌 HB101 由来ゲノム DNA より増幅した。増幅した AraF をコードしている DNA フラグメントを精製した後に、NdeI、XhoI で切断し、pET23d (Novagen) の NdeI/XhoI サイトに挿入した (pET AraF)。AraF 内のシステイン残基を除くため pET AraF を鋳型とし、AraF C64A-F と AraF C64A-R のプライマーペアを用いてインバース PCR を行い、環状化した (pET AraF\_C64A)。AraF の目的部位にシステインを導入するため pET AraF C64A を鋳型とし、適切なプライマーペアを

用いてインバース PCR を行い、環状化した (pET AraF\_C64A\_P15C)。大腸菌 BL21 (DE3) を pET AraF\_C64A\_P15C を用いて形質転換させた。大腸菌は 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 2 $\times$ YT 培地中で 600 nm の吸光度が 0.8 になるまで 37 $^{\circ}$ C で培養した。Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG、終濃度 0.5 mM) を加え、さらに 10-12 時間、25 $^{\circ}$ C で培養した後に遠心して大腸菌を回収した。回収した大腸菌は 10 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS ; 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.4) で再懸濁した後に、フレンチプレス (SLM-Aminco) で破碎し、Talon metal affinity resin (BD サイエンス) を用いてメーカーが提供するマニュアルに従い AraF システム変異体を精製した。

#### ウイルス作製及び感染

ウイルスパッケージング細胞 (GP293) に pMX -4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L13、pMX-4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21、pMX -4M5.3 $\Delta$ PR/L27、pMX -4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 の各プラスミドと偽性水胞性口内炎ウイルス G 糖蛋白 (VSVG) プラスミドを遺伝子導入し、ウイルスを回収し、ウイルス液を NIH3T3 細胞に感染させ、キメラ受容体安定発現 NIH3T3 細胞株を作製した。ウイルスパッケージング細胞 (HEK293T) に pLenti- 4M5.3- $\Delta$ TrkB または pLenti Akt-PH GFP または pLenti6PW STB (京都

大学金子武嗣教授より供与) とレンチウイルスパッケージングプラスミド

MD2.G (Addgene)、psPAX2 (Agilent) を遺伝子導入し、二日後に培養上清を回収することでウイルスを得た。ウイルス液を初代培養海馬神経細胞または初代大脳皮質神経細胞の培地を加えることで、TrkB キメラ受容体と Ak-PH GFP 発現初代培養海馬神経細胞株と TrkB キメラ受容体発現初代大脳皮質神経細胞株を製した。

ケイジドフルオレセイン-BSA 複合体の作製

ケイジドフルオレセイン-bovine serum albumin (BSA) 複合体 (cagedOligoFL) は 30  $\mu$ M BSA と 900  $\mu$ M 5-Carboxyfluorescein-Bis-(5-Carboxymethoxy-2-Nitrobenzyl) Ether,  $\beta$ -Alanine- Carboxamide, Succinimidyl Ester (Invitrogen) を 133  $\mu$ l の 0.1 M 重炭酸緩衝液 (pH 9.0) 中、4°Cで一晩反応させることで作製した。未反応の 5-Carboxyfluorescein- Bis-(5-Carboxymethoxy-2-Nitrobenzyl) Ether,  $\beta$ -Alanine-Carboxamide, Succinimidyl Ester は NAP-5 カラム (GE ヘルスケア) にて除去し、cagedOligoFL を 458  $\mu$ g 得た (収率 58.3%)。ケイジドフルオレセインの 315 nm の吸光度の測定より、ケイジドフルオレセインのモル吸光係数  $1.32 \times 10^4$  を算出した。ブラッドフォード法による BSA 量の定量とケイジドフルオレセインの吸光度の測定から、1 分子の BSA に 11.5 分子のケイジドフルオレセインが結合し

ていると見積った。

#### ケイジドフルオレセイン-AraF 複合体の作製

フルオレセイン-AraF 複合体 (AraF-FL) は 30  $\mu\text{M}$  の AraF システイン変異体と 3 mM のヨードアセトアミドフルオレセイン (Thermo Scientific) を PBS 中で 37°C、一時間反応させることで作製した。未反応のヨードアセトアミドフルオレセインは NAP-5 カラムにて除去した。ブラッドフォード法による AraF システイン変異体量の定量とフルオレセインの吸光度の測定から、68% の AraF システイン変異体にフルオレセイン分子が結合していることを見積った。さらに 30  $\mu\text{M}$  の AraF-FL と 900  $\mu\text{M}$  の 5-Carboxyfluorescein-Bis-(5-Carboxymethoxy-2-Nitrobenzyl) Ether,  $\beta$ -Alanine-Carboxamide, Succinimidyl Ester を 0.1 M 重炭酸緩衝液 (pH 9.0) 中、4°C で一晩反応させることでケイジドフルオレセイン-AraF 複合体の作製 (FL-cagedOligoFL) 作製した。未反応の 5-Carboxyfluorescein-Bis-(5-Carboxymethoxy-2-Nitrobenzyl) Ether,  $\beta$ -Alanine-Carboxamide, Succinimidyl Ester は NAP-5 カラムにて除去し、FL-cagedOligoFL を 37.4  $\mu\text{g}$  得た (収率 27.3%)。ブラッドフォード法による AraF システイン変異体量の定量とケイジドフルオレセインの吸光度の測定から、1 分子の AraF システイン変異体に 18.2 分子のケイジドフルオレセインが結合していることを見積った。



## 免疫染色による PDGFR $\beta$ キメラ受容体の発現確認

各種 PDGFR $\beta$  キメラ受容体安定発現 NIH3T3 細胞株をカバーガラスに播種し、12 時間接着させた。細胞を 0.1% BSA 含有 PBS で洗浄し、Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate (TRITC) 標識抗 Hemagglutinin (HA) 抗体 (100 ng/ml, Santa cruz) 存在下または非存在下で室温にて 10 分間放置した。その後 4% パラフォルムアルデヒド (Paraformaldehyde: PFA) で固定した。蛍光画像を励起フィルタ 535-555 nm (オリンパス)、565 nm ダイクロイックミラー (オリンパス)、蛍光フィルタ 570-625 nm (オリンパス) を用い、乾燥系対物レンズ ( $\times 20$ , NA 0.75、オリンパス)、冷却電荷結合素子 (Charge coupled device: CCD) カメラ (Luca、Andor) を用いて取得した。画像を ImageJ ソフトウェア (NIH) を用いて解析した。

## キメラ受容体へのフルオレセイン結合試験

PDGFR $\beta$  キメラ受容体安定発現 NIH3T3 細胞株をカバーガラスに播種し、接着させた。細胞を 0.1% BSA 含有 PBS で洗浄し、200 nM のビオチン化フルオレセイン (Biotium) 存在下または非存在下で室温にて 10 分間反応させた。0.1 % BSA 含有リンガー液で洗浄後 4% PFA で固定した。その後ローダミン標識したストレプトアビジン (90 ng/ml, Beckman coulter) で 10 分間染色した。蛍光画像を励起

フィルタ 535-555 nm (オリンパス)、565 nm ダイクロイックミラー (オリンパス)、  
蛍光フィルタ 570-625 nm (オリンパス) を用い、乾燥系対物レンズ (×20、NA  
0.75、オリンパス)、冷却 CCD カメラ (Luca、Andor) を用いて取得した。画像  
を ImageJ ソフトウェアにて解析した。

#### ケイジドフルオレセインの細胞膜への結合試験

ビオチン化ケイジドフルオレセインの合成は付録で示した。PDGFR $\beta$  キメラ  
受容体安定発現 NIH3T3 細胞株をカバーガラスに播種し、接着させた。細胞を  
0.1 %BSA 含有リンガー液で洗浄し、10  $\mu$ M のビオチン化ケイジドフルオレセイ  
ン存在下または非存在下で室温にて 10 分間反応させた。紫外領域 (ultraviolet : UV)  
光照射を行う場合はキセノンランプを光源とし、励起フィルタ 352-402 nm  
(Semrock) にて細胞を UV 光照射した。0.1 %BSA 含有リンガー液で洗浄後、  
ローダミン標識したストレプトアビジン (90 ng/ml) で 10 分間染色した。蛍光画  
像を励起フィルタ 535-555 nm (オリンパス)、565 nm ダイクロイックミラー (オ  
リンパス)、蛍光フィルタ 570-625 nm (オリンパス) を用い、乾燥系対物レンズ  
(×20、NA 0.75、オリンパス)、冷却 CCD カメラ (Luca、Andor) を用いて取  
得した。画像を ImageJ ソフトウェアにて解析した。

## ウエスタンブロットによる PDGFR $\beta$ キメラ受容体発現比較

各種 PDGFR $\beta$  キメラ受容体の安定発現 NIH3T3 細胞株を冷した PBS で洗浄後にドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS) サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl pH 7.4、2% SDS、4 % Glycerol、5% 2-メルカプトエタノール、0.004% ブロモフェノールブルー) で可溶化した。サンプルを 8 % SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後、ポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF) 膜にタンパク質を転写し、5 % スキムミルクを含む 0.1 % TBST (50 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン、150 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.1 % Tween 20、pH7.6) で室温にて一時間ブロッキングした。抗 PDGFR $\beta$  抗体 (1/2,000、Cell signaling technology) または抗  $\beta$  アクチン抗体 (1/2,000、Sigma aldrich) を 4°C で一晩反応させた。反応後、0.1 % TBST で 10 分間の洗浄を 3 回行い、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1/2,000、MBL) または HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (1/2,000、MBL) を室温で一時間反応させた。反応後、0.1 % TBST で 10 分間の洗浄を 2 回行い、TBS (50 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン、150 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム、pH7.6) で 10 分間の洗浄を行い、Western Lightning plus-ECL (Perkin Elmer) による化学発光を Hyperfilm (GE ヘルスケア) に露光し、検出した。実験を 3 回行った。

#### OligoFL 投与によって誘導される 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 のリン酸化の確認

4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 発現細胞を 0.1% BSA 含有 PBS で洗浄後、10 nM の OligoFL または vehicle を投与した。投与後、6 分間放置した。その後、冷した PBS で洗浄後に SDS サンプルバッファーで可溶化した。サンプルを 8% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後、PVDF 膜にタンパク質を転写し、3% BSA または 5% スキムミルクを含む 0.1% TBST で室温にて一時間ブロッキングした。抗リン酸化 PDGFR $\beta$  抗体 pY1021 (1/1,000) または抗  $\beta$  アクチン抗体 (1/2,000) を 4°C で一晩反応させた。反応後、0.1% TBST で 10 分間の洗浄を 3 回行い、HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (1/2,000, MBL) または HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (1/2,000) を室温で一時間反応させた。反応後、0.1% TBST で 10 分間の洗浄を 2 回行い、TBS で 10 分間の洗浄を行った。シグナルは Western Lightning ultra-ECL (Perkin Elmer) による化学発光を冷却 CCD カメラ (ナカニシイメージングラボ) にて検出した。実験を 4 回行った。

#### OligoFL 投与による 4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 のリン酸化の確認

4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 安定発現 NIH3T3 細胞株または 4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 発現初代 大脳皮質神経細胞経細胞株を 0.1% BSA 含有リンガー液で洗浄後、10 nM の OligoFL または vehicle を投与した。投与後、6 分間放置した。その後、冷した

PBS で洗浄後に SDS サンプルバッファーで可溶化した。サンプルを 8 % SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後、PVDF 膜にタンパク質を転写し、5 % スキムミルクを含む 0.1 % TBST で室温にて一時間ブロッキングした。抗リン酸化 TrkB 抗体 pY516 (1/1,000、Cell signaling technology) または抗  $\beta$  アクチン抗体 (1/2,000) または抗 HA 抗体 (1/1,000) または抗リン酸化 extracellular signal-regulated kinases 1/2 (Erk 1/2) 抗体 (1/2,000、Cell signaling technology) を 4°C で一晩反応させた。反応後、0.1 % TBST で 10 分間の洗浄を 3 回行い、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1/2,000) または HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (1/2,000) を室温で一時間反応させた。反応後、0.1 % TBST で 10 分間の洗浄を 2 回行い、TBS で 10 分間の洗浄を行った。シグナルの検出は Western Lightning plus-ECL による化学発光の Hyperfilm による検出または Western Lightning ultra-ECL による化学発光の冷却 CCD カメラ (ナカニシイメーjingラボ) による検出を行った。実験を 3 回行った。

cagedOligoFL を用いた光依存的なキメラ受容体リン酸化の確認

4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 安定発現 NIH3T3 細胞株、4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 安定発現 NIH3T3 細胞株または非発現細胞株を 0.1% BSA 含有リンガー液で洗浄後、終濃度 10 nM の cagedOligoFL または vehicle を投与した。投与後 12 分間室温で放置した。そ

の後、冷した PBS で洗浄後、SDS サンプルバッファーで可溶化した。UV 照射を行う場合はキセノンランプを光源とし、励起フィルタ 352-402 nm (Semrock) を用いて、10 nM の cagedOligoFL または vehicle を加えた後に 200 秒間光照射を行った。サンプルを 8 % SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後、PVDF 膜にタンパク質を転写し、5 % スキムミルクを含む 0.1 % TBST で室温にて一時間ブロッキングした。抗リン酸化 PDGFR $\beta$  抗体 pY1021 (1/1,000) または抗リン酸化 TrkB 抗体 pY516 (1/1,000、Cell signaling technology) または抗  $\beta$  アクチン抗体 (1/2,000) を 4°C で一晩反応させた。反応後、0.1 % TBST で 10 分間の洗浄を 3 回行い、HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (1/2,000) または HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1/2,000) または HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (1/2,000) を室温で一時間反応させた。反応後、0.1 % TBST で 10 分間の洗浄を 2 回行い、TBS で 10 分間の洗浄を行った。シグナルの検出は Western Lightning plus-ECL による化学発光の Hyperfilm による検出または Western Lightning ultra-ECL による化学発光の冷却 CCD カメラ (ナカニシイメーキングラボ) による検出を行った。実験を 4 回行った。

FL-cagedOligoFL を用いた光依存的なキメラ受容体リン酸化の確認

4M5.3-APR $\beta$ /L21 安定発現 NIH3T3 細胞株を 0.1% BSA 含有リンガー液で洗浄

後、10 nM の FL-cagedOligoFL または vehicle を投与し、3 分間室温で放置した。

0.1% BSA 含有リンガー液で洗浄後、9 分間室温で放置した。冷した PBS で洗浄後、SDS サンプルバッファーで可溶化した。UV 光照射を行う場合はキセノンランプを光源とし、励起フィルタ 352-402 nm (Semrock) を用いて、0.1% BSA 含有リンガー液で洗浄後に 200 秒間光照射を行った。サンプルを 8% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後、PVDF 膜にタンパク質を転写し、5% スキムミルクを含む 0.1% TBST で室温にて一時間ブロッキングした。抗リン酸化 PDGFR $\beta$  抗体 pY1021 (1/1,000) または抗  $\beta$  アクチン抗体 (1/2,000) を 4°C で一晩反応させた。反応後、0.1% TBST で 10 分間の洗浄を 3 回行い、HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (1/2,000) または HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (1/2,000) を室温で一時間反応させた。反応後、0.1% TBST で 10 分間の洗浄を 2 回行い、TBS で 10 分間の洗浄を行った。シグナルの検出は Western Lightning plus-ECL による化学発光の Hyperfilm による検出または Western Lightning ultra-ECL による化学発光の冷却 CCD カメラ (ナカニシイメージングラボ) による検出を行った。実験を 4 回行った。

#### 細胞内カルシウムイメージング

各種キメラ受容体安定発現 NIH3T3 細胞株または非発現 NIH3T3 細胞株を 1

$\times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度でカバーガラス上に播種し、一晩培養した。細胞を 0.1% BSA 含有リンガー液 (5 mM HEPES、150 mM NaCl、4 mM KCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % グルコース、pH 7.4) で洗浄し、2  $\mu$ M の Fura-2 acetoxymethyl ester (AM) 体 (Invitrogen) を 30 分間室温にて負荷した。10 nM の OligoFL または vehicle を投与した。光源として Polychrome II (TILL photonics) を用い、350 nm 及び 380 nm の励起光を照射し、CCD カメラ (HiSCA、浜松ホトニクス) を用いて蛍光画像を取得した。または励起フィルタ 330-350 nm (Semrock) 励起フィルタ 380-400 nm (Semrock)、409 nm ダイクロイックミラー (Semrock)、蛍光フィルタ 470-550 nm (Semrock) を用い、乾燥系対物レンズ ( $\times 20$ 、NA 0.75、オリンパス)、冷却 CCD カメラ (Luca、Andor) を用いて蛍光画像を取得した。二波長の励起で得られた蛍光画像を ImageJ ソフトウェアにて解析した。

ケイジ解除を伴う細胞内カルシウムイメージング

PDGFR $\beta$  受容体安定発現 NIH3T3 細胞株または非発現 NIH3T3 細胞株を  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度でカバーガラス上に播種し、一晩培養した。細胞を 0.1% BSA 含有リンガー液で洗浄し、2  $\mu$ M の Fluo-4 AM (同仁化学) を 30 分間室温にて負荷した。細胞を 0.1 % BSA 含有リンガー液で洗浄後 10 nM の cagedOligoFL を加えた。局所的にケイジ解除を行う場合は、2  $\mu$ M の Fluo-4 AM と 100 nM の



FL-cagedOligoFL または AraF-FL を 30 分間室温にて負荷し、細胞を 0.1 %BSA 含有リンガー液で洗浄した。励起フィルタ 460-480 nm (オリンパス)、490 nm ダイクロイックミラー (オリンパス)、蛍光フィルタ 495-540 nm (オリンパス) を用い、乾燥系対物レンズ (×20、NA 0.75、オリンパス)、冷却 CCD カメラ (Luca、Andor) を用いて蛍光画像を取得した。ケイジ解除を行うために UV 光照射を行う場合はキセノンランプを光源とし、励起フィルタ 352-402 nm (Semrock) にて 6 秒間隔で 3 秒間ずつ 2 分間 UV 光照射を行った (UV 光照射は計 1 分間)。局所的にケイジ解除を行う場合は、800 ミリ秒 UV 光照射を直径 50  $\mu\text{m}$  の範囲に対し行った。得られた画像の蛍光変化を ImageJ ソフトウェアにて解析した。細胞内カルシウムの増減は各時間の Fluo-4 の蛍光増加 ( $\Delta F$ ) を UV 光照射前の蛍光 ( $F_0$ ) で除した  $\Delta F/F_0$  値を用いて評価した。

#### Akt-PH GFP の細胞内局在変化

キメラ受容体と Akt-PH GFP 発現初代培養海馬神経細胞株を 0.1%BSA 含有 HBS 液 (25 mM HEPES、115 mM NaCl、2.5 mM KCl、2 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、25 mM グルコース、pH 7.4) で洗浄した。10 nM の OligoFL または vehicle を投与した。励起フィルタ 460-480 nm (オリンパス)、490 nm ダイクロイックミラー (オリンパス)、蛍光フィルタ 495-540 nm (オリンパス) を用い、水浸対物レン

ズ（×40、NA0.8、オリンパス）、冷却 CCD カメラ（Luca、Andor）を用いて蛍光画像を取得した。得られた蛍光画像を ImageJ ソフトウェアにて解析した。

## 1.3 結果

### 1.3-1 光依存的な RTK 活性化法の設計

本研究では人工的なリガンドと受容体の結合を実現するために有機小分子であるフルオレセインと抗フルオレセイン scFv のペアを選択した。フルオレセインと抗フルオレセイン scFv との結合は多くの報告がなされており<sup>46-48</sup>、またフルオレセインは細胞毒性が低い点で有利であると考えた。本研究では Fig. 1B のように RTK の細胞外領域を抗フルオレセイン scFv と置き換えたキメラ受容体を設計した。フルオレセインに光照射依存的に分離する保護基を付けた（ケイジド化）ケイジドフルオレセインをリガンドとして選択した。設計した光照射依存的な RTK 活性化法では、光照射を行うことでケイジドフルオレセインの保護基が外れ、産生した多価のフルオレセインがキメラ受容体の二量体化を誘導し、細胞内シグナル伝達を惹起することを期待した (Fig. 1B)。

プロトタイプのキメラ受容体として、RTK の一つである PDGFR $\beta$  の細胞外領域を、フルオレセインと高親和性 ( $K_d = 270$  fM) の scFv クローンである 4M5.3 クローン<sup>47-49</sup> と置き換えたキメラ受容体 (4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ ) を作製した。多価のフルオレセインを標識した BSA (OligoFL) が、細胞膜上の 2 分子のキメラ受容体を架橋することによって、キメラ受容体の二量体化を惹起し、下流シグナルの

活性化を誘導できると期待した (Fig. 2A)<sup>50</sup>。細胞膜付近からリガンド結合部位へ至るリンカーの長さの違いによってシグナル誘導に差異が生じるとの報告がある<sup>46</sup>。そこで、種々のエピトープタグ (MYC タグ、FLAG タグ、V5 タグ) を scFv と細胞膜貫通領域の間に挿入することで、scFv と受容体間の長さを 13 アミノ酸、21 アミノ酸、27 アミノ酸と変化させたキメラ受容体を作製した (Fig. 2B)。それぞれのキメラ受容体を scFv と受容体間のアミノ酸残基の数から 4M5.3-ΔPRβ/L13(L13)、4M5.3-ΔPRβ/L21(L21)、4M5.3-ΔPRβ/L27(L27) と名付けた。

### 1.3-2 キメラ受容体の発現確認

それぞれのキメラ受容体を NIH3T3 に発現させ、キメラ受容体の発現量の違いを評価した。抗 PDGFRβ 抗体を用いたウエスタンブロット法により各キメラ受容体発現量を比較した結果、キメラ受容体間で同程度の発現が見られた (Fig. 3A)。次にそれぞれのキメラ受容体の細胞膜上での発現量の違いについて評価を行った。各キメラ受容体を発現させた NIH3T3 細胞を TRITC 標識抗 HA 抗体を用いて免疫染色を行った。細胞膜上の TRITC の蛍光強度を定量することで、細胞膜上のキメラ受容体量を評価した結果、各キメラ受容体間で有意な差は見られなかった (Fig. 3B;  $266.9 \pm 144.1$ ,  $244.0 \pm 136.5$  and  $245.5 \pm 143.7$  for L13, L21 and L27, respectively; 分散分析 ;  $p > 0.9$ )。さらに各キメラ受容体のフルオレセイン

に対する結合能を評価するために、ビオチン化フルオレセインを細胞外液に加えた後に、未反応のビオチン化フルオレセインを洗浄した後に、ローダミン標識したストレプトアビジン処理を行った。ここでローダミンの蛍光強度から各キメラ受容体へのフルオレセイン結合能を評価した。その結果、各キメラ受容体間でフルオレセインに対する結合量に有意な差は見られなかった (Fig. 3C;  $371.1 \pm 179.9$ ,  $382.1 \pm 203.1$  and  $384.9 \pm 176.7$  for L13, L21 and L27, respectively; 分散分析 ;  $p > 0.9$ )。以上の結果から、ここでの3種のキメラ受容体間で、細胞膜上での発現量や結合能に違いが無いことが示された。

### 1.3.3 キメラ受容体によるシグナル誘導

設計した方法で光照射依存的に受容体を活性化させるために、作製した各キメラ受容体が細胞内シグナルを誘導するかどうか、またどのリンカー長のキメラ受容体がシグナルを誘導する上で適しているのかという点について調べた。

PDGFR $\beta$  は、リガンドである血小板由来栄養因子 PDGF-BB の結合に依存して受容体の細胞内領域を自己リン酸化し、PLC $\gamma$  を活性化することで、細胞内カルシウム応答を惹起することが知られている<sup>51</sup>。そこで本キメラ受容体を発現させた細胞に、多価のフルオレセインを投与することで、細胞内カルシウム濃度上昇を誘導するかどうか検証することにした (Fig. 4A)。まず、各キメラ受容体を

発現させた NIH3T3 細胞に OligoFL を投与した際の細胞内カルシウム濃度を評価した。各キメラ受容体を発現させた細胞において、vehicle を投与した場合に比べ、10 nM の OligoFL を投与した場合に、細胞内カルシウム濃度の上昇が有意に認められた (4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L13;  $195.3 \pm 32.1$  nM and  $215.3 \pm 87.7$  nM for vehicle and OligoFL;  $p < 0.05$ , 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21;  $195.1 \pm 40.7$  nM and  $362.6 \pm 178.3$  nM for vehicle and OligoFL;  $p < 0.001$ , 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L27;  $199.2 \pm 32.1$  nM and  $218.2 \pm 106.8$  nM for vehicle and OligoFL;  $p < 0.05$ ; Welch's *t*-test)。キメラ受容体非発現の NIH3T3 細胞に OligoFL を投与した場合にはカルシウム濃度上昇は認められなかった ( $197.9 \pm 37.0$  nM and  $196.4 \pm 44.5$  nM for vehicle and OligoFL; Welch's *t*-test;  $p > 0.05$ )。この結果は人工リガンドによってキメラ受容体を介した細胞内シグナルの誘導が可能であることを示している。4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L13 や 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L27 を発現させた細胞では数 10 nM のカルシウム濃度の上昇しか観察されなかったのに対し、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 を発現させた細胞では 160 nM の濃度上昇を示し、より大きなカルシウム濃度上昇が観察された。この結果から本研究で作製したキメラ受容体の中では細胞内シグナルを誘導する上で 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 が、最適なキメラ受容体であることが示された。今後は 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 のキメラ受容体を用いて検討を行うことにした。

4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 について、細胞内カルシウム濃度上昇以外の細胞内シグナ

ルについても誘導可能であるかどうかを調べるために、抗リン酸化抗体を用いてウェスタンブロット法を行い、キメラ受容体の自己リン酸化を評価した。vehicle を投与した場合に比べ OligoFL を投与した場合にキメラ受容体の強いリン酸化シグナルが見られた (Fig. 4C)。これらの結果は人工リガンドとキメラ受容体を組み合わせることで、内在性の受容体と同様に対象とする受容体の下流の細胞内シグナルの活性化の調節が可能であることを示唆している。

### 1.3-4 TrkB キメラ受容体の活性化による細胞内シグナル誘導

キメラ受容体と人工リガンドを組み合わせた細胞内シグナルの活性化法が、RTK の人為的な活性化法として拡張が可能であるかどうか確かめるため、RTK の一つである TrkB (別名 Neurotrophic tyrosine kinase receptor: Ntrk2) についてもキメラ受容体を作製し、細胞内のシグナルの評価を行った。そのために、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 の PDGFR $\beta$  を TrkB と置き換えたキメラ受容体 4M5.3- $\Delta$ TrkB /L21 を作製した。細胞内シグナル誘導の成否を、キメラ受容体の自己リン酸化とその下流シグナルである細胞内カルシウム濃度上昇に着目して評価した。キメラ受容体のリン酸化については、4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 を発現させた NIH3T3 細胞でウェスタンブロット法により確認した。vehicle を投与した場合と比べ OligoFL を投与した場合には、TrkB キメラ受容体の強いリン酸化シグナルが認められた (Fig.

5A)。この結果は、TrkB キメラ受容体でも OligoFL を介した自己リン酸化の誘導が可能であることを示している。

続いて、細胞内カルシウム濃度上昇を誘導可能であるかどうかを 4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 を発現させた NIH3T3 細胞で調べた。10 nM の OligoFL を投与した場合には、投与後 3 分後からカルシウム濃度が上昇し始め、5 分後に最大濃度に達した。カルシウム濃度上昇は OligoFL の投与後、5 分後から 8 分後まで維持された (Fig. 6A, B)。vehicle を投与した場合には、細胞内のカルシウム濃度変化は観察されなかった。TrkB キメラ受容体を用いた実験結果から、キメラ受容体と人工リガンドを組み合わせた細胞内シグナルの活性化のシステムが様々な RTK の活性化に適応可能であることが示唆された。

TrkB は神経細胞の分化や生存などの生理作用を持つことが知られている<sup>7</sup>、そこで神経細胞でもキメラ受容体が機能するかどうかを確かめるため、4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 を神経細胞に発現させ、キメラ受容体由来のシグナルの評価を行った。まず TrkB キメラ受容体の Y516 残基のリン酸化について、ウエスタンブロット法にて評価を行った。vehicle を投与した場合に比べ 10 nM の OligoFL を投与した場合に、キメラ受容体の強いリン酸化シグナルが確認された (Fig. 5B)。さらに Y516 残基のリン酸化に伴う Ras の活性化の下流シグナルである MAP 経路<sup>52</sup> の Erk1/2 の活性化について、抗 Erk1/2 抗体を用いたウエスタンブロット法にて



評価を行った。vehicle を投与した場合に比べ 10 nM の OligoFL を投与した場合には、Erk1/2 の強いリン酸化シグナルが確認された (Fig. 5B)。

さらに PI3K-Akt 経路の活性化をキメラ受容体の活性化によって誘導することが可能であるかどうかを検証した。ここでは PI3K を介して産生される Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) に特異的に結合する Akt の PH ドメインの PIP<sub>3</sub> 依存的な細胞膜移行を、Akt-PH に GFP を融合させた Akt-PH GFP<sup>53</sup> の細胞膜近傍への移行を指標にして評価を行った。4M5.3-ΔTrkB/L21 を発現させた細胞では OligoFL を投与することで GFP の膜近傍への集積が見られた (Fig. 7B, C)。一方、キメラ受容体を発現していない細胞では OligoFL の投与を行っても 12 分間に渡って GFP の局在変化は見られなかった。以上の神経細胞を用いた実験結果から、キメラ受容体と人工リガンドを組み合わせることで、神経細胞でも複数の細胞内シグナル経路を活性化可能であることが示された。

### 1.3-5 光依存的な受容体シグナル活性化

フルオレセインを用いた人工リガンドによって、キメラ受容体の活性化を制御できることが示されたので、次に光照射を用いて細胞外の人リガンドの濃度を任意の時間で上昇させることにより、キメラ受容体活性化の時間的な制御を試みた。OligoFL のフルオレセインをケイジドフルオレセインと置き換えた複

合体 (cagedOligoFL) を作製し、キメラ受容体を発現させた細胞の細胞外液中に加える。ここで、UV 光照射を行うことで cagedOligoFL の保護基を外し、OligoFL を産生させることで、キメラ受容体の二量体化を介する下流シグナルの活性化を誘導するという制御系である (Fig. 9A)。

ケイジドフルオレセインを光照射することで産生するフルオレセインが、キメラ受容体に結合可能であるかどうかを検証した。4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 発現細胞の細胞外液中にビオチン化ケイジドフルオレセインを投与した。ここで UV 光照射を行い、洗浄した後に、ローダミンを標識したストレプトアビジンを投与し、細胞膜上のローダミンの蛍光強度を定量することで、キメラ受容体に結合したビオチン化フルオレセイン量の評価を行った。ビオチン化ケイジドフルオレセイン投与を行い、UV 光照射を行った場合に細胞膜上のローダミンの蛍光が確認された (Fig. 8A, B)。一方、ビオチン化ケイジドフルオレセインの投与を行わず、UV 光照射も行わない場合や、ビオチン化ケイジドフルオレセイン投与を行ったが、UV 光照射を行わない場合にはローダミンに由来する蛍光が細胞膜上に観察されなかった。この結果はケイジドフルオレセインは保護基がついた状態ではキメラ受容体との結合能を有さないが、UV 光照射によって保護基を外すことで初めてキメラ受容体との結合能を有するようになることを示している。

光照射依存的に産生されるフルオレセインによって受容体の活性化が可能

であるかどうかを検証するために、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 発現 NIH3T3 細胞または非発現 NIH3T3 細胞に対して、cagedOligoFL 存在下で、UV 光照射を行った。cagedOligoFL を投与した後に、UV 光照射を行った場合は受容体のリン酸化シグナルが確認された (Fig. 9B)。一方、キメラ受容体非発現細胞や cagedOligoFL 投与のみを行った場合や、UV 光照射のみを行った場合では受容体のリン酸化は観察されなかった。また 4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21 発現 NIH3T3 細胞においても同様に cagedOligoFL を投与し、UV 光照射を行った場合に、キメラ受容体のリン酸化シグナルが確認された (Fig. 9C)。

さらに受容体の下流シグナルの活性化を誘導できているかどうかを検証するために、カルシウムイメージングによる細胞内カルシウム濃度の評価を行った。4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 発現 NIH3T3 細胞または非発現 NIH3T3 細胞に対し cagedOligoFL を投与した後に、UV 光照射を行った。その結果、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 発現細胞は非発現細胞に比べ、UV 光照射 8 分後の細胞内カルシウム濃度が有意に増加していた (Fig. 10A;  $-0.03 \pm 0.20$  and  $1.57 \pm 1.47$  for control and 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21, respectively; Welch's *t*-test;  $p < 0.001$ )。4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 発現細胞は UV 光照射前はごく一部の細胞 (2.2%; 2 細胞/92 細胞) でしか濃度上昇が観察されないのに対し、UV 光照射を行うことによって、劇的に一過性のカルシウム濃度上昇を示す細胞が増えた (Fig. 10B, 91%; 84 細胞/92 細胞)。キメラ受容体非発現細胞で

は UV 光照射前も照射後もほとんどカルシウム濃度上昇は観察されなかった

(3.4%; 3 細胞/89 細胞)。これらの結果は、キメラ受容体とケイジド人工リガンドを組み合わせた系で、受容体の活性化の制御が可能であることを示している。

### 1.3-6 局所的な受容体シグナル活性化

望んだ空間局所でキメラ受容体の活性化を制御する方法論の構築を行った。

ここまでの方法では cagedOligoFL は細胞外液中に浮遊しており、ケイジの解除を限局した場で行っても、産生された OligoFL は細胞外液中に拡散してしまい、限局した場でキメラ受容体を活性化させることはできない。この問題を解決するために、ケイジドリガンドとしてキャリアタンパク質に複数のケイジドフルオレセインと一つの保護基のついていないフルオレセインを配した化合物

(Fl-cagedOligoFL) を細胞膜上に固定するために採用した。FL-cagedOligoFL は scFv と結合可能なフルオレセインを一分子しか持たないので、キメラ受容体と是一对一の量比で結合するが、受容体間の架橋は惹起されず、受容体の二量体化は誘導されない。細胞外液に Fl-cagedOligoFL を投与した後に、キメラ受容体と結合していない Fl-cagedOligoFL を洗浄する。ここで光照射を局所的に行うことで、光照射を行った範囲にあるリガンドの保護基のみを外し、OligoFL を産生させることで、受容体の二量体化を誘因し、限局した場所での細胞内シグナル

の誘導を惹起できると期待した (Fig. 11A)。ここではキャリアタンパク質に分子だけフルオレセインを標識することが必要であるため、内在性のシステインを一つしか持たない AraF をキャリアタンパクとして採用した。しかしながら AraF の内在性のシステインは構造的に標識を受けにくい場所にある。そこで、AraF の内在性の 64 番目のシステイン残基をアラニンに変え、15 番目のプロリン残基をシステインに変えることで、構造上システインを標識しやすい変異体 (AraF\_C78A\_P15C) を作製した。実際に AraF の C78A/P15C 変異体はヨードアセタミドフルオレセインで 68 % が標識され、標識する上で適した変異であることが確認された。続いて、5-Carboxyfluorescein-Bis-(5-Carboxymethoxy-2-Nitrobenzyl) Ether,  $\beta$ -Alanine-Carboxamide, Succinimidyl Ester で AraF の C78A/P15C 変異体の 1 級アミノ基を標識して FL-cagedOligoFL を得た。

FL-cagedOligoFL を用いたキメラ受容体の活性化の誘導の成否を検証するため、キメラ受容体のリン酸化誘導について抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法で評価を行った。4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 を発現した NIH3T3 細胞に対し FL-cagedOligoFL を投与し、洗浄した後に、UV 光照射を 200 秒間行った。UV 光照射を行った細胞について抗リン酸化抗体を用いて、ウェスタンブロット法を行った。その結果、光照射と FL-cagedOligoFL 投与に依存した受容体のリン酸化シグナルが観察された (Fig. 11B)。この結果は FL-cagedOligoFL を用いた受容体の

活性化制御を UV 光照射依存的に可能であることを示している。

次に局所的な受容体由来シグナル誘導が行えるかどうかを、細胞内カルシウム濃度変化で評価した。4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 発現 NIH3T3 細胞に FL-cagedOligoFL を投与し、洗浄した後に、直径 50  $\mu$ m の範囲に UV 光照射を行った。UV 光照射を行う前は、自発的な一過性のカルシウムシグナルはほとんど観察されなかった (1.4 %; 1 細胞/ 76 細胞) のに対し、800 ミリ秒の UV 光照射後は照射した範囲の細胞でカルシウム濃度上昇が観察された (91%; 10 細胞/ 11 細胞)。光照射範囲外の細胞ではカルシウム濃度上昇は観察されなかった (65 細胞; Fig. 12)。また保護基の付いていないフルオレセインの UV 光照射に由来するカルシウム濃度上昇が生じないことの確認を行った。4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 発現 NIH3T3 細胞に FL-cagedOligoFL に替えて AraF-FL を投与した。UV 光照射を行ったが、カルシウム濃度上昇は観察されなかった (11 細胞; Fig. 12)。キメラ受容体非発現 NIH3T3 細胞でも同様に FL-cagedOligoFL 投与し、光照射を行ったが、細胞内カルシウム濃度上昇は観察されなかった (4 細胞)。以上の結果より、光照射とケイジド人工リガンドとキメラ受容体を組み合わせた、光依存的な RTK の活性化手法にて、RTK の活性化を時空間的に制御することが可能であることが示された。

## 1.4 考察

本研究では、フルオレセインを有した人工リガンドと抗フルオレセイン抗体を配した RTK のキメラ受容体を組み合わせることで、RTK の下流の生化学反応である RTK の自己リン酸化、細胞内カルシウム濃度上昇、Erk1/2 のリン酸化、PI3K-Akt 系の活性化に成功した。また、ケイジドフルオレセインを有した人工リガンドとキメラ受容体を組み合わせることで、光照射依存的な RTK の自己リン酸化や細胞内カルシウム濃度上昇の誘導を実現した。さらにフルオレセインを一つだけ配したケイジド人工リガンドを用いることでリガンドをキメラ受容体に固定し、ケイジド人工リガンドを光依存的に活性化させることで、光照射を行った範囲の細胞でのみ細胞内カルシウム濃度上昇を誘導することに成功した。人工リガンドを用いて RTK の活性化を誘導する方法はいくつか報告されているが<sup>15,42-45</sup>、限局した場の細胞でのみ RTK の活性化を光照射によって誘導するシステムは確立していなかった。

外因性の受容体を発現させた場合には、リガンド非存在下でもシグナルが生じてしまうということが報告されている<sup>46,54-56</sup>。しかしながら、本研究で作製したキメラ受容体を発現した細胞では、リガンド非依存的なカルシウム濃度変化は、非発現細胞と同程度しか観察されず (Figs. 4, 6, 10)、リガンド依存的なシグ

ナル制御を行う上で適したキメラ受容体であることが示唆された。さらに PDGFR $\beta$  から scFv までのリンカーのアミノ酸数を 13、21、27 と変えた受容体 (4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L13、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L27) を細胞に発現させ、 OligoFL に対する応答性を細胞内カルシウム濃度変化で評価した。受容体の発現量やフルオレセインに対する結合能に差は観察されなかったが、中間の長さである 4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 を発現させた場合に最も大きな濃度上昇を示した。この結果から本研究で作製した受容体の中では、4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21 がリンカーの長さや柔軟性が適しているため、細胞内シグナルを誘導する上で、最も適したキメラ受容体であることが示された。

本研究では、光依存的に活性化するリガンドとして、タンパク質をキャリアとした人工リガンドを作製した。しかしタンパク質をキャリアとしたリガンドでは、標識されているフルオレセイン間の距離を制御することが難しいため、キメラ受容体を架橋する際のキメラ受容体間の距離を制御することが困難である。この問題はフルオレセイン間のリンカーを調節した人工リガンドを有機化学的に作製することによって解決が可能である。有機小分子からなる人工リガンドであれば、キメラ受容体の架橋を行う上で、最適な長さ、極性、角度を有するリンカーを設計することが可能であり、より効率的なキメラ受容体の活性化が可能になると期待される。有機小分子リガンドであれば組織への浸透性や



細胞透過性が良いため、脳スライス等のより複雑な組織でのタンパク間相互作用の制御を行う上で非常に有用なツールになると期待できる。

RTK はリガンドが結合することによって、受容体間の架橋、二量体化が惹起され、細胞内シグナルが活性化され、続いてエンドサイトーシス機構によって細胞内へ内在化する<sup>57-60</sup>。キメラ受容体の架橋に直接関与する、抗原-抗体のペアにはフルオレセイン-抗フルオレセイン scFv (4M5.3, Kd=270 fM) を採用し、内在性のリガンド-RTK 間の結合 (Kd=20 pM~2 nM)<sup>61-63</sup> より強い結合が可能となるように設計した。より強く受容体の架橋を行っているので、受容体のシグナルを不活性化する機構が無ければ、細胞内シグナルは長く持続する可能性が考えられるが、Fig. 10 のように、活性化したキメラ RTK 由来のシグナルは内在性のシグナルと同様に、徐々に減弱していく。この結果から、キメラ受容体のシグナルを不活性化する機構が働いていると推察される。

BDNF-TrkB 系シグナル依存的なスパイン形態の可塑的な変化が報告され<sup>64</sup>、スパイン形態と TrkB シグナルの関係が注目を集めている。一つのスパインで活性化された TrkB シグナルはそのスパインのみの形態変化に寄与するのか、近傍のスパインあるいは細胞全体のスパインでの形態変化にも寄与しているのか、またそれがどのようなタイムコースで進行するのかという問題は未解明である。この問題を解決するには単一スパインでのみ TrkB シグナルを活性化させ、

その近傍のシナプスの観察を行わなければならなかったが、技術的な障壁があり、実現していない。単一スパインレベルでの TrkB シグナルの活性化手段として、本研究で確立した手法を用いることで、一つのスパインに由来する TrkB シグナル活性化の結果生じる形態変化が、空間的にどのような範囲に影響を及ぼすのかといった局所における TrkB シグナルの役割の研究が可能になると考えられる。

TrkB の内在性のリガンドである BDNF の発現量や分泌量が、統合失調症・うつ病・発達障害等の様々な精神神経疾患に影響を与えていると示唆されている<sup>65</sup>。自閉症患者で変異が見つかった分泌促進因子 CAPS2 のノックアウトマウスや自閉症患者で見出だされた変異を発現させたマウスでは、自閉症様の行動を示し、軸索からの BDNF 分泌が減少した。この結果から、特定の自閉症患者においては BDNF が健常者と異なったパターンで分泌され、神経ネットワークの形成に異常をきたす可能性が示唆された<sup>66,67</sup>。このような精神疾患モデルマウスに本研究で確立した RTK の活性化法を適用し、内在性のリガンドと比べ脳組織への浸透性が高い有機小分子リガンドと *in vivo* での光照射法<sup>68</sup>を組み合わせることで、いつ・どの領域での BDNF-TrkB シグナルが疾患の発症に寄与しているのかを明らかにできると期待される。

本法の基本原理は、PDGFR $\beta$ 、TrkB に適用できたように他の RTK 活性制御

にも応用可能であると考えられる。また **RTK** はホモ二量体のみではなく、**PDGFR $\alpha$**  と **PDGFR $\beta$** 、**EGFR** と **ErbB2** といった同一ファミリー内のヘテロ二量体も形成しており、特異的な細胞内シグナルを誘導することが知られている<sup>69,70</sup>。フルオレセインとは異なる抗原とフルオレセインをつなげたリガンドと、対応する scFv 融合キメラ受容体を用いることで、**RTK** のヘテロ二量体のシグナル制御にも応用できる可能性がある。

## 第二章 「HER2 内在化誘導薬の探索」

## 2.1 序文

近年の研究成果により疾患原因分子が多数明らかになったため、創薬研究分野において、特定の分子に対して直接作用する化合物を探索するスクリーニングが盛んに行われている。例えば、EGFR、VEGFR、PDGFR といった RTK や、Akt、MEK、PI3K といったプロテインキナーゼは細胞のがん化やがんの悪性化と密接に関わっていることから、これらの分子を標的とした治療薬の探索・開発が行われている<sup>71-75</sup>。

EGFR ファミリーの Human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) タンパク質は分子量 185kDa の糖タンパク質で胃癌、乳癌、卵巣癌等で過剰発現が認められ、細胞増殖の制御に深く関わっており、癌患者の予後を悪化させる要因である<sup>18,20,21</sup>。1980 年代後半から 1990 年代前半までの研究により、乳癌患者の 25~30% では HER2 が過剰に発現しており、HER2 が過剰発現している癌では進行が早く、また転移能が高く、化学療法やホルモン療法が奏功しないことが知られている<sup>22,76</sup>。免疫組織化学染色や蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション検査によって、HER2 の過剰発現もしくは HER2 遺伝子の増殖が確かめられた乳癌に対しては、HER2 の機能を抑制させることによって、乳癌の増殖を抑える治療方針が有効であるとされている<sup>22,76</sup>。

現在、抗 HER2 ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ（ハーセプチン<sup>®</sup>）が HER2 の分子標的薬として用いられて良好な治療成績が得られている。トラスツズマブによる作用機序の一つに HER2 の内在化誘導が考えられており、HER2 を機能抑制する上で有効な作用を有している<sup>77-79</sup>。しかしながら、トラスツズマブはタンパク質であるため品質管理が困難で、コストは高い。この点において安定性に優れ、大量合成が容易な小分子化合物の医薬は、品質管理面や生産のコスト面で望ましい。

現在 HER2 陽性転移性乳癌の治療薬として第 II 相試験まで進んでいる医薬品として 17-AAG がある<sup>23</sup>。17-AAG はアニサマイシン系の抗生物質であるゲルダナマイシンの誘導体であり、Hsp90 の阻害薬である<sup>80</sup>。シャペロンタンパク質である Hsp90 は HER2 の正常なコンフォメーションを維持する因子として働いている<sup>81</sup>。HER2 過剰発現の癌細胞において、17-AAG は Hsp90 の機能を阻害し、HER2 の正常なコンフォメーションの維持を障害させることで、細胞膜上の HER2 を内在化させ、分解系に輸送し、抗腫瘍効果を示す<sup>80-82</sup>。

トラスツズマブや 17-AAG のように、細胞膜上の HER2 を内在化させることは、HER2 を機能抑制させることは治療戦略として、有効である。そこで HER2 機能抑制薬を開発するため、HER2 の内在化を誘導する化合物を迅速かつ簡便に探索する新規のセルベースのスクリーニング系の構築に取り組んだ。HER2 はエ

エンドサイトーシスされると細胞内の酸性小胞へ内在化するが、細胞外の環境 (pH 7.4) と比べ細胞内の酸性小胞は pH が低い (pH 4~6)。そこで HER2 の内在化を評価する方法として、pH が低い時に強い蛍光を示す pH 感受性の蛍光プローブで細胞膜上の HER2 を特異的に標識し、HER2 の細胞内移行を蛍光強度変化として評価する方法が有効であると考えた。ここで蛍光強度の増大をもたらす化合物を選別することで、HER2 の細胞内への移行を誘導する化合物を得る系が構築出来ると期待した。市販の蛍光性 pH 色素である CypHer 5 は、細胞内の酸性小胞を検出するために開発された  $pK_a$  が 6.1 の赤色励起性のシアニン系色素であり、中性から酸性に変化することで蛍光性を示す<sup>83</sup>。しかしながら、CypHer 5 を用いたイメージングによるセルベースのスクリーニングでは、優秀なスクリーニング系の基準である  $Z'$ -factor $>0.5$  の条件を満たしておらず<sup>84</sup>、スクリーニングに応用することは困難であることが予想される。そこでバックグラウンドが小さく、光褪色に優れたローダミン骨格を持ち、ダイナミックレンジの大きい pH 感受性の蛍光色素を開発し、HER2 を特異的に標識することで、高感度でエンドサイトーシスの検出が可能となり、迅速かつ効率的に HER2 の細胞内移行を評価することが可能な構築が可能になるスクリーニング系と考えた。

本研究では数十万以上の規模の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングに適用可能な、受容体の内在化を指標とする優れたセルベーススクリーニング

グ系の構築を目指した。構築したスクリーニング系を用いて 10,957 のライブラリー化合物のスクリーニングを行った。続いて得られたヒット化合物を再現性試験及び顕微鏡を用いたイメージング試験を行うことで、HER2 内在化を誘導する化合物の絞り込みを行った。ここで得られたヒット化合物を通じて、本スクリーニング系が HER2 の内在化を評価する優れた系であることを実証した。



## 2.2 方法

### 細胞

卵巣腫瘍 SKOV3 細胞 (ATCC) の培養は 10% の FBS を加えたロズウェルパーク記念研究所培地 (Roswell Park Memorial Institute 1640: RPMI 1640; ナカライ) 中にて、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で培養を行った。

### pH 感受性蛍光色素の pH 依存的な蛍光変化

pH 感受性蛍光色素 (RhPM、化合物 **5**) の合成は付録の scheme 1 で示した。終濃度 1 μM の RhPM を溶解した各 pH のリン酸緩衝液を用意し、365 nm の紫外領域光を照射しデジタルカメラ (富士フィルム、FinePix F70EXR) で撮影した。

### pH 感受性蛍光色素の pH 依存的な蛍光量子収率の変化の測定

終濃度 500 nM の RhPM の各 pH の緩衝液を用意し、発光スペクトルを分光光度計で測定した。ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式に従ってデータのフィッティングを行い、pK<sub>a</sub> 値を算出した。

## Halo-HER2 発現プラスミドの作製

Halo タグをコードしている cDNA フラグメントは Halo-F と Halo-R のプライマーペア (Table 2) を用いた PCR によって増幅した。HER2 をコードする cDNA フラグメントは HER2-F と HER2-R のプライマーペアを用いた PCR によって CMV HER2 WT (Addgene) より増幅した。増幅した Halo タグをコードしている cDNA フラグメントと HER2 をコードしている cDNA フラグメントを精製後、Halo-F と HER2-R のプライマーペアを用いたオーバーラップエクステンション PCR によって増幅を行い、Halo タグと HER2 をコードしている DNA フラグメントを得た。また HER2ss-F1、HER2ss-F2、HER2ss-R1、HER2ss-R2 の 4 つのオリゴ DNA をライゲーションさせ、BamHI、HindIII で切断し、pMX に挿入した (pMX-HER2ss)。Halo タグと HER2 をコードしている cDNA フラグメントを精製した後に HindIII、SalI で切断し、pMX-HER2ss の HindIII/SalI サイトに挿入した (pMX-Halo-HER2)。

## ウイルス作製及び SKOV3 細胞への感染

ウイルスパッケージング細胞 (HEK293T) に pMX-Halo-HER2 とレンチウイルスパッケージングプラスミド pMD2.G (Addgene)、pVPack-GP (Agilent) を遺伝子導入し、ウイルスを回収し、ウイルス液を SKOV3 細胞に感染させ、

Halo-HER2 安定発現 SKOV3 細胞を作製した。Halo-HER2 安定発現 SKOV3 細胞は Halo-HER2 発現量を指標にクローニングを行い、高発現クローンを樹立し、以降の試験に用いた。

#### 17-AAG による Halo-HER2 内在化イメージング試験

RhPM Halo リガンド (化合物 **1**) の合成は付録の scheme 1 で示した。SKOV3 細胞または Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞を 10%FBS 含有 RPMI1640 で懸濁し、 $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度でプラスチックボトムプレートに播種し、5 % CO<sub>2</sub>、37 °C の条件で一晩培養を行った。終濃度 30 nM の RhPM Halo リガンド、終濃度 1 μM の 17-AAG (Selleck) を加え 5 % CO<sub>2</sub>、37 °C の条件で 5 時間培養を行った。培養後 2%FBS 含有 RPMI1640 で洗浄し、終濃度 20 mM の NH<sub>4</sub>Cl で細胞内小胞のアルカリ化を行った。蛍光画像を励起フィルタ 535-555 nm (オリンパス)、565 nm ダイクロイックミラー (オリンパス)、蛍光フィルタ 570-625 nm (オリンパス) を用い、水浸対物レンズ (×40、NA 0.80、オリンパス)、冷却 CCD カメラ (Luca、Andor) を用いて取得した。画像を ImageJ ソフトウェアにて解析した。

#### 内在化した Halo-HER2 と Lysotracker との共局在の評価

Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞を 10%FBS 含有 RPMI1640 で懸濁し、 $6 \times$

10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>の密度でカバーガラス上に播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件で一晩培養を行った。終濃度 30 nM の RhPM Halo リガンド、終濃度 5 μM の 17-AAG を加え 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件で 4 時間培養を行った。更に終濃度 100 nM の Lysotracker Green (Invitrogen) を加え 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件で 1 時間培養を行った。培養後 2%FBS 含有 RPMI1640 で洗浄した。Lysotracker と RhPM Halo リガンドの蛍光像は油浸対物レンズ (×100、NA 1.40、オリンパス)、冷却 CCD カメラ (Luca、Andor) を用いて同時に画像を取得した。Lysotracker の蛍光像は青色発光ダイオード (LXK2-PB14-Q00、Philips)、励起フィルタ 448-488/ 539-568 nm (Semrock)、493/ 574 nm ダイクロイックミラー (Semrock)、570 nm ダイクロイックミラー (Semrock)、蛍光フィルタ 499-529 nm (Semrock) を用いて取得した。RhPM Halo リガンドの蛍光像は緑色発光ダイオード (LXK2-PM14-U00、Philips)、励起フィルタ 448-488/ 539-568 nm (Semrock)、493/ 574 nm ダイクロイックミラー (Semrock)、570 nm ダイクロイックミラー (Semrock)、蛍光フィルタ 575-625 nm (オリンパス) を用いて取得した。画像を ImageJ ソフトウェアにて解析した。

#### 化合物ライブラリー

東京大学創薬オープンイノベーションセンターより、ライブラリーの 10,957

化合物を提供を受けた。化合物ライブラリーは LOPAC 1280 と Prestwick Chemical Library を基とした薬理活性既知の化合物ライブラリー (1,277 化合物) 及び薬理活性報告のある化合物に類似の化合物と全くのランダム選択化合物の双方について構造多様性を考慮したコアライブラリー (9,600 化合物) を中心としたライブラリーである。

#### 384 ウェルプレートを用いた HER2 内在化誘導薬のスクリーニング

化合物を希釈するための 384 ウェルプレートの各ウェルに各濃度の評価対照の試験化合物、17-AAG または vehicle (Dimethyl sulfoxide: DMSO) を 0.3  $\mu\text{l}$  ずつ、500  $\mu\text{M}$  の RhPM Halo リガンドを 7.5 nl ずつ分注した。Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞を 2 %FBS 含有 RPMI1640 で懸濁し、 $2 \times 10^5$  cells/ml 細胞懸濁液を 50 $\mu\text{l}$  ずつ 384 ウェルプレートに播種し、5 %  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  の条件で一晩培養を行った。化合物を分注しておいた希釈用の 384 ウェルプレートに 19.7  $\mu\text{l}$  ずつ 0.1 %BSA 含有 HEPES 緩衝液 (6 mM HEPES、pH 7.4) を加え、化合物を攪拌した後に細胞を接着させた 384 ウェルプレート 10  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}\text{C}$  の条件で 5 時間培養を行った。培養後、35  $\mu\text{l}$  ずつ培地を除き、35  $\mu\text{l}$  ずつ洗浄緩衝液 (20 mM HEPES、150 mM 塩化ナトリウム、pH8.6) を加えるという操作を二度行った。蛍光マイクロプレートリーダー (PHERAstar, BMG, 励起 : 540 nm, 吸収 : 590 nm)

で蛍光測定を行い HER2 の内在化に伴う蛍光強度の増加を評価した。アルカリ化 HEPES 緩衝液 (20 mM HEPES、150 mM 塩化ナトリウム、50 mM 塩化アンモニウム、1  $\mu$ M バフィロマイシン、pH 8.6) を 10  $\mu$ l ずつ加えた後に、蛍光マイクロプレートリーダー (PHERAstar, BMG, 励起 : 540 nm, 吸収 : 590 nm) で蛍光測定を行った。384 ウェルプレートへの液の分注操作は Biomek FX (Beckman coulter) を用いて行った。アルカリ化緩衝液処理の前後の蛍光値の差 ( $\Delta F$ ) を求めた。

17-AAG と vehicle によるスクリーニング系の確認試験の際には終濃度 5  $\mu$ M 17-AAG と vehicle をそれぞれ 160 ウェル、192 ウェルずつ実施した。

化合物スクリーニングを行う際には、終濃度 5  $\mu$ M 17-AAG (陽性対照) と vehicle (DMSO、陰性対照) を 16 ウェル、試験化合物を 320 ウェルずつ実施した (Fig. 18A 参照)。Z'-factor は陽性対照群と陰性対照群の  $\Delta F$  の平均値  $\Delta F_{\text{posi}}$ 、 $\Delta F_{\text{nega}}$  と標準偏差  $SD_{\text{posi}}$ 、 $SD_{\text{nega}}$  を求め、(式 1) を用いて算出した。

$$Z' - \text{factor} = 1 - 3 \times \frac{SD_{\text{posi}} + SD_{\text{nega}}}{|\Delta F_{\text{posi}} - \Delta F_{\text{nega}}|} \quad \text{-----} \quad \text{(式 1)} \quad ^{85}$$

Z'-factor > 0.5 であったプレートを正常にスクリーニングが実施された判断し、Z'-factor < 0.5 であったプレートについてはスクリーニングの過程で何らかのエラーがあったとして結果を採用せず、再度スクリーニングを実施した。

各試験化合物の  $\Delta F$  を  $\Delta F_{\text{compound}}$  とし、

$$\text{Activity (相対活性、\%)} = \frac{\Delta F_{\text{Compound}} - \Delta F_{\text{nega}}}{\Delta F_{\text{posi}} - \Delta F_{\text{nega}}} \times 100 \quad \text{----- (式 2)}$$

を算出し、各化合物による Halo-HER2 の内在化誘導の程度を示す指標とした。

10,957 化合物のスクリーニングで 20%以上の相対活性を示した上位の 160 化合物について上位のものから Compound1~Compound160 と称した。

10,957 化合物のスクリーニングの際は試験数 N = 1、再現性試験と用量反応性試験の際には試験数 N = 4 で行った。

#### Halo-HER2 内在化イメージングによる試験化合物の評価

SKOV3 細胞または Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞を 10%FBS 含有 RPMI1640 で懸濁し、 $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度でプラスチックボトムプレートに播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件で一晩培養を行った。終濃度 30 nM の RhPM Halo リガンドと終濃度 5 μM の各試験化合物を加え 5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件で 5 時間培養を行った。培養後に 2%FBS 含有 RPMI1640 で洗浄し、終濃度 20 mM の塩化アンモニウムで細胞内小胞をアルカリ化した。細胞の蛍光画像を励起フィルタ 535-555 nm (オリンパス)、565 nm ダイクロイックミラー (オリンパス)、蛍光フィルタ 570-625 nm (オリンパス) を用い、水浸対物レンズ (×40、NA 0.80、オリンパス)、CCD カメラ (Luca、Andor) を用いて取得した。画像を ImageJ ソフトウェアにて解析した。塩化アンモニウム処理前後の蛍光値の差を ΔF とし HER2 内在

化の指標とした。

#### 細胞膜上の Halo-HER2 の定量

Alexa647 Halo リガンド (化合物 **10**) の合成は付録の Scheme 2 で示した。

SKOV3 細胞または Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞を 10%FBS 含有 RPMI1640 で懸濁し、 $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度でプラスチックボトムプレートに播種し、5 % CO<sub>2</sub>、37 °C の条件で一晩培養を行った。終濃度 5 μM の各試験化合物を加え 5% CO<sub>2</sub>、37 °C の条件で引き続き 5 時間培養を行った。培養後に 2%FBS 含有 RPMI1640 で洗浄し、終濃度 1 μM の Alexa647 Halo リガンドまたは vehicle を室温で 10 分処理した。2%FBS 含有 RPMI1640 で洗浄後、4% パラフォルムアルデヒドで細胞を固定した。PBS で洗浄後、蛍光画像を励起フィルタ 608-648 nm (Semrock)、660 nm ダイクロイックミラー (Semrock)、蛍光フィルタ 672-712 nm (Semrock) を用い、乾燥系対物レンズ (×10、NA 0.30、オリンパス)、CCD カメラ (Luca、Andor) を用いて取得した。画像を ImageJ ソフトウェアにて解析した。各試験化合物と Alexa647 Halo リガンド処理を行った SKOV3 細胞の蛍光値をバックグラウンドの蛍光値とし、各試験化合物処理を行った細胞の蛍光値とバックグラウンドの蛍光値の差を算出し、Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞に vehicle と Alexa647 Halo リガンド処理を行った対照群の蛍光値を 100% とし、各化合物処理を行った



Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞の相対的な蛍光値を算出した。

## 2.3 結果

### 2.3-1 HER2 の内在化の検出法の設計

細胞外の中性環境下 (pH 7.4) にある時は無蛍光性で、細胞内の酸性小胞 (pH 4-6) に取りこまれた際に初めて蛍光性となる特性を有する蛍光プローブで HER2 を標識することで、スクリーニングにおいて、HER2 の内在化を特異的に検出することが可能であると考えた (Fig. 13)。そこで細胞内での高い S/N 比を実現するために、細胞外環境 (pH 7.4) で無蛍光性であり、酸性小胞内 (pH 4-6 程度) で強蛍光性で示す新規の pH 感受性色素の開発を行った。

具体的にはローダミンを蛍光団とし、メチルピペラジンを pH 感受性部位として配した蛍光色素 (RhPM) を開発した (Fig. 14A)。RhPM は  $pK_a$  を 5.8、7.0 に持ち、酸性化に伴い、各フォームにおいて蛍光量子収率が 0.012、0.205、0.702 と変化し、細胞外 (pH 7.4) ではほとんど蛍光を持たず、細胞内の酸性小胞 (pH 4-6) で強い蛍光を持つ (pH 5.0 と pH 7.4 の蛍光比: 9.1 倍) という特性を示した (Fig. 14B)。

蛍光プローブを標識した抗体により受容体を標識する方法<sup>83</sup>では、抗体のクロスリンクによって受容体の二量体化を引き起こし、受容体の人為的な細胞内取り込みを誘導してしまう。この問題を回避するために、各受容体分子を一分子ずつ標識することを狙い Halo タグと Halo リガンドによる標識法を用いること

とし、RhPM と Halo タグリガンドをつないだ pH プローブ (RhPM Halo リガンド、Fig. 14C) を合成した。HER2 の過剰発現が知られている SKOV3 細胞に、Halo タグを融合させた HER2 (Halo-HER2) を発現させ、開発した RhPM Halo リガンドで Halo-HER2 を標識することで、スクリーニングにおいても特異的かつ効率的に Halo-HER2 の内在化を検出できると期待した。

### 2.3-2 Halo-HER2 の内在化検出

開発した RhPM Halo リガンドを用いて Halo-HER2 を特異的に標識し、Halo-HER2 の内在化を検出可能であることを検証した。Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞の細胞外液に RhPM Halo リガンド投与し、さらに HER2 の内在化を誘導することが知られている 17-AAG<sup>86</sup> の投与を行い、培養を行った後に Halo-HER2 の内在化を観察した。17-AAG 投与を行った細胞では細胞内に粒状の蛍光シグナルが確認されたが、対照の vehicle 投与を行った細胞では細胞内にわずかにしか蛍光は見られなかった (Fig. 15A)。ここで観察された粒状の蛍光シグナルは細胞外液への塩化アンモニウム投与によって、細胞内の酸性小胞をアルカリ化することでほぼ消失した。また Halo-HER2 非発現の SKOV3 細胞に 17-AAG を投与した場合には、RhPM Halo リガンドの蛍光は全く観察されなかった (Fig. 15A)。以上の結果から RhPM Halo リガンドは Halo-HER2 特異的に標識可能であり、

17-AAG 投与した際に観察された粒状の蛍光シグナルは、RhPM Halo リガンドに標識された Halo-HER2 が細胞内の酸性小胞に取りこまれ、RhPM が蛍光性となった結果観察されたシグナルであることが示唆された。続いて RhPM の蛍光強度を定量したところ、Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞に vehicle 投与を行った場合に比べ、17-AAG 投与を行った場合に有意に蛍光強度が増加することが示された (Fig. 15B;  $197.4 \pm 7.9$  and  $1124.2 \pm 27.7$  for vehicle and 17-AAG, respectively;  $p < 0.05$ )。このことから RhPM Halo リガンドを用いることで、Halo-HER2 の内在化を細胞における蛍光強度変化を指標とし、簡便に定量評価することが可能であることが示唆された。

内在化した Halo-HER2 が細胞内酸性小器官に移行しているかどうか検証した。Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞の細胞外液に RhPM Halo リガンド投与し、さらに 17-AAG の投与を行い、培養を行った後に細胞内酸性小器官のマーカーである LysoTracker を投与し、内在化した Halo-HER2 と細胞内酸性小器官の分布の比較を行った。内在化した Halo-HER2 のシグナルは 94.2 %が細胞内酸性小器官に対応するシグナルと一致した (Fig. 16)。この結果から 17-AAG によって内在化した Halo-HER2 は細胞内酸性小器官へ移行することが示された。

### 2.3-3 蛍光プレートリーダーによる Halo-HER2 内在化の検出

HER2 内在化を指標とした薬物探索をハイスループットに行うためには、迅速に大量の検体を評価出来ることが必須である。そのために蛍光プレートリーダーと 384 ウェルプレートを用いて、Halo-HER2 の内在化を蛍光強度変化を指標として簡便に評価するスクリーニング系を設計した。この系では、Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞を接着させた 384 ウェルプレートの各ウェルに、評価対象の試験化合物と RhPM Halo リガンドを投与する。ここで Halo-HER2 の内在化が誘導されれば、RhPM Halo リガンドが酸性小胞に取りこまれ、蛍光強度の増加が検出され、続いて細胞内の酸性小胞をアルカリ化処理することで蛍光強度の減少が検出される (Fig. 17)。このアルカリ化処理前後の蛍光強度の減少分 ( $\Delta F$ ) を算出することで、Halo-HER2 がどの程度内在化したのかということの評価できると期待した。

以上で設計したスクリーニング系で、384 ウェルを用いて 17-AAG を 160 ウェル、vehicle を 192 ウェル用意し、蛍光プレートリーダーでアルカリ化処理前後の蛍光強度を測定し、 $\Delta F$  を求めることで、スクリーニングの性能評価の試験を行った。 $\Delta F$  値をヒストグラムで表したところ、vehicle 投与群はシャープな分布を示しており、二群の分布は大きく分かれ、外れ値も見られなかった (Fig. 18A)。また二群間の検定を行ったところ、二群間の  $\Delta F$  の差は  $p = 2.2 \times 10^{-179}$  と

いう非常に小さな  $p$  値であった (Fig. 18B;  $1061.2 \pm 132.7$  and  $6709.9 \pm 513.4$  for vehicle and 17-AAG, respectively; Welch's  $t$ -test)。さらにスクリーニング系の優秀性を、対照の精度と陽性対照と陰性対照のダイナミックレンジを基に評価するインデックスである "Z'-factor" (2.2 方法、式 1 参照) を今回の結果から算出すると 0.66 であった。この値は、優れたハイスループットスクリーニング系の基準である Z'-factor > 0.5 を満たしており、設計したスクリーニング系が優れていることが示された。

#### 2.3-4 HER2 内在化誘導薬を探索するスクリーニング

続いて東京大学創薬オープンイノベーションセンターの 10,957 化合物からなる化合物ライブラリーを用いて、スクリーニングを実施した。化合物ライブラリーは、LOPAC 1280 と Prestwick Chemical Library を基とした薬理活性既知の化合物のライブラリー (1,277 化合物) 及び薬理活性報告のある化合物に類似の化合物と全くのランダム選択化合物の双方について、構造多様性を考慮したコアライブラリー (9,600 化合物) を中心としたライブラリーである。スクリーニングは 35 枚の 384 ウェルプレートを用いて、1 プレートに 17-AAG (陽性対照) を 16 ウェル、vehicle (陰性対照) を 16 ウェル、評価対象の試験化合物を試験数  $N = 1$  で 320 ウェルずつ配置し、実施した。スクリーニングは 35 枚の 384 ウェ

ルプレートを用いて実施した (Fig. 19A)。各プレートの陽性対照群と陰性対照群の  $\Delta F$  から Z'-factor を算出したところ 35 枚の内 33 枚で Z'-factor > 0.5 を得た。Z'-factor が 0.41、0.47 であった 2 枚についても再試験したところ、Z'-factor = 0.67、0.75 を得た (Table 3)。再試験を含め、スクリーニングで実施した計 37 プレートの内 35 プレート (94.6%) で Z'-factor は 0.5 を超え、安定したスクリーニングが実施されたことが示された。各化合物による Halo-HER2 の内在化の程度を各プレートの 17-AAG 群を基準とした相対活性で評価を行った (2.2 方法、式 2 参照)。その結果、6 種類の化合物で 50%以上の相対活性が検出され、20%以上の相対活性を示すものは 162 種類であった。(Fig. 19B)。20%の相対活性の偶発的な発生確率は 0.1%未満であり、スクリーニングによって真陽性の化合物が得られていることが示唆された。

### 2.3-5 HER2 内在化誘導薬の再現性試験

上位の 160 化合物について、スクリーニングの結果に再現性があるかを試験数を 4 に増やして再現性試験を行った。再現性試験の結果、上位の 20 位以内であった化合物では 9 化合物が再現良く 20%以上の相対活性を示した (Fig. 20)。またスクリーニングで 21 位から 160 位だった化合物で 20%を超える化合物はなかったが、各プレートの陰性対照と比べたところ、有意に大きな相対活性を示

した ( $0.00 \pm 3.26$  and  $7.08 \pm 3.71$  for vehicle;  $N = 160$  and Compound 21~160;  $N = 140$ , respectively; Welch's  $t$ -test;  $p = 1.6 \times 10^{-46}$ )。この結果から、スクリーニングで内在化を誘導する化合物を選別できていることが示された。再現性試験で 20% 以上の相対活性を示した化合物は、スクリーニング系で陽性対照として用いた 17-AAG を含め、Table 4 で示す化合物であった。

### 2.3-6 試験化合物の用量反応性試験

再現性試験で 20%以上の相対活性を示した試験化合物について、用量反応性試験を行った。Compound 2, 5 (17-AAG、Geldanamycin) では 1  $\mu$ M 付近で蛍光強度の増加が飽和したが、Compound 1, 4, 6, 9, 10, 19 (それぞれ Pyrvinium pamotate、Doxorubicin、Compound 6 : 通称なし、Withaferin A、LY-2183240、Vinorelbine) では各試験化合物の相対活性が化合物濃度に対し、直線的な増加を示した (Fig. 21)。Compound 3 (Radicicol) は試験濃度域では相対活性がほとんど変化しなかった。反応曲線から 50%効果濃度 ( $EC_{50}$ ) を求めたところ 17-AAG と Geldanamycin ではそれぞれ 74.5、326 nM であった。Radicicol は 50 nM 未満であった。これらの nM のオーダーで内在化を誘導する試験化合物は、HER2 内在化作用が既知の化合物であった。



### 2.3-7 試験化合物による Halo-HER2 内在化のイメージングによる検出

再現性試験で検出されたアルカリ化処理による蛍光強度の減少が Halo-HER2 の内在化によるのかどうかを確かめるため、蛍光イメージングを行った。RhPM Halo リガンド、続いて試験化合物の投与を行い、培養した後に細胞内の酸性小胞をアルカリ化し、アルカリ化前後の蛍光画像を取得した。17-AAG、Geldanamycin、Radicicol、Withaferin A、LY-2183240、Vinorelbine 投与を行った細胞で、細胞内に粒状の蛍光シグナルが確認された (Fig. 22A)。続いて細胞内の酸性小胞のアルカリ化を行うことで蛍光シグナルの減少が観察された。Pyrvinium pamotate 投与を行った細胞では細胞内全体に蛍光が観察され、細胞内の酸性小胞のアルカリ化を行っても蛍光の減少は観察されなかった。また Doxorubicin と Compound 6 では細胞内に粒状の蛍光シグナルはわずかにしか観察されなかった。アルカリ化処理前後の蛍光強度の差を求めることで、酸性小胞に由来する蛍光強度を定量したところ、Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞に vehicle 投与を行った場合に比べ、17-AAG、Geldanamycin、Radicicol、Withaferin A、LY-2183240、Vinorelbine 投与を行った場合に有意に高い蛍光強度が確認された (Fig. 22B;  $176.7 \pm 65.7$ ,  $785.0 \pm 94.1$ ;  $p < 0.001$ ,  $989.9 \pm 136.7$ ;  $p < 0.001$ ,  $625.9 \pm 132.5$ ;  $p < 0.001$ ,  $662.5 \pm 195.5$ ;  $p < 0.01$ ,  $618.0 \pm 100.4$ ;  $p < 0.001$  and  $436.7 \pm 93.6$ ;  $p < 0.05$  for vehicle, 17-AAG, Radicicol, Geldanamycin, Withaferin A, LY-2183240 and

Vinorelbine, respectively, two-tailed multiple *t*-test with Bonferroni's correction vs. control)。Pyrvinium pamotate、Doxorubicin、Compound 6 の投与を行った場合には、有意な蛍光強度を示さなかった (Fig. 22B;  $176.7 \pm 65.7$ ,  $-714.4 \pm 749.4$ ,  $93.0 \pm 32.7$  and  $200.6 \pm 58.4$  for vehicle, Pyrvinium pamotate, Doxorubicin and Compound 6, respectively; two-tailed multiple *t*-test with Bonferroni's correction vs. control;  $p > 0.05$ )。以上の結果から 17-AAG、Geldanamycin、Radicicol、Withaferin A、LY-2183240、Vinorelbine が HER2 の内在化を誘導する化合物であることが示唆された。また Pyrvinium pamotate、Doxorubicin、Compound 6 はイメージングの結果からスクリーニングで得られた結果が偽陽性であることが示唆された。

### 2.3-8 細胞膜上の Halo-HER2 発現量変化

細胞膜上の Halo-HER2 量が減少しているかどうか確かめた。Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞に試験化合物の投与を行い培養を行った後に、細胞膜を透過しない Alexa647 Halo リガンドの細胞外液への投与を行い、細胞膜の Halo-HER2 を染色した。Alexa647 の蛍光強度を測定することで、細胞膜上の Halo-HER2 の定量を行った。17-AAG、Geldanamycin、Radicicol、Withaferin A、LY-2183240 の投与を行うことで、vehicle 投与と比べ有意に低い蛍光強度を示した (Fig. 23;  $100.0 \pm 15.6$ ,  $16.6 \pm 5.7$ ;  $p < 0.001$ ,  $13.4 \pm 3.7$ ;  $p < 0.001$ ,  $11.2 \pm 1.4$ ;  $p < 0.001$ ,  $58.5 \pm 6.1$ ;  $p < 0.001$  and

74.5 ± 1.3;  $p < 0.05$  for vehicle, 17-AAG, Radicicol, Geldanamycin, Withaferin A and LY-2183240, respectively, multiple comparisons test of Dunnett)。しかしながら Pyrrvinium pamotate、Doxorubicin、Compound 6、Vinorelbine の投与を行った場合には、有意な差は認められなかった (Fig. 22; 100.0 ± 15.6, 95.2 ± 0.7, 105.5 ± 12.1, 88.2 ± 6.0 and 93.9 ± 14.1 for vehicle, Pyrrvinium pamotate, Doxorubicin, Compound 6 and, respectively; multiple comparisons test of Dunnett;  $p > 0.05$ )。以上の結果から、17-AAG、Geldanamycin、Radicicol、Withaferin A、LY-2183240 が、細胞膜上の HER2 の減少を誘導する化合物であることが示された。

## 2.4 考察

本研究では HER2 内在化を迅速かつ簡便に評価するセルベースのスクリーニング系の構築を行った。10,957 化合物についてスクリーニングを行ったところ、既知の HER2 内在化薬と共に、HER2 内在化を誘導することが知られていないシード化合物を取得した。

本研究で構築したスクリーニング系は培地や試薬の分注操作は自動分注ロボットを用いて高速かつ精確に行えるため、一日で 1 万化合物についてセルベースアッセイが実施可能となった。ハイスループットスクリーニングの品質評価の指標である "Z'-factor" の値は 94.6% の確率でハイスループットスクリーニング系として優秀な系であるといえる 0.5 を超えた<sup>85</sup> ことから、非常に安定したスクリーニング系を確立できたと言える。

市販の pH 感受性色素である CypHer 5 は、本研究で開発した RhPM 同様に細胞内の酸性小胞の検出に適しているが、CypHer 5 を用いたイメージングによるセルベースのスクリーニングにおいて、Z'-factor > 0.5 を実現していない<sup>84</sup>。このことから、本研究で構築したスクリーニング系のように、蛍光強度のみで評価することは困難であることが予想される。本研究で開発した RhPM は構築したスクリーニング系において蛍光強度のみを評価基準としているが、高い確率

(94.6%) で Z'-factor > 0.5 を超えており、スクリーニングにも適用性のある色素であることを示された。

再現性試験で得られた 9 種類のヒット化合物について、化合物投与後の細胞膜上の Halo-HER2 イメージングを行ったところ、対照に比べ有意に蛍光強度が低かったのは HER2 内在化誘導薬として報告がある 17-AAG、Geldanamycin、Radicicol、Withaferin A と LY-2183240 であった。Withaferin A は血管形成阻害作用を持つ抗悪性腫瘍薬であるが<sup>87</sup>、近年 Hsp90 の阻害作用の報告もされており、抗腫瘍効果との関連性について示唆されている<sup>88</sup>。17-AAG、Radicicol が Hsp90 の N 末で ATP との結合を阻害するのに対し、Withaferin A は Hsp90 の C 末に結合しコシャペロンとの結合を阻害する。また Withaferin A は Hsp90 の基質タンパク質の分解過程も異なっている<sup>88</sup>。Halo-HER2 の内在化をイメージングした際に 17-AAG 等と比べ、Withaferin A で蛍光シグナルが集積していたのは、分解過程の違いに由来する可能性が考えられる (Fig. 23)。

再現性試験の結果得られた化合物の内、LY-2183240 は HER2 の機能抑制や Hsp90 を阻害することが報告されていない化合物であった。LY-2183240 はエンドカンナビノイド、アナンダミドの再取り込み阻害薬である<sup>89</sup>。イメージングで評価を行ったところ、LY-2183240 を投与することで、Halo-HER2 の内在化が観察された。内在化誘導した際の受容体の蛍光シグナルのパターンは 17-AAG 等

の Hsp90 標的薬投与を行った場合と比べ、大きな粒状の蛍光シグナルが観察された (Fig. 23)。また細胞膜の Halo-HER2 量を評価した際にも有意な減少を示した。用量反応性試験では 5  $\mu$ M という高濃度の場合でのみ活性が観察されたことから、標的分子とは低親和であると考えられる。LY-2183240 は HER2 や関連タンパク質に対する作用機序が未知であるため、新規の作用機序により HER2 の内在化を誘導している可能性がある。このため、LY-2183240 をリード化合物として構造展開を行い、作用点を探索することで、新規の HER2 内在化誘導薬が開発されることが期待される。

Vinorelbine は Halo-HER2 の内在化イメージングでは有意な差を示したが、膜上の Halo-HER2 の減少を誘導しなかった。Vinorelbine による Halo-HER2 の内在化の程度は、他の内在化を誘導した化合物と比べ低い。このため、膜上の Halo-HER2 の減少の程度の問題により、有意な差を確認することができなかった可能性がある。

再現性試験の結果、他の Pyrvinium pamotate、Doxorubicin、Compound 6 の 3 種類の偽陽性が疑われる化合物が得られた原因は化合物の自家蛍光の可能性が高い。イメージングでは細胞外液を入れ替えるのに対し、スクリーニングでは試験化合物は 866 nM 残存しており、アルカリ化処理の際に試験化合物は希釈され、744 nM に変化することので、蛍光性のある化合物の蛍光強度変化を検出し

た可能性が考えられる。Pyrvinium pamotate、Doxorubicin、Compound 6 は芳香環や共役二重結合を有していることから、化合物の持つ蛍光強度の減少を評価しているだけの可能性が疑われる。本スクリーニング系は、化合物が強い蛍光を持つ場合にも、蛍光強度の減少を検出し、ヒット化合物として判定し得るため、細胞を緩衝液で洗浄する回数を増やすなどプロトコルの改善の余地も示唆された。

本研究で確立したスクリーニング手法は、細胞表現型の変化を指標としたスクリーニングであるため、既知及び未知の作用経路を介した **HER2** の内在化を誘導する薬物を網羅的に探索することが可能である。標的タンパク質を決めてから行うスクリーニングに比べ表現型の変化を評価するスクリーニングは、標的候補のタンパク質を絞る必要が無く、全く新しい作用機序の化合物が得られる利点がある。その一方で標的タンパク質が不明のままでは薬理や毒性のメカニズムを理解することが出来ず、リード化合物開発に向けたプロセスを進める際に困難が生じる。しかしながら、近年のケミカル・プロテオミクスの進展によって、標的タンパク質の同定が比較的容易となっており、表現型を基にしたスクリーニングの優位性が高まっている<sup>90,91</sup>。

今回のスクリーニングでは東京大学創薬イノベーションセンターより提供を受けた構造多様性を考慮したコアライブラリー及び薬理活性が知られている

ライブラリーにより構成される 10,957 化合物であったが、製薬企業では 200 万化合物のライブラリーの整備も進んでおり<sup>92</sup>、さらなる大規模スクリーニングを行うことで、HER2 の内在化を誘導する有用なシード化合物が得られることが期待される。

HER2 と同じファミリーの受容体である EGFR は非小細胞肺癌や食道扁平上皮癌等で過剰発現しており、EGFR 過剰発現は予後不良因子となっている<sup>93-95</sup>。本研究では HER2 を標的受容体としたが、確立したスクリーニング系では EGFR や他の標的受容体と HER2 を入れ替えることで様々な RTK にも応用可能であると考えられる。本研究で構築した新規のセルベーススクリーニング手法が新薬の開発の手助けになると期待される。



## 結論

本研究では RTK のキメラ受容体と有機小分子リガンドを用いた光照射による RTK シグナルの限局した場での活性化法と HER2 の内在化を誘導する小分子化合物の探索法の二つの新規ケミカルバイオエンジニアリング手法を確立した。

細胞内の  $\mu\text{m}$  オーダーの局所での RTK の活性化の時空間パターンは、神経の軸索伸長や細胞運動の方向決定等を含む様々な細胞応答の決定的な要因である<sup>7,8,10,13,14</sup>。本研究では RTK の膜貫通領域と細胞内領域を保存し、細胞外領域を有機小分子であるフルオレセインに対する scFv と置き換えたキメラ受容体を作製した。ケイジドフルオレセインを配したケイジド人工リガンドを用いることで、キメラ受容体の自己リン酸化や、細胞内カルシウム濃度上昇といった細胞内シグナル誘導を光照射依存的に行うことに成功した。本研究で確立した光照射による RTK の活性化法は、操作性の高い光を活性化のスイッチとして用いているため、RTK を活性化させたいタイミングや場所を自由に制御することが可能であり、局所における RTK の役割を研究する上で、本手法は非常に有効なツールになると期待される。

RTK の一種である HER2 の過剰発現は、乳がんや卵巣がんで予後不良因子となっており、その機能を抑制することは、治療において非常に重要な役割を果

たしている<sup>18,20,21</sup>。本研究では細胞膜タンパク質が分解される過程において、初めに膜タンパク質のエンドサイトーシスを介する細胞内の酸性小胞への内在化が生じる点に着目し、HER2の内在化を指標としたセルベーススクリーニング系を構築した。HER2の内在化を検出するために、細胞外の環境（pH 7.4）と比べ細胞内の酸性小胞はpHが低い（pH 4~6）点に着目し、pHが低い時に強い蛍光を示すpH感受性の蛍光プローブでHER2を特異的に標識し、HER2の動態の追跡を可能にした。

構築したスクリーニング系を用いて 10,957 化合物のスクリーニングを実施した結果、ハイスループットスクリーニングの質的評価の指標である "Z'-factor" の値が、スクリーニング系として優秀な系であることの基準である 0.5 を 94.6% の確率で超えた。この結果から、構築したスクリーニング系が非常に安定した系であることが示された。またスクリーニングの結果得られた化合物に既知の HER2 内在化誘導薬が含まれていたことから、本スクリーニング系が HER2 の内在化を評価する優れた系であることを実証された。また、HER2 の内在化を誘導する作用機序が知られていない LY-2183240 もスクリーニングの結果得られた。今後、作用点の解析や LY-2183240 をシード化合物として新たに分子設計を行うことで、HER2 の内在化誘導薬としてのリード化合物が創出されることも期待される。

今後構築した **RTK** の局所的な制御法を用いることで **RTK** の局所シグナルの役割の解明や、スクリーニングで得られた化合物を基にした抗癌剤の創薬が期待される。さらに、今回作製したキメラ受容体や Halo 融合 **HER2** の **RTK** の配列を別の **RTK** 配列と置き換えることで、様々な **RTK** のシグナル制御や内在化誘導薬の探索が可能であると期待される。

## 謝辞

本研究にあたり終始御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科神経生物学分野廣瀬謙造教授に深甚たる謝意を表します。また研究遂行、論文作成に御助言、御助力を賜りました東京大学大学院医学系研究科神経生物学分野並木繁行助教、浅沼大祐助教に深謝いたします。

本研究の遂行に御協力下さいました東京大学大学院医学系研究科神経生物学分野の先輩諸氏に誠意を表します。

pRS316-4M5.3MYC プラスミドを供与して下さった K. D. Wittrup 教授、pMX プラスミドを供与して下さった北村俊雄教授、pEGFP N1-TrkB プラスミドを供与して下さった Rosalind A. Segal 教授、pLenti6PW TGB プラスミド、pLenti6PW STB プラスミドを供与して下さった金子武嗣教授、pcDNA Akt PH-GFP プラスミドを供与して下さった Tamas Balla 教授に感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Favoni, R. E. & De Cupis, A. The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach. *Pharmacol. Rev.* **52**, 179–206 (2000).
2. Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 359–371 (2006).
3. Mendelsohn, J. & Baselga, J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* **19**, 6550–6565 (2000).
4. Minichiello, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 850–860 (2009).
5. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203–212 (1990).
6. Heldin, C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, 213–223 (1995).
7. Paves, H. & Saarma, M. Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. *Cell Tissue Res.* **290**, 285–297 (1997).

8. Ozdinler, P. H. & Macklis, J. D. IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat. Neurosci.* **9**, 1371–1381 (2006).
9. Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S. & Takenawa, T. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev. Cell* **5**, 595–609 (2003).
10. Oikawa, T. *et al.* PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* **6**, 420–426 (2004).
11. Ernst, A. F., Gallo, G., Letourneau, P. C. & McLoon, S. C. Stabilization of growing retinal axons by the combined signaling of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* **20**, 1458–1469 (2000).
12. Cheng, P.-L. *et al.* Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 18430–18435 (2011).
13. Zhang, X. hui & Poo, M. Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon. *Neuron* **36**, 675–688 (2002).
14. Gallo, G. & Letourneau, P. C. Localized Sources of Neurotrophins Initiate Axon Collateral Sprouting. *J. Neurosci.* **18**, 5403–5414 (1998).
15. Freeman, K. W. *et al.* Conditional activation of fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1, but not FGFR2, in prostate cancer cells leads to increased osteopontin

- induction, extracellular signal-regulated kinase activation, and in vivo proliferation. *Cancer Res.* **63**, 6237–6243 (2003).
16. Grandis, J. R. & Sok, J. C. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol. Ther.* **102**, 37–46 (2004).
  17. Gille, J. *et al.* Simultaneous blockade of VEGFR-1 and VEGFR-2 activation is necessary to efficiently inhibit experimental melanoma growth and metastasis formation. *Int. J. Cancer* **120**, 1899–1908 (2007).
  18. Nahta, R., Yu, D., Hung, M.-C., Hortobagyi, G. N. & Esteva, F. J. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **3**, 269–280 (2006).
  19. Ostman, A. & Heldin, C.-H. PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv. Cancer Res.* **97**, 247–274 (2007).
  20. De Amicis, F. *et al.* Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **121**, 1–11 (2010).
  21. Even-Ram, S. *et al.* Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.* **4**, 909–914 (1998).
  22. Ménard, S., Tagliabue, E., Campiglio, M. & Pupa, S. M. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **182**, 150–162 (2000).

23. Modi, S. *et al.* HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5132–5139 (2011).
24. Hommelgaard, A. M., Lerdrup, M. & Van Deurs, B. Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1557–1567 (2004).
25. Lerdrup, M., Hommelgaard, A. M., Grandal, M. & Van Deurs, B. Geldanamycin stimulates internalization of ErbB2 in a proteasome-dependent way. *J. Cell. Sci* **119**, 85–95 (2006).
26. Barr, D. J., Ostermeyer-Fay, A. G., Matundan, R. A. & Brown, D. A. Clathrin-independent endocytosis of ErbB2 in geldanamycin-treated human breast cancer cells. *J. Cell. Sci* **121**, 3155–3166 (2008).
27. Pedersen, N. M., Madshus, I. H., Haslekås, C. & Stang, E. Geldanamycin-induced down-regulation of ErbB2 from the plasma membrane is clathrin dependent but proteasomal activity independent. *Mol. Cancer Res* **6**, 491–500 (2008).
28. Lerdrup, M. *et al.* Endocytic down-regulation of ErbB2 is stimulated by cleavage of its C-terminus. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3656–3666 (2007).
29. Zhou, P. *et al.* ErbB2 degradation mediated by the co-chaperone protein CHIP. *J.*



- Biol. Chem* **278**, 13829–13837 (2003).
30. Sharma, S. V., Haber, D. A. & Settleman, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 241–253 (2010).
  31. Wu, Y. I. *et al.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* **461**, 104–108 (2009).
  32. Yoo, S. K. *et al.* Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish. *Dev. Cell* **18**, 226–236 (2010).
  33. Wang, X., He, L., Wu, Y. I., Hahn, K. M. & Montell, D. J. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat. Cell Biol.* **12**, 591–597 (2010).
  34. Yazawa, M., Sadaghiani, A. M., Hsueh, B. & Dolmetsch, R. E. Induction of protein-protein interactions in live cells using light. *Nat. Biotechnol.* **27**, 941–945 (2009).
  35. Levskaya, A., Weiner, O. D., Lim, W. A. & Voigt, C. A. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* **461**, 997–1001 (2009).
  36. Leung, D. W., Otomo, C., Chory, J. & Rosen, M. K. Genetically encoded

- photoswitching of actin assembly through the Cdc42-WASP-Arp2/3 complex pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 12797–12802 (2008).
37. Inoue, T., Heo, W. D., Grimley, J. S., Wandless, T. J. & Meyer, T. An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat. Methods* **2**, 415–418 (2005).
38. Suh, B.-C., Inoue, T., Meyer, T. & Hille, B. Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gate KCNQ ion channels. *Science* **314**, 1454–1457 (2006).
39. Karginov, A. V., Ding, F., Kota, P., Dokholyan, N. V. & Hahn, K. M. Engineered allosteric activation of kinases in living cells. *Nat. Biotechnol.* **28**, 743–747 (2010).
40. Karginov, A. V. *et al.* Light Regulation of Protein Dimerization and Kinase Activity in Living Cells Using Photocaged Rapamycin and Engineered FKBP. *J. Am. Chem. Soc.* (2010). doi:10.1021/ja109630v
41. Umeda, N., Ueno, T., Pohlmeier, C., Nagano, T. & Inoue, T. A photocleavable rapamycin conjugate for spatiotemporal control of small GTPase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12–14 (2011).
42. Muthuswamy, S. K., Gilman, M. & Brugge, J. S. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol. Cell. Biol* **19**, 6845–6857 (1999).

43. Zhan, L., Xiang, B. & Muthuswamy, S. K. Controlled activation of ErbB1/ErbB2 heterodimers promote invasion of three-dimensional organized epithelia in an ErbB1-dependent manner: implications for progression of ErbB2-overexpressing tumors. *Cancer Res.* **66**, 5201–5208 (2006).
44. Jin, L., Asano, H. & Blau, C. A. Stimulating cell proliferation through the pharmacologic activation of c-kit. *Blood* **91**, 890–897 (1998).
45. Yang, J., Symes, K., Mercola, M. & Schreiber, S. L. Small-molecule control of insulin and PDGF receptor signaling and the role of membrane attachment. *Curr. Biol.* **8**, 11–18 (1998).
46. Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H. & Nagamune, T. Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 975–984 (2008).
47. Midelfort, K. S. *et al.* Substantial energetic improvement with minimal structural perturbation in a high affinity mutant antibody. *J. Mol. Biol.* **343**, 685–701 (2004).
48. Boder, E. T., Midelfort, K. S. & Wittrup, K. D. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 10701–10705 (2000).
49. Midelfort, K. S. & Wittrup, K. D. Context-dependent mutations predominate in an

- engineered high-affinity single chain antibody fragment. *Protein Sci.* **15**, 324–334 (2006).
50. Isa, M., Ohta, Y., Namiki, S. & Hirose, K. Artificial control of subtype-specific platelet-derived growth factor-receptor signaling. *J. Pharmacol. Sci.* **111**, 312–316 (2009).
51. Lester, H. A. & Nerbonne, J. M. Physiological and pharmacological manipulations with light flashes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **11**, 151–175 (1982).
52. Ernfors, P. & Bramham, C. R. The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP. *Trends in Neurosciences* **26**, 171–173 (2003).
53. Rameh, L. E. & Cantley, L. C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* **274**, 8347–8350 (1999).
54. Kawahara, M., Ogo, Y., Ueda, H. & Nagamune, T. Improved growth response of antibody/receptor chimera attained by the engineering of transmembrane domain. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 715–719 (2004).
55. Kawahara, M., Ueda, H., Tsumoto, K., Kumagai, I. & Nagamune, T. AMEGA: antigen-mediated genetically modified cell amplification. *J. Immunol. Methods* **284**, 187–194 (2004).
56. Kawahara, M. *et al.* Antigen-mediated migration of murine pro-B Ba/F3 cells via an

- antibody/receptor chimera. *J. Biotechnol.* **133**, 154–161 (2008).
57. Sorkin, A., Waters, C., Overholser, K. A. & Carpenter, G. Multiple autophosphorylation site mutations of the epidermal growth factor receptor. Analysis of kinase activity and endocytosis. *J. Biol. Chem.* **266**, 8355–8362 (1991).
58. Dougher, M. & Terman, B. I. Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene* **18**, 1619–1627 (1999).
59. Pahara, J., Shi, H., Chen, X. & Wang, Z. Dimerization drives PDGF receptor endocytosis through a C-terminal hydrophobic motif shared by EGF receptor. *Exp. Cell Res.* **316**, 2237–2250 (2010).
60. Haglund, K. *et al.* Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 461–466 (2003).
61. Duan, D. S., Pazin, M. J., Fretto, L. J. & Williams, L. T. A functional soluble extracellular region of the platelet-derived growth factor (PDGF) beta-receptor antagonizes PDGF-stimulated responses. *J. Biol. Chem.* **266**, 413–418 (1991).
62. Fretto, L. J. *et al.* Mechanism of platelet-derived growth factor (PDGF) AA, AB, and BB binding to alpha and beta PDGF receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 3625–3631 (1993).

63. Rodriguez-Tébar, A. & Barde, Y. A. Binding characteristics of brain-derived neurotrophic factor to its receptors on neurons from the chick embryo. *J. Neurosci.* **8**, 3337–3342 (1988).
64. Tanaka, J.-I. *et al.* Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* **319**, 1683–1687 (2008).
65. Chao, M. V., Rajagopal, R. & Lee, F. S. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci.* **110**, 167–173 (2006).
66. Shinoda, Y. *et al.* Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 373–378 (2011).
67. Sadakata, T. *et al.* Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2012). doi:10.1073/pnas.1210055109
68. Tsai, H.-C. *et al.* Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* **324**, 1080–1084 (2009).
69. Rupp, E. *et al.* A unique autophosphorylation site in the platelet-derived growth factor alpha receptor from a heterodimeric receptor complex. *Eur. J. Biochem.* **225**, 29–41 (1994).

70. Stern, D. F. & Kamps, M. P. EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *EMBO J* **7**, 995–1001 (1988).
71. Awada, A., Bozovic-Spasojevic, I. & Chow, L. New therapies in HER2-positive breast cancer: a major step towards a cure of the disease? *Cancer Treat. Rev.* **38**, 494–504 (2012).
72. Willems, L. *et al.* PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep* **14**, 129–138 (2012).
73. Sitohy, B., Nagy, J. A. & Dvorak, H. F. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. *Cancer Res.* **72**, 1909–1914 (2012).
74. Goswami, A., Ranganathan, P. & Rangnekar, V. M. The phosphoinositide 3-kinase/Akt1/Par-4 axis: a cancer-selective therapeutic target. *Cancer Res.* **66**, 2889–2892 (2006).
75. Takeuchi, K. & Ito, F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1774–1780 (2011).
76. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177–182 (1987).
77. Ghosh, R. *et al.* Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. *Cancer Res.* **71**, 1871–1882 (2011).

78. Klapper, L. N., Waterman, H., Sela, M. & Yarden, Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res* **60**, 3384–3388 (2000).
79. Marmor, M. D. & Yarden, Y. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* **23**, 2057–2070 (2004).
80. Schulte, T. W. & Neckers, L. M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **42**, 273–279 (1998).
81. Mahalingam, D. *et al.* Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br. J. Cancer* **100**, 1523–1529 (2009).
82. Zsebik, B. *et al.* Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1. *Immunol. Lett.* **104**, 146–155 (2006).
83. Adie, E. J. *et al.* A pH-sensitive fluor, CypHer 5, used to monitor agonist-induced G protein-coupled receptor internalization in live cells. *BioTechniques* **33**, 1152–1154, 1156–1157 (2002).
84. Beletskii, A. *et al.* High-throughput phagocytosis assay utilizing a pH-sensitive



- fluorescent dye. *BioTechniques* **39**, 894–897 (2005).
85. Zhang, Chung & Oldenburg. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**, 67–73 (1999).
86. Xu, W. *et al.* Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 12847–12852 (2002).
87. Mohan, R. *et al.* Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. *Angiogenesis* **7**, 115–122 (2004).
88. Yu, Y. *et al.* Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 542–551 (2010).
89. Alexander, J. P. & Cravatt, B. F. The putative endocannabinoid transport blocker LY2183240 is a potent inhibitor of FAAH and several other brain serine hydrolases. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9699–9704 (2006).
90. Bantscheff, M. & Drewes, G. Chemoproteomic approaches to drug target identification and drug profiling. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1973–1978 (2012).
91. Hajduk, P. J. & Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 211–219 (2007).

92. Gamo, F.-J. *et al.* Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **465**, 305–310 (2010).
93. Brabender, J. *et al.* Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1850–1855 (2001).
94. Hanawa, M. *et al.* EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int. J. Cancer* **118**, 1173–1180 (2006).
95. Ooi, A. *et al.* Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod. Pathol.* **17**, 895–904 (2004).

## 図説

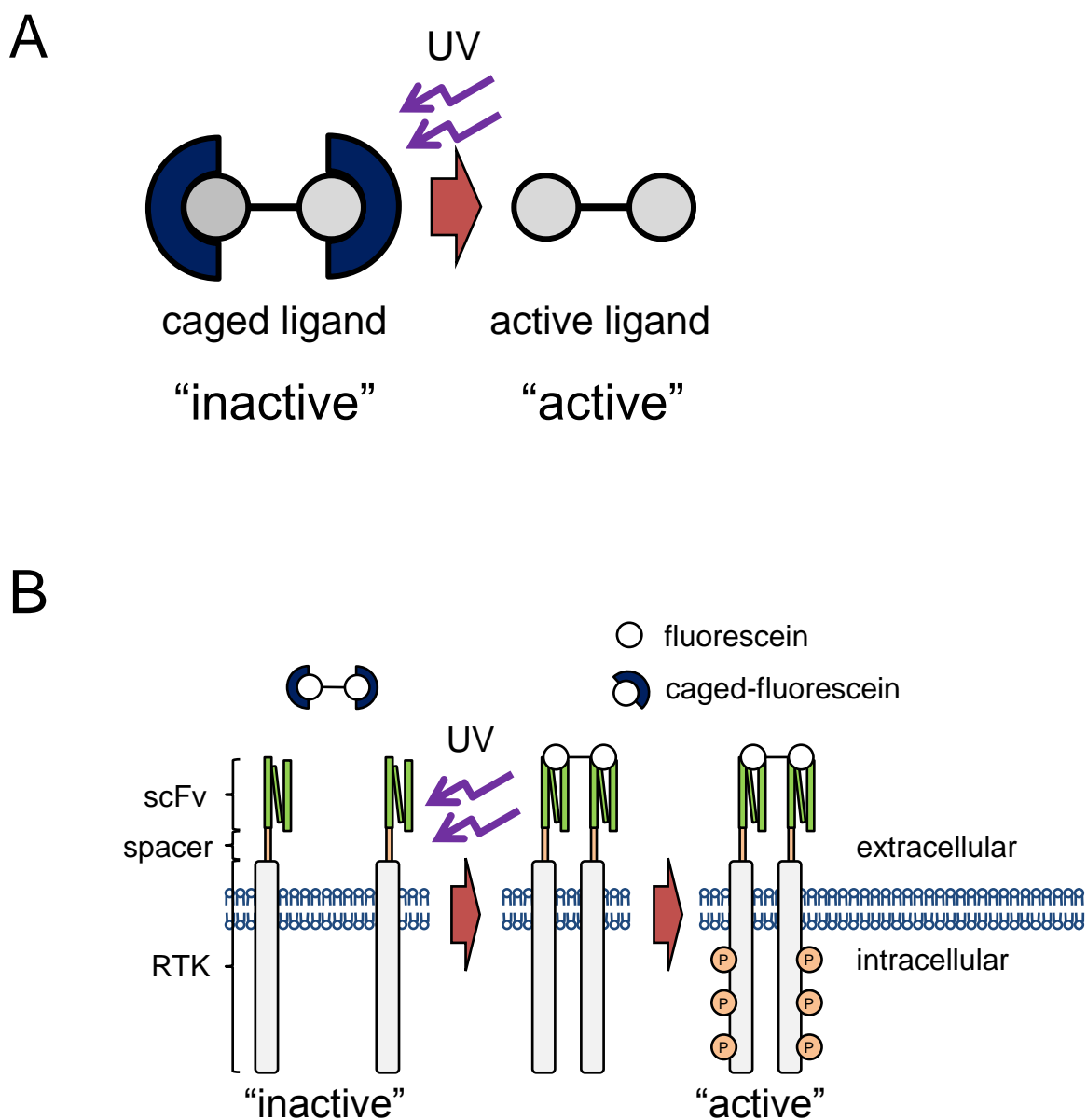


Figure 1 光照射依存的なRTK活性化方法の模式図

(A) 人工リガンドの活性化メカニズムの模式図

リガンドに保護基をつけることで不活性化状態 (“inactive”) とし、UV光照射依存的に保護基を外し、活性化状態 (“active”) に移行させる。

(B) 人工リガンドを介したキメラ受容体活性化メカニズムの模式図

細胞外領域に抗フルオレセイン一本鎖抗体 (scFv)、細胞外領域の一部と細胞膜貫通領域および細胞内領域にチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) を配したキメラ受容体を細胞膜上に発現させ、UV光照射依存的に細胞外のscFv部分に多価のフルオレセインを結合させることで、二量体化を誘導させる。

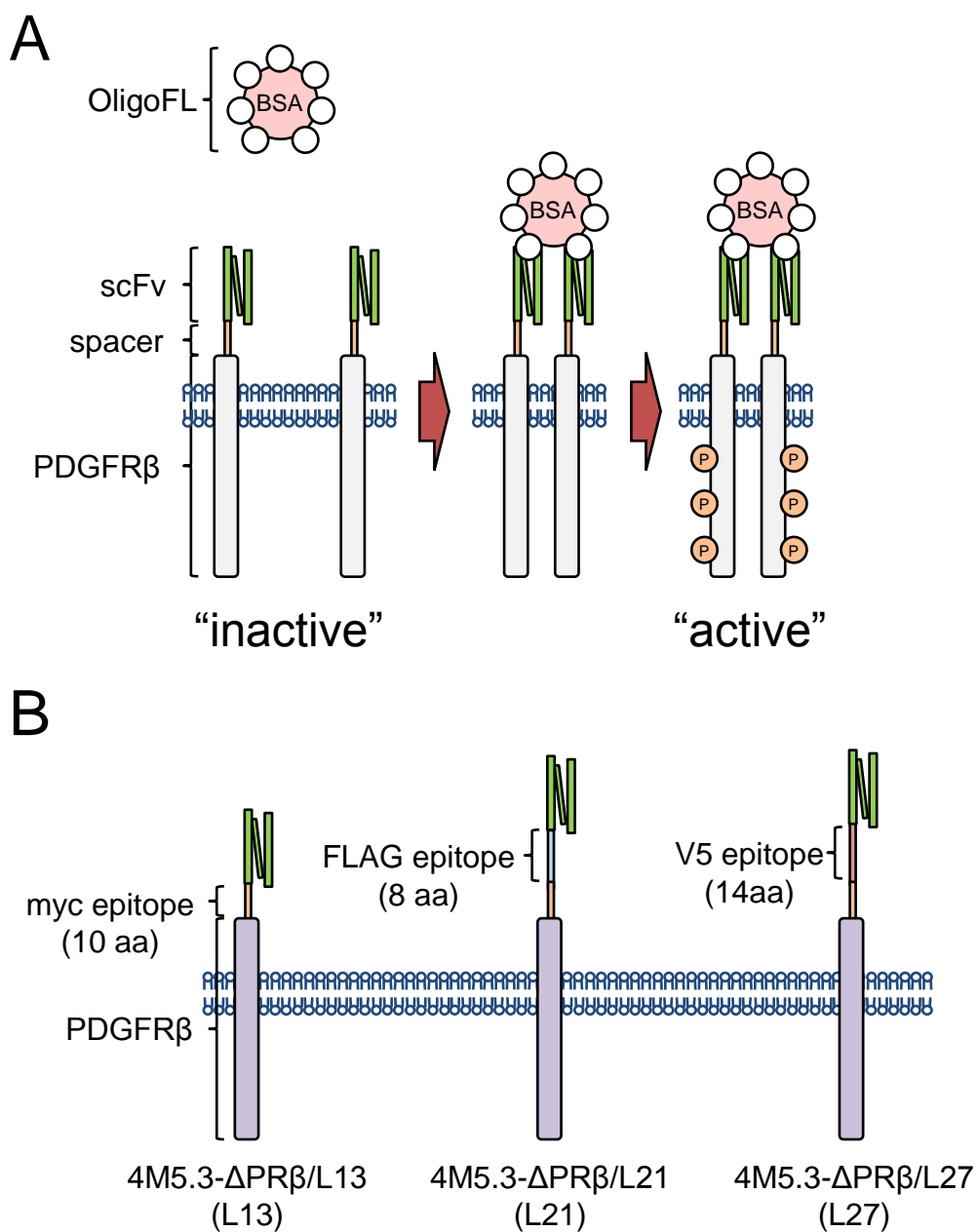


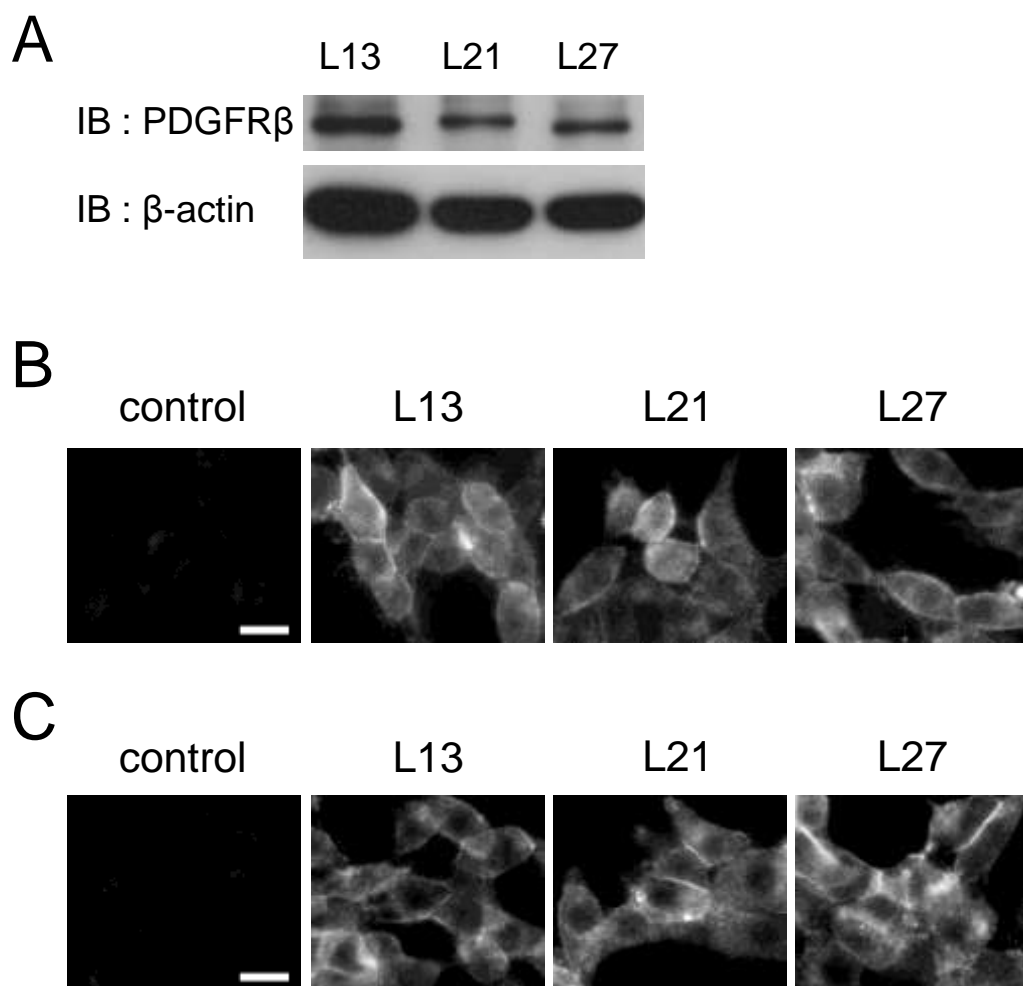
Figure 2 キメラ受容体活性化の模式図

(A) OligoFLを介したキメラ受容体活性化メカニズムの模式図

細胞外領域に抗フルオレセイン一本鎖抗体 (scFv)、細胞外領域の一部と細胞膜貫通領域および細胞内領域にチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) を配したキメラ受容体を作製した。細胞外のscFv部分に多価のフルオレセインが結合することで、二量体化を誘導する。

(B) 細胞外のリンカーの長さを変化させたキメラ受容体の構造概略図

キメラ受容体のscFvと細胞膜貫通領域の間のリンカーの長さが異なるものを作製した。



**Figure 3** キメラ受容体発現の確認

**(A)** キメラ受容体の発現

キメラ受容体の発現を抗PDGFR $\beta$ 抗体を用いて、ウエスタンブロット法により確認した。

**(B)** 抗HA抗体によるキメラ受容体の免疫染色

各キメラ受容体の細胞膜上の発現を抗HA抗体にて検出した。スケールバーは20  $\mu$ mを示す。

**(C)** フルオレセインとキメラ受容体の結合

各キメラ受容体とビオチン化フルオレセインの結合をローダミン標識したストレプトアビジンにて検出した。スケールバーは20  $\mu$ mを示す。

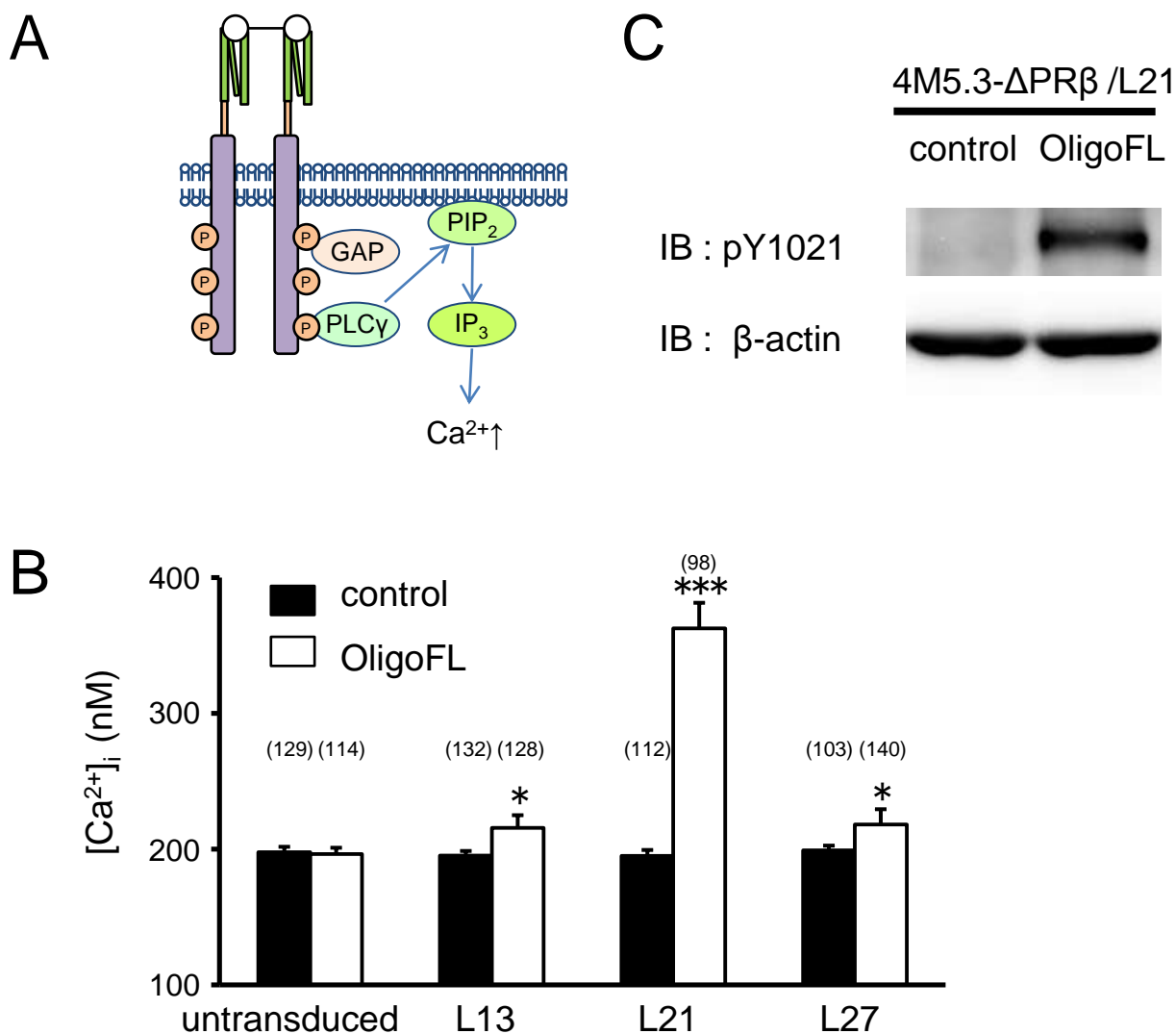


Figure 4キメラ受容体による細胞内シグナル誘導

(A)キメラ受容体によるカルシウムシグナル活性化機構の模式図

PDGFRβは二量体化することで細胞領域を自己リン酸化し、PLCγ、PIP<sub>2</sub>、IP<sub>3</sub>とシグナル伝達し、細胞内カルシウム濃度上昇を誘導する。

(B) OligoFLによるカルシウムシグナルの誘導

各キメラ受容体を発現させた細胞にOligoFLまたはvehicle (control) を投与した際の、投与6分後のカルシウム濃度を示した。括弧内の数字は各群の細胞数を示す。平均値±標準誤差。\* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Welch's  $t$ -test)

(C) OligoFLによる受容体リン酸化の誘導

4M5.3-ΔPRβ/L21を発現させた細胞にOligoFLまたはvehicle (control) を投与した際の、6分後のリン酸化シグナルを検出した。リン酸化の検出は細胞を抗HA抗体で免疫沈降した後、抗リン酸化PDGFRβ抗体と抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法にて行った。

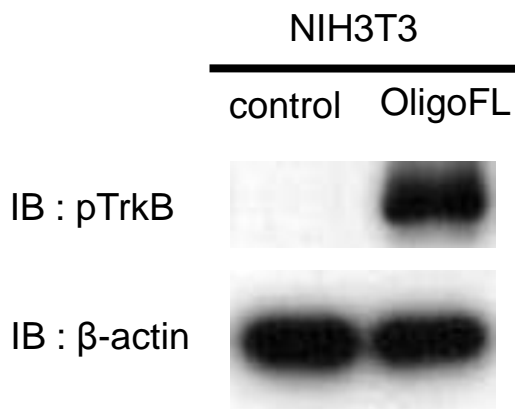
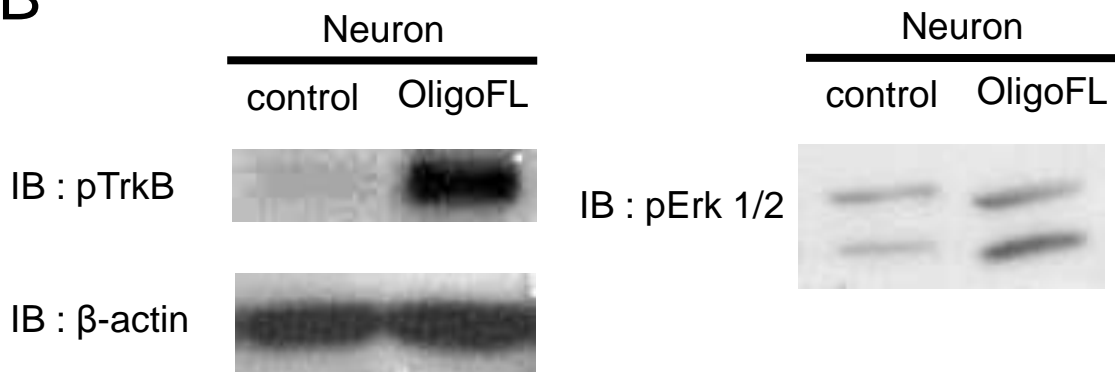
**A****B**

Figure 5 TrkBキメラ受容体による細胞内シグナルの誘導

(A) OligoFLによるNIH3T3細胞シグナルの誘導

4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21を発現させたNIH3T3細胞にOligoFLまたはvehicle (control) を投与し、6分後のリン酸化シグナルを検出した。リン酸化の検出は抗リン酸化TrkB抗体を用いたウエスタンブロット法にて行った。 $\beta$ -actinをローディングコントロールとして用いた。

(B) OligoFLによる神経細胞でのTrkBキメラ受容体のシグナル誘導

4M5.3- $\Delta$ TrkB/L21を発現させた初代培養大脳皮質細胞にOligoFLまたはvehicle (control) を投与し、6分後のリン酸化シグナルを検出した。リン酸化は抗リン酸化TrkB抗体と抗リン酸化Erk1/2抗体を用いたウエスタンブロット法にて行った。 $\beta$ -actinをローディングコントロールとして用いた。



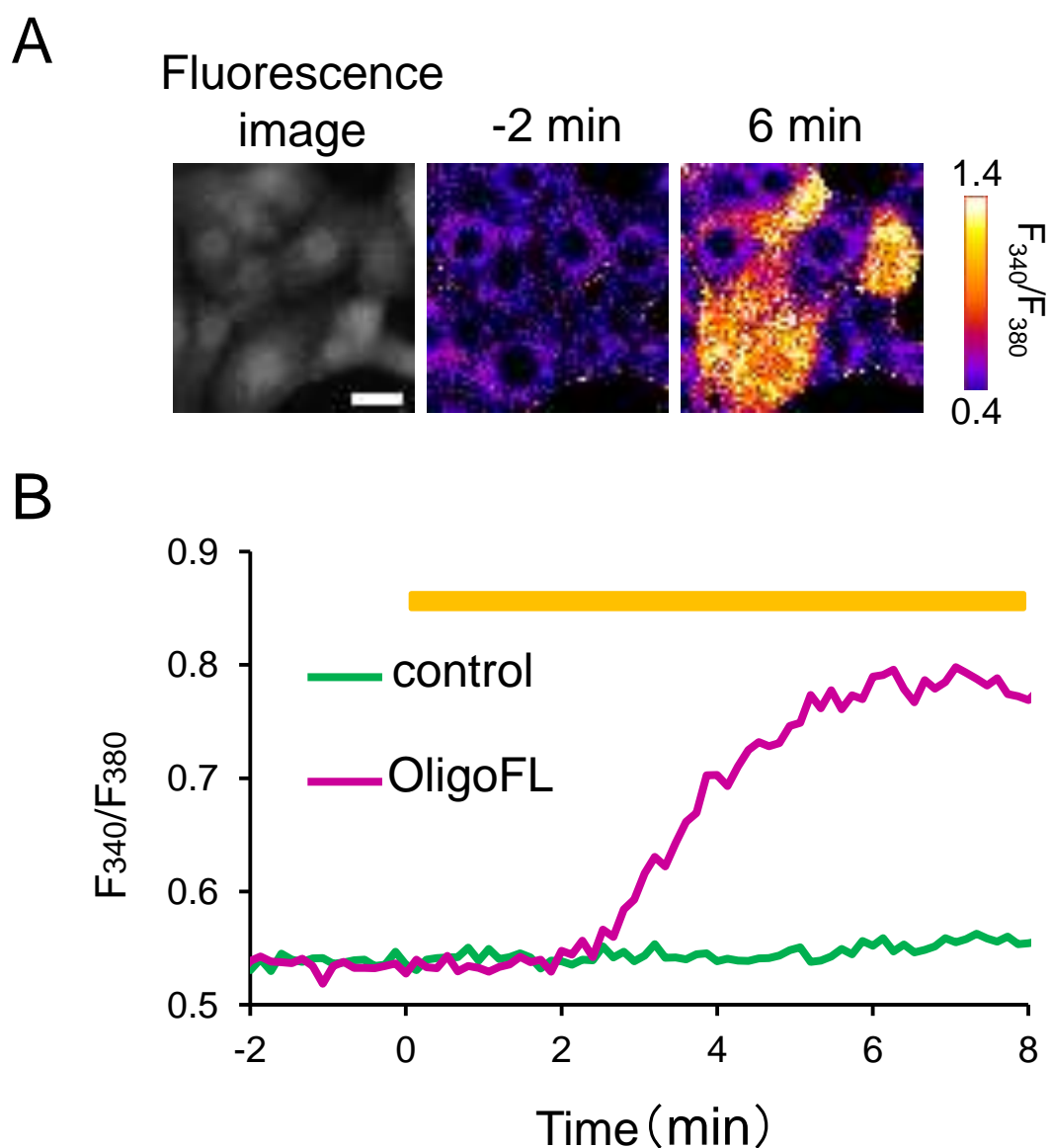


Figure 6 TrkBキメラ受容体による細胞内カルシウム濃度上昇の誘導

(A) OligoFLによる細胞内カルシウムシグナルの誘導

4M5.3-ΔTrkB/L21を発現させたNIH3T3細胞のカルシウム濃度変化をfura-2で測定した。

OligoFLを投与する前後の蛍光比を示す画像。スケールバーは10 μmを示す。

(B) OligoFLによる細胞内カルシウム濃度変化の平均トレース図

OligoFLまたはvehicle (control) の投与によるfura-2の蛍光比の経時変化。黄色のバーは投与を行っている時間帯を示す。

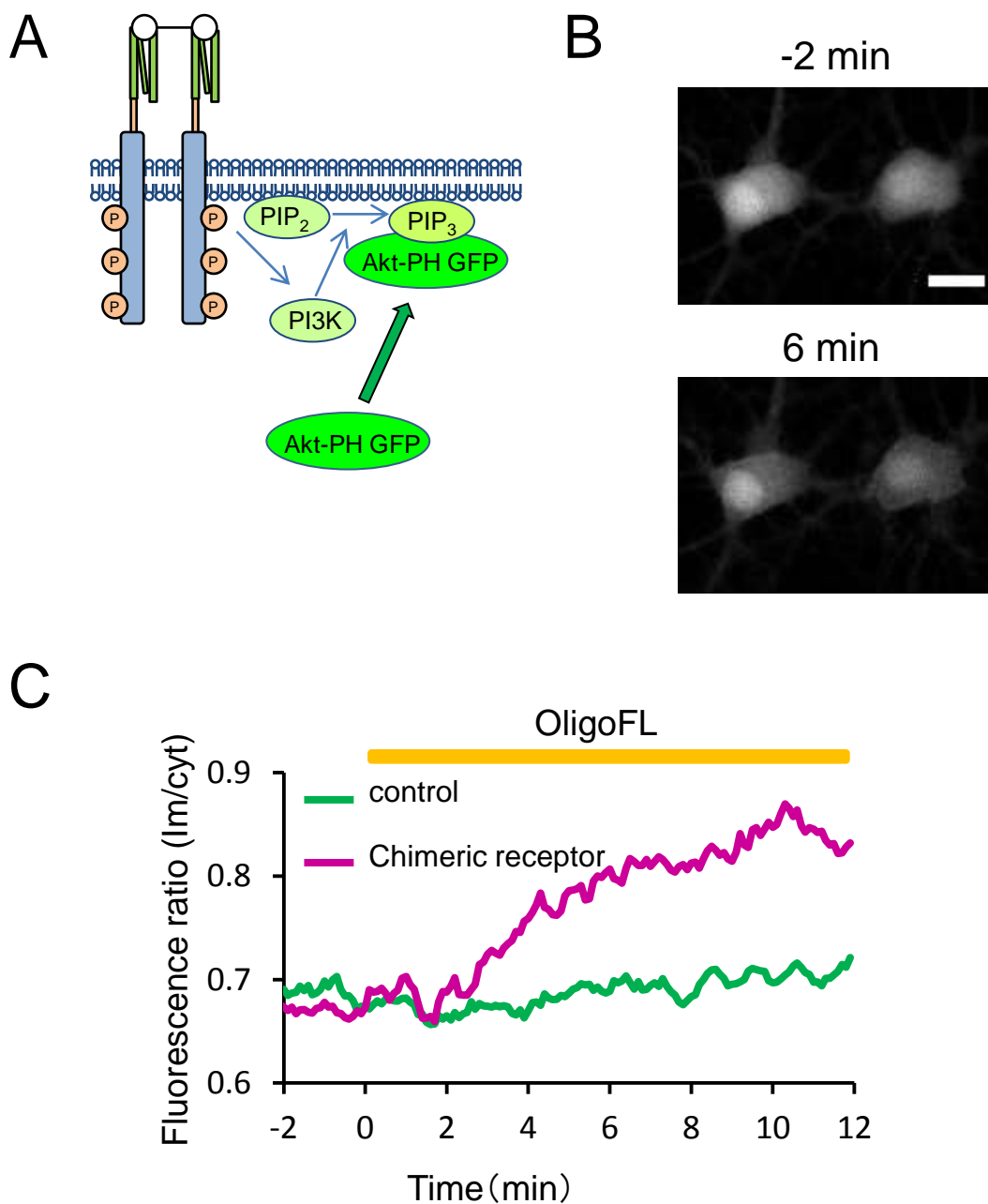


Figure 7 キメラ受容体によるAktシグナル誘導

(A) キメラ受容体によるAkt-PH GFPの細胞内局在変化

TrkBは活性化することで細胞領域を自己リン酸化し、PI3Kを活性化する。活性化したPI3KはPIP<sub>2</sub>にリン酸基を供与しPIP<sub>3</sub>を産生する。PIP<sub>3</sub>はセカンドメッセンジャーとして作用し、Akt-PH GFPを細胞膜近傍に誘導する。

(B) OligoFLによるAktシグナルの活性化

4M5.3-ΔTrkB/L21を発現させた神経細胞での、OligoFL投与に依存したAkt PH-GFPの細胞膜への移行。スケールバーは10 μmを示す。

(C) OligoFLによるAkt-PH GFP局在変化の平均トレース図

4M5.3-ΔTrkB/L21を発現させた神経細胞または非発現神経細胞にOligoFLを投与した。膜近傍 (lm) と細胞質 (cyt) でのGFP蛍光の蛍光比 (lm/cyt) の経時変化。黄色のバーは投与を行っている時間帯を示す。

A



UV	-	-	+
cagedFL-biotin	-	+	+

B

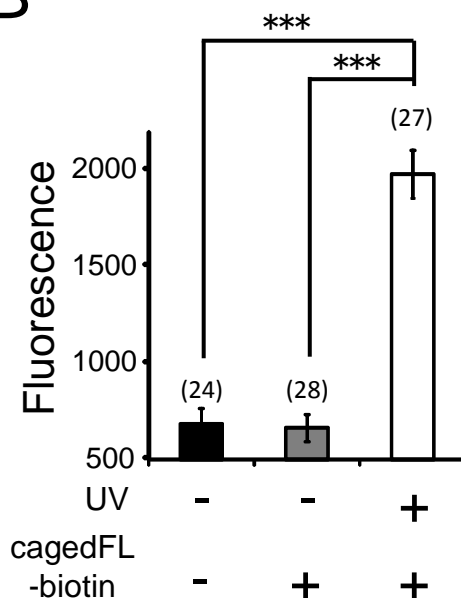


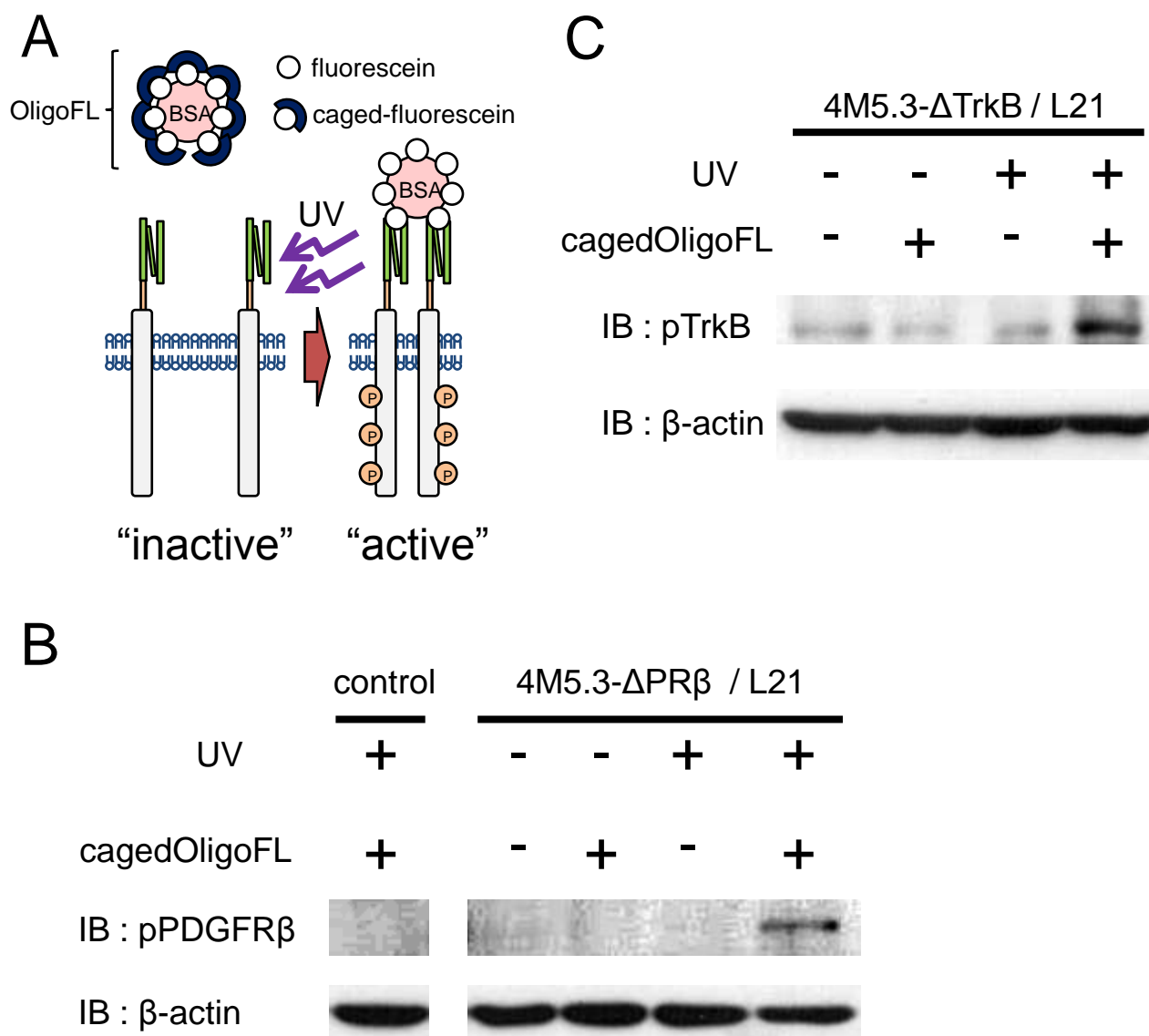
Figure 8 ケイジ解除により産生されるフルオレセインとキメラ受容体の結合

(A) ケイジ解除により産生されるフルオレセインとキメラ受容体の結合

4M5.3-ΔPRβ/L21を発現した細胞にビオチン化ケイジドフルオレセイン (cagedFL-biotin) を投与した。その後のUV光の照射時と非照射時のフルオレセインの細胞膜への結合をローダミン標識したストレプトアビジンの蛍光強度を用いて評価した。図はローダミンの蛍光画像を示す。スケールバーは20 μmを示す。

(B) 光照射依存的なケイジドフルオレセインとキメラ受容体の結合の定量

4M5.3-ΔPRβ/L21を発現した細胞にビオチン化ケイジドフルオレセイン (cagedFL-biotin) を投与し、UV光照射の有無でのビオチンの細胞膜への結合をローダミン標識したストレプトアビジンにて評価した際のローダミンの蛍光画像の蛍光強度を定量した。括弧内の数字は各群の細胞数を示す。平均値±標準誤差。\*\*\*  $p < 0.001$  (two tailed multiple  $t$ -test with bonferroni correction)



**Figure 9** 光照射依存的なキメラ受容体による受容体リン酸化の誘導  
 (A) ケイジド人工リガンドを介したキメラ受容体活性化の基本構造図  
 OligoFLのフルオレセインをケイジドフルオレセインに置き換えた人工リガンド  
 cagedOligoFLを作製した。cagedOligoFLを細胞外液に加え、UV光を照射することでケイジ  
 ドフルオレセインの保護基が外れ、キメラ受容体の二量体化を誘導し、RTK活性化を誘  
 導出来ると期待した。  
 (B) 光照射依存的なPDGFRβキメラ受容体シグナルの誘導  
 4M5.3-ΔPRβ/L21を発現させたNIH3T3細胞または非発現細胞にcagedOligoFLまたはvehicle  
 を投与し、UV光の照射を行った。リン酸化を抗PDGFRβリン酸化抗体を用いたウエスタ  
 ンブロット法によりすることで検出した。β-actinをローディングコントロールとして用い  
 た。  
 (C) 光照射依存的なTrkBキメラ受容体シグナルの誘導  
 4M5.3-ΔTrkB/L21を発現させたNIH3T3細胞にcagedOligoFLまたはvehicleを投与し、UV光  
 照射を行い、リン酸化を抗TrkBリン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法にて検出し  
 た。β-actinをローディングコントロールとして用いた。

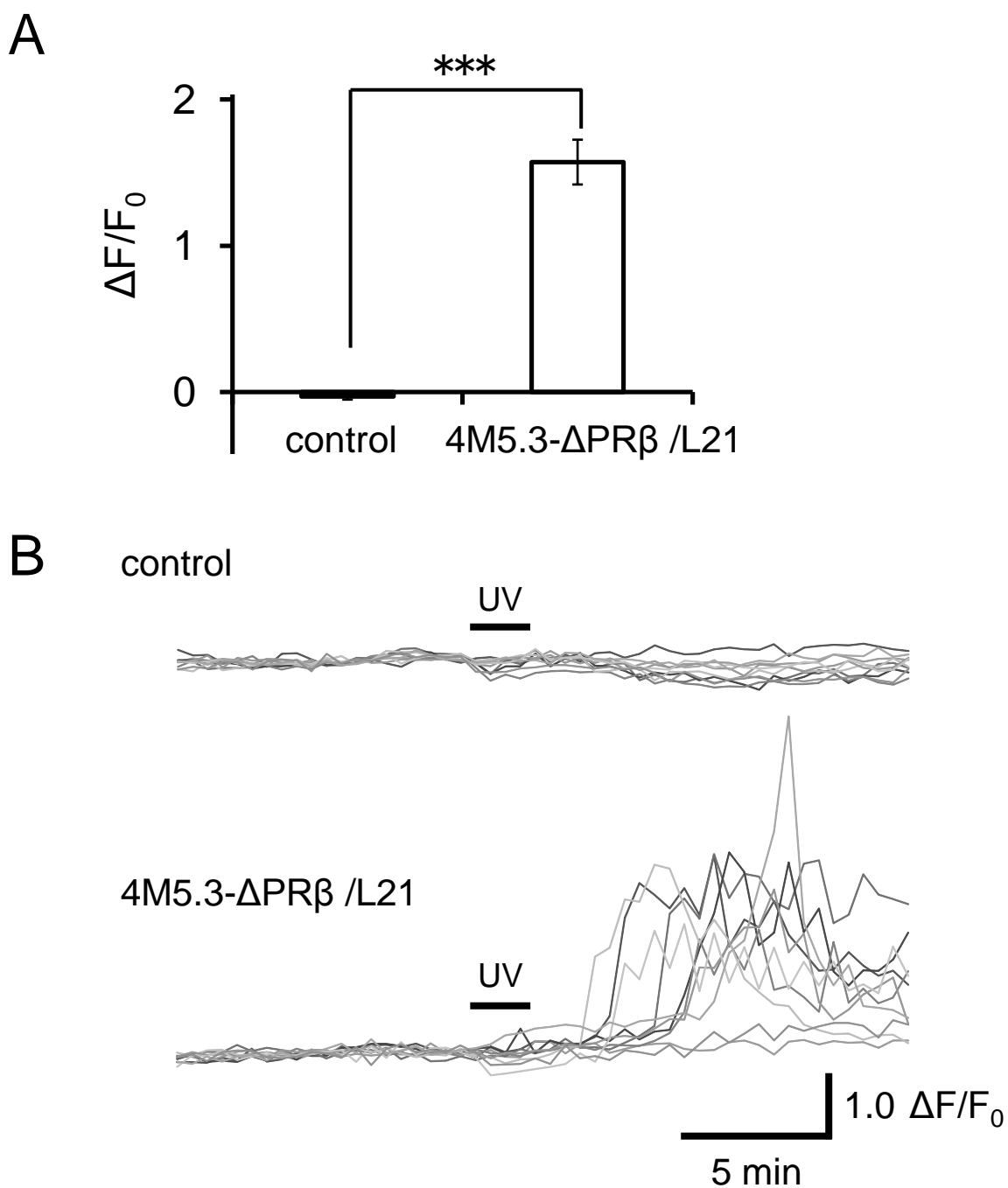


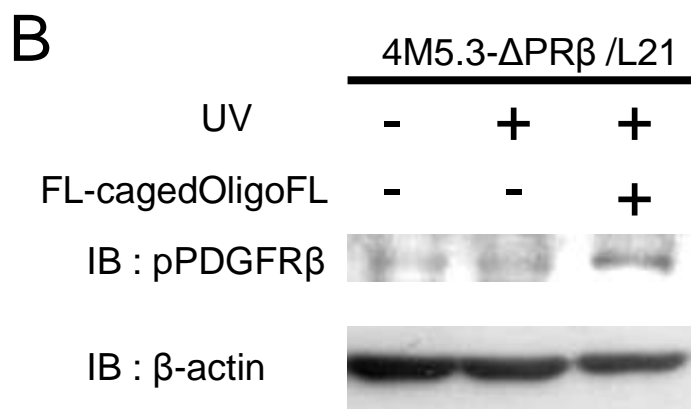
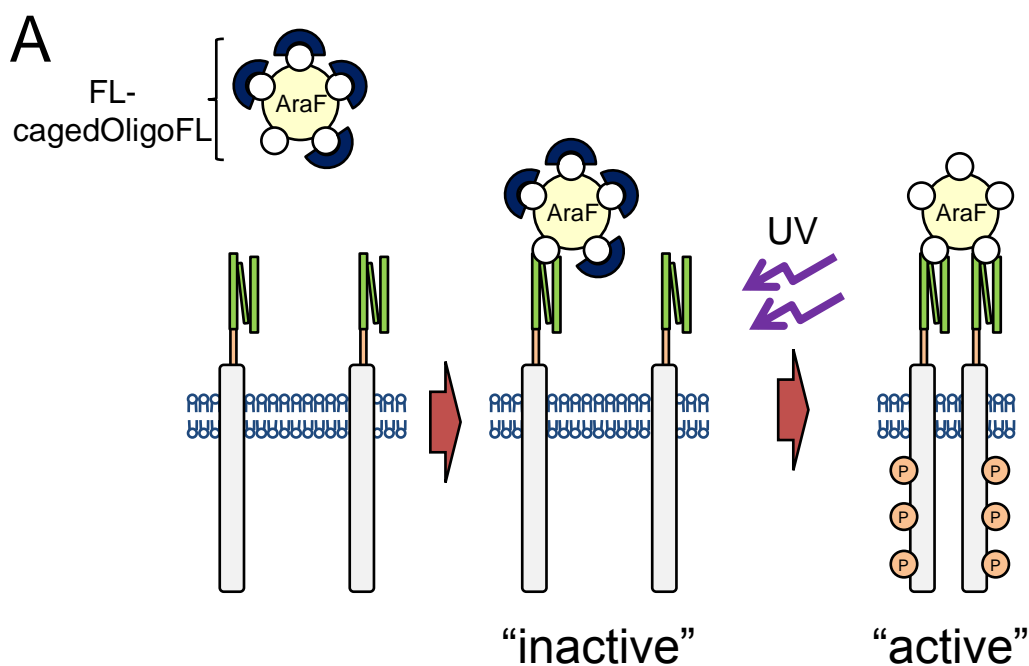
Figure 10 光照射依存的な細胞内カルシウム濃度上昇の誘導

(A) 光照射8分後のカルシウム濃度変化

4M5.3-ΔPRβ/L21を発現させたNIH3T3細胞(N = 89)と非発現NIH3T3細胞(control, N = 92)についてUV光照射8分後の蛍光比率 ( $\Delta F/F_0$ ) を定量した。平均値±標準誤差。\*\*\*  $p < 0.001$  (Welch's *t*-test)

(B) 個々の細胞の光照射依存的なカルシウム濃度の経時変化

4M5.3-ΔPRβ/L21を発現させたNIH3T3細胞または非発現細胞にcagedOligoFL投与し、UV光照射を行った。個々の細胞内カルシウム濃度変化(n=10)をFluo-4にて検出した。 $\Delta F/F_0$ は各時間のFluo-4の蛍光増加 ( $\Delta F$ ) をUV照射前の蛍光 ( $F_0$ ) で除することで算出した。



**Figure 11** ケイジド人工リガンドを介したキメラ受容体活性化

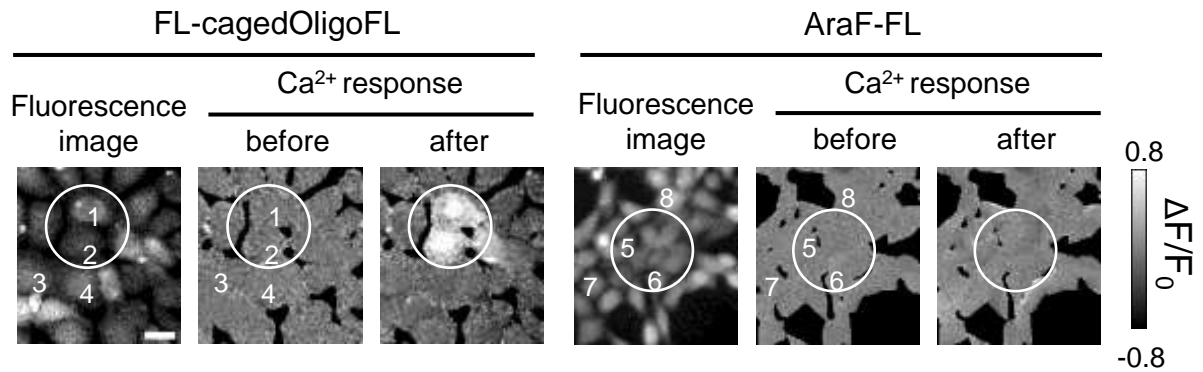
(A) ケイジド人工リガンドを介したキメラ受容体活性化の構造図

複数のケイジドフルオレセインと保護基の付いていないフルオレセインを一つだけ配した人工リガンドFL-cagedOligoFLを作製した。FL-cagedOligoFLを細胞外液に加えると、FL-cagedOligoFLのフルオレセインがキメラ受容体と結合する。UV光照射によってケイジドフルオレセインの保護基が外れ、新たに生じたフルオレセインによってキメラ受容体の二量体化が誘導され、細胞内RTKシグナルを誘導出来ると期待した。

(B) FL-cagedOligoFLによる受容体リン酸化の誘導

4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21を発現させたNIH3T3細胞にFL-cagedOligoFLまたはvehicleを投与し、洗浄した後に、UV光照射を行った。4M5.3- $\Delta$ PR $\beta$ /L21のリン酸化を抗PDGFR $\beta$ 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。 $\beta$ -actinをローディングコントロールとして用いた。

A



B

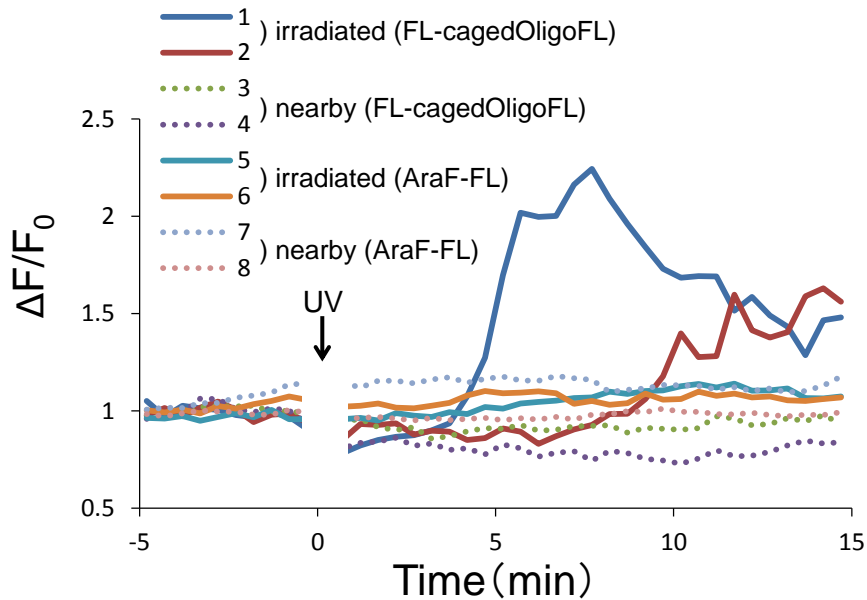


Figure 12 局所的な細胞内カルシウム濃度上昇の誘導

(A) 光照射依存的な細胞内カルシウム濃度上昇の誘導

4M5.3-ΔPRβ/L21を発現させたNIH3T3細胞にFL-cagedOligoFLまたはAraF-FL投与し標識した後、洗浄し、カルシウム濃度上昇をFluo-4で測定した。画像はそれぞれFluo-4蛍光画像(左)、UV光照射前(中央)と後(右)の蛍光比率( $\Delta F/F_0$ )を示す。直径50  $\mu\text{m}$ の範囲(白丸)にUV照射を行った。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ を示す。

(B) FL-cagedOligoFLまたはAraF-FLによる光照射依存的なカルシウム濃度の経時変化。トレースの番号はFigure 15Aで番号づけられた細胞に一致する。

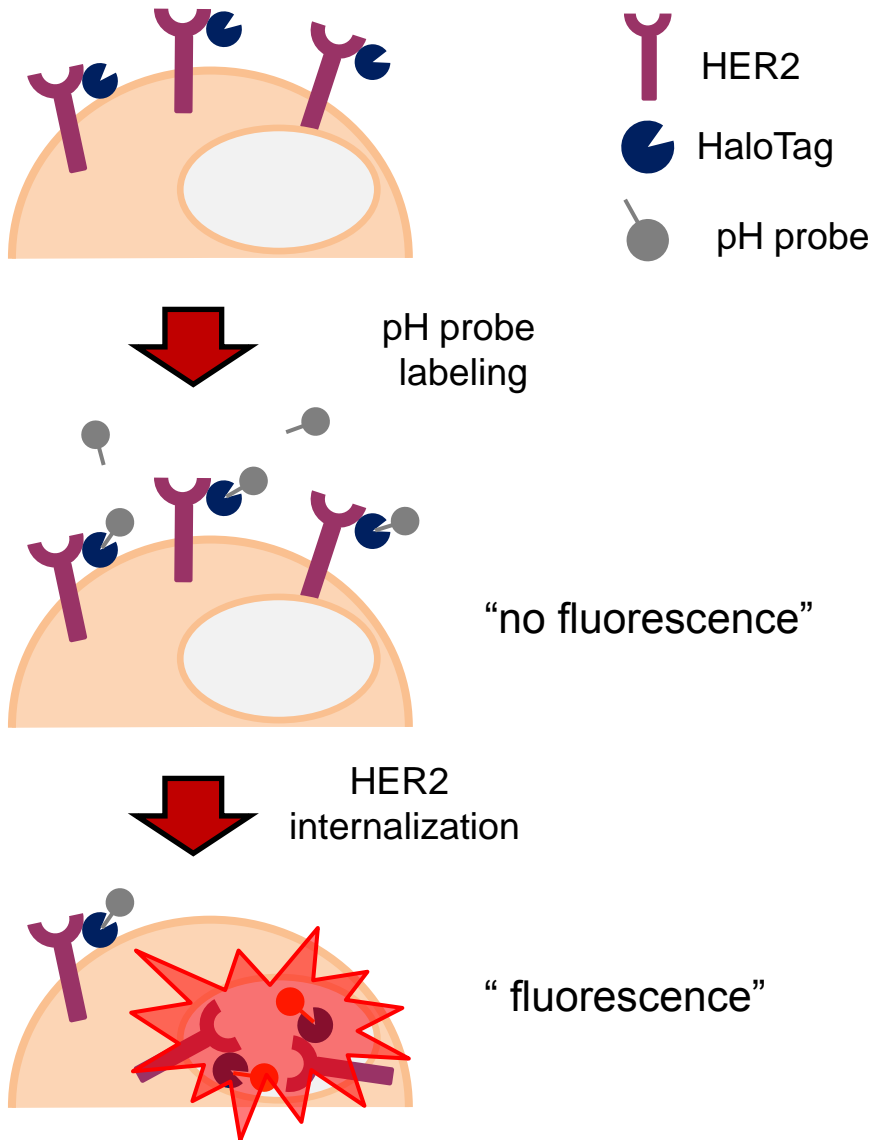


Figure 13 HER2内在化の検出方法

Haloタグ融合HER2 (Halo-HER2) を発現させた細胞に、Haloリガンドを付加したpH感受性蛍光プローブを加えると蛍光プローブが受容体に結合する。プローブは細胞外の中性環境にあると無蛍光性である (no fluorescence)。HER2の内在化を誘導する薬物の作用によって、プローブがHalo-HER2と共に細胞内に小胞として取り込まれ、酸性環境下になることで蛍光性となる (fluorescence)。



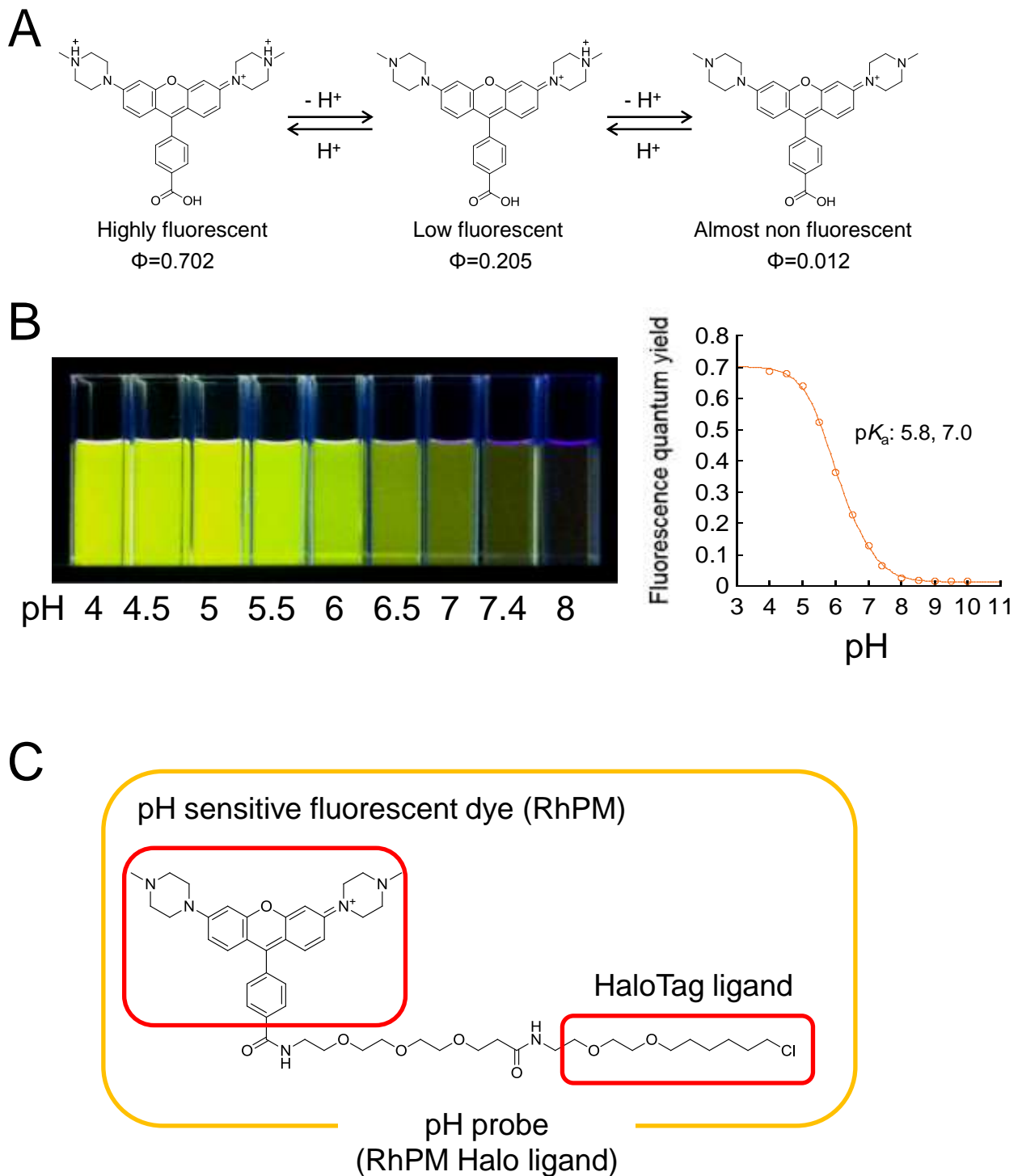


Figure 14 pHプローブの設計

(A) pH感受性色素の構造

ローダミンを基としたpH感受性蛍光色素 (RhPM) は、酸性で蛍光を有するようになる。

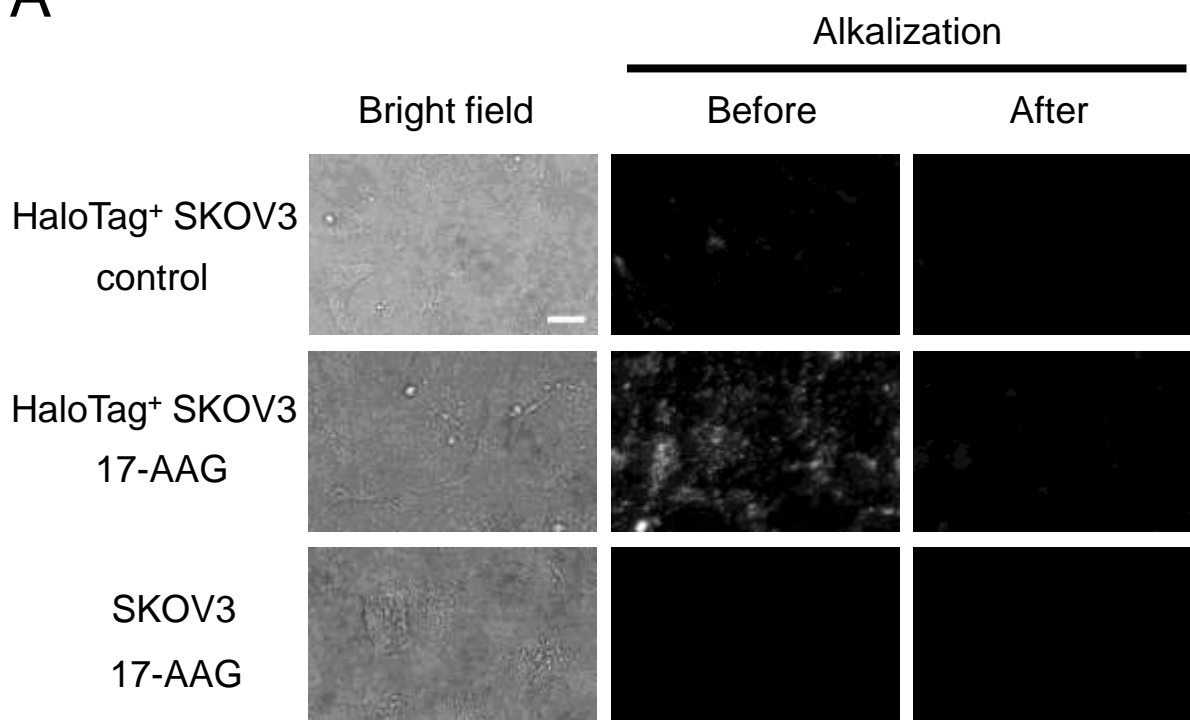
(B) RhPMのpH依存的な蛍光変化

RhPMは酸性環境 (pH4-6) で強い蛍光、中性環境 (pH7.4) で弱い蛍光を示す。

(C) pH感受性プローブの構造

pH感受性プローブ (RhPM Haloリガンド) はRhPMとHaloタグとの結合領域をリンカーでつないだ構造である。

A



B

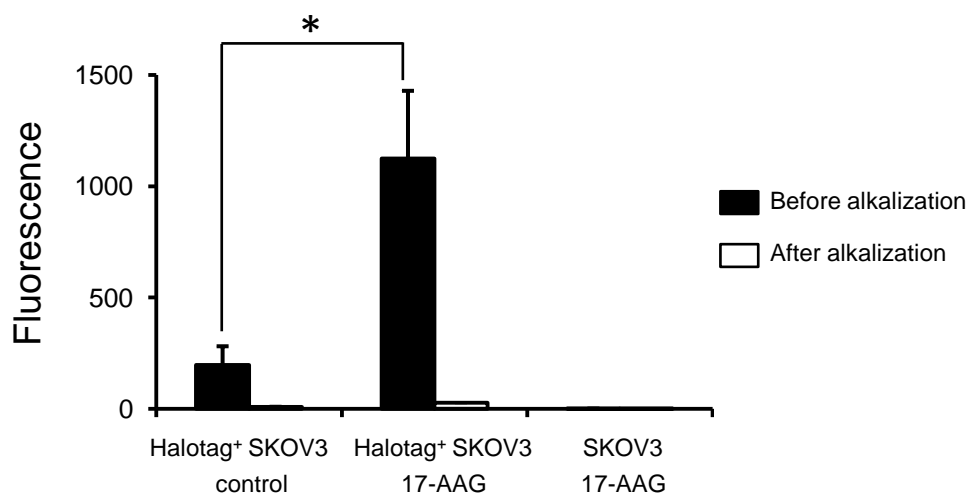


Figure 15 Halo-HER2内在化イメージング

A. Halo-HER2内在化による蛍光像の変化

Halo-HER2発現細胞または非発現細胞にRhPM Haloリガンドを投与し、さらに17-AAGまたはvehicle（対照）の投与を行い、培養した後、細胞内小胞をアルカリ化した。

明視野（左）アルカリ化処理の前（中央）後（右）の蛍光像を示した。スケールバーは20 μmを示す。

B. Halo-HER2内在化による蛍光強度変化

アルカリ化処理前後の蛍光画像の蛍光強度を定量した。平均値±標準偏差。\* $p < 0.05$  (Welch's  $t$ -test)

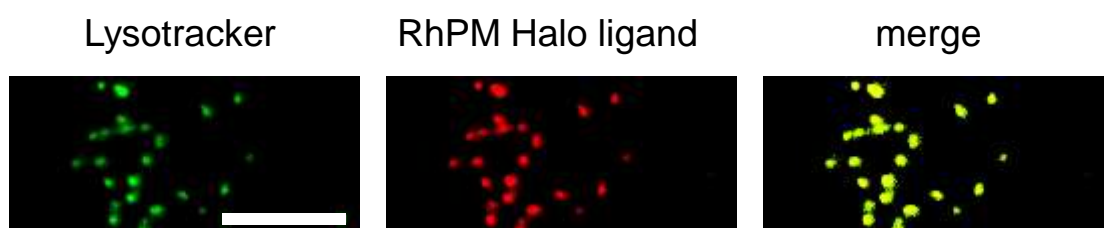


Figure 16 内在化したHalo-HER2とLysotrackerの細胞内分布の比較  
17-AAGによって内在化したHalo-HER2と細胞内酸性小器官のマーカであるLysotrackerの蛍光染色像を比較した。Lysotracker (左) RhPM Haloリガンド (中央) の蛍光像とmerge像 (右) 示した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

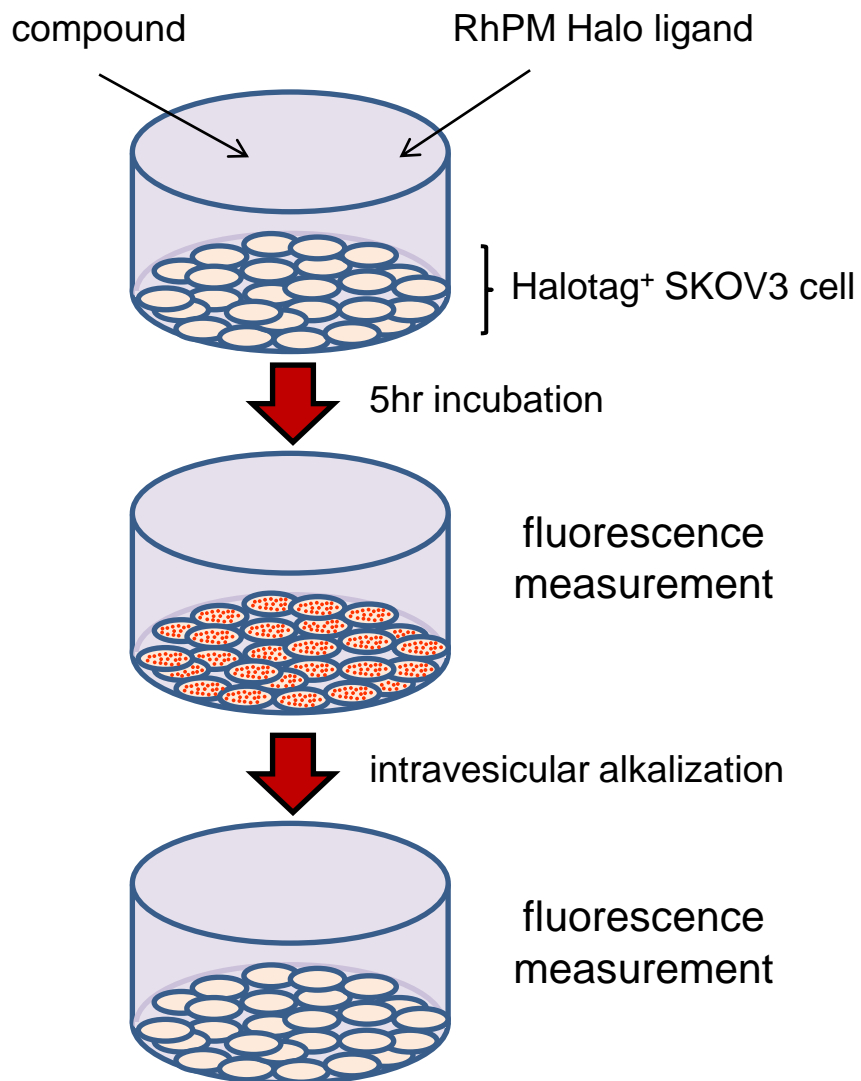
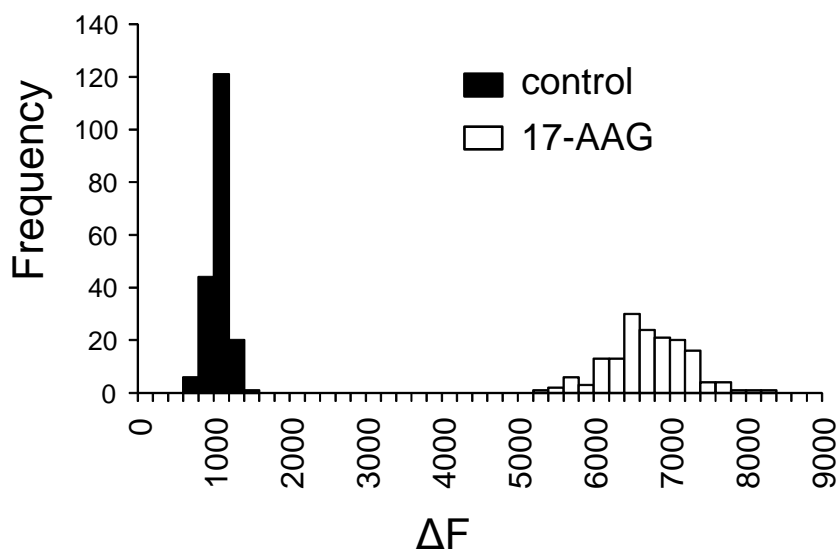


Figure 17 プレートリーダーを用いた内在化の検出

Halo-HER2発現細胞を接着させた384ウェルプレートの各ウェルに評価対象の試験化合物とRhPM Haloリガンドを加え、5時間培養する。各ウェルの蛍光強度をプレートリーダーで測定し、細胞内小胞のアルカリ処理を行い、再び蛍光強度をプレートリーダーで測定する。アルカリ化処理による蛍光強度の減少 ( $\Delta F$ ) をHalo-HER2内在化の指標とする。

A



B

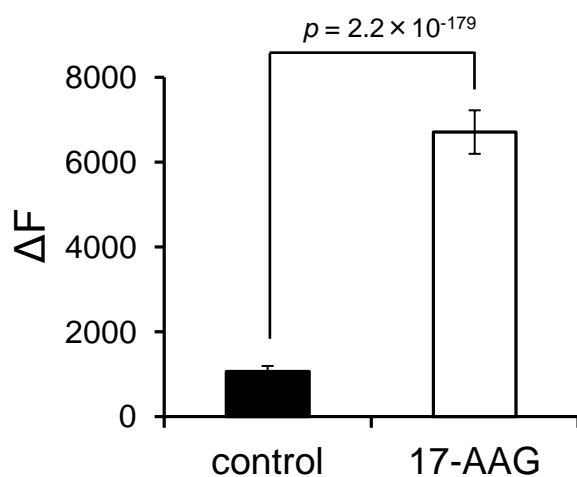


Figure 18 17-AAGによるHalo-HER2の内在化誘導

(A) 17-AAGと対照の $\Delta F$ の度数分布

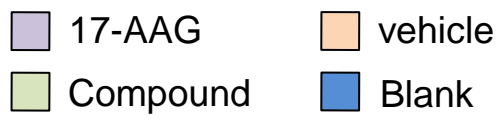
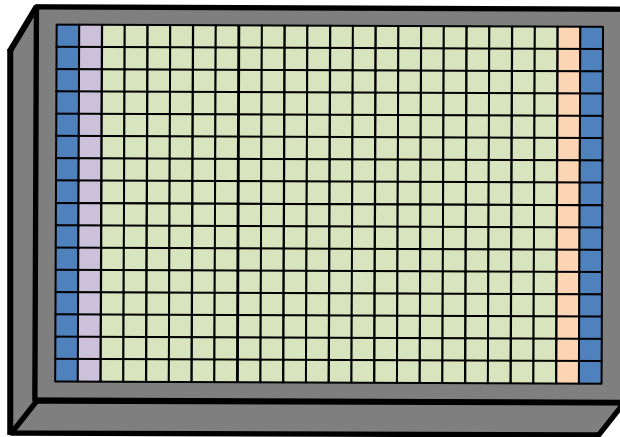
17-AAG (N = 160) とvehicle (対照、N = 192) を用いて、384ウェルプレートで試験した際の $\Delta F$ の度数分布を示す。

(B) 17-AAGによる内在化誘導の定量

17-AAG投与群とvehicle投与群(対照)の $\Delta F$ の平均値を示す。平均値 $\pm$ 標準偏差。

$p = 2.2 \times 10^{-179}$  (Welch's *t*-test)

A



B

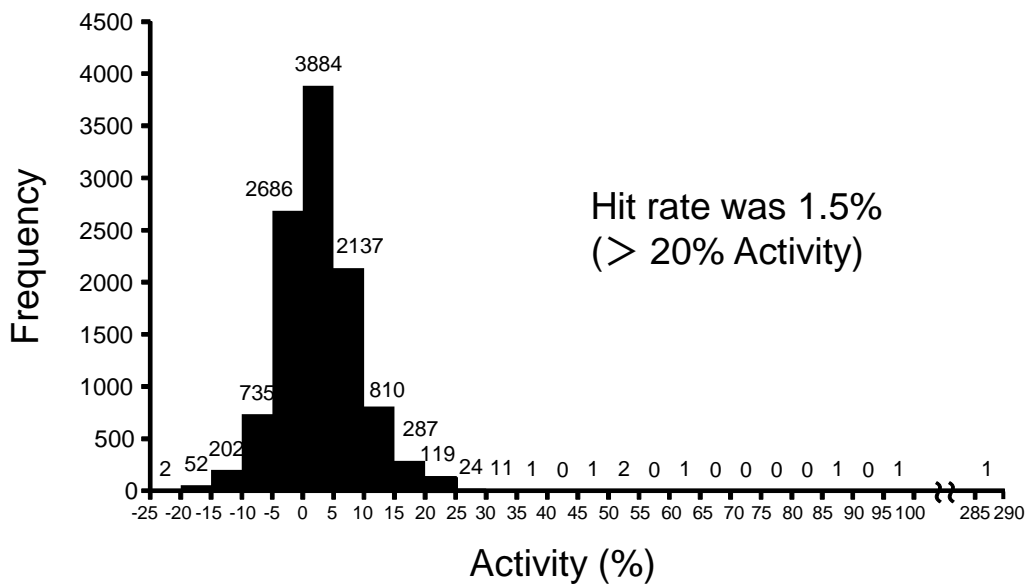


Figure 19 HER2内在化誘導薬のスクリーニング

(A) 384ウェルプレートの化合物の配置

384ウェルプレートによる試験は17-AAG（陽性対照、16ウェル）、vehicle（陰性対照、16ウェル）、試験化合物（320ウェル）を図のように配置し、実施した。

(B) 試験化合物の相対活性の度数分布

ライブラリーの化合物を用いて、Halo-HER2内在化スクリーニングを行った際の相対活性の度数分布を示す。

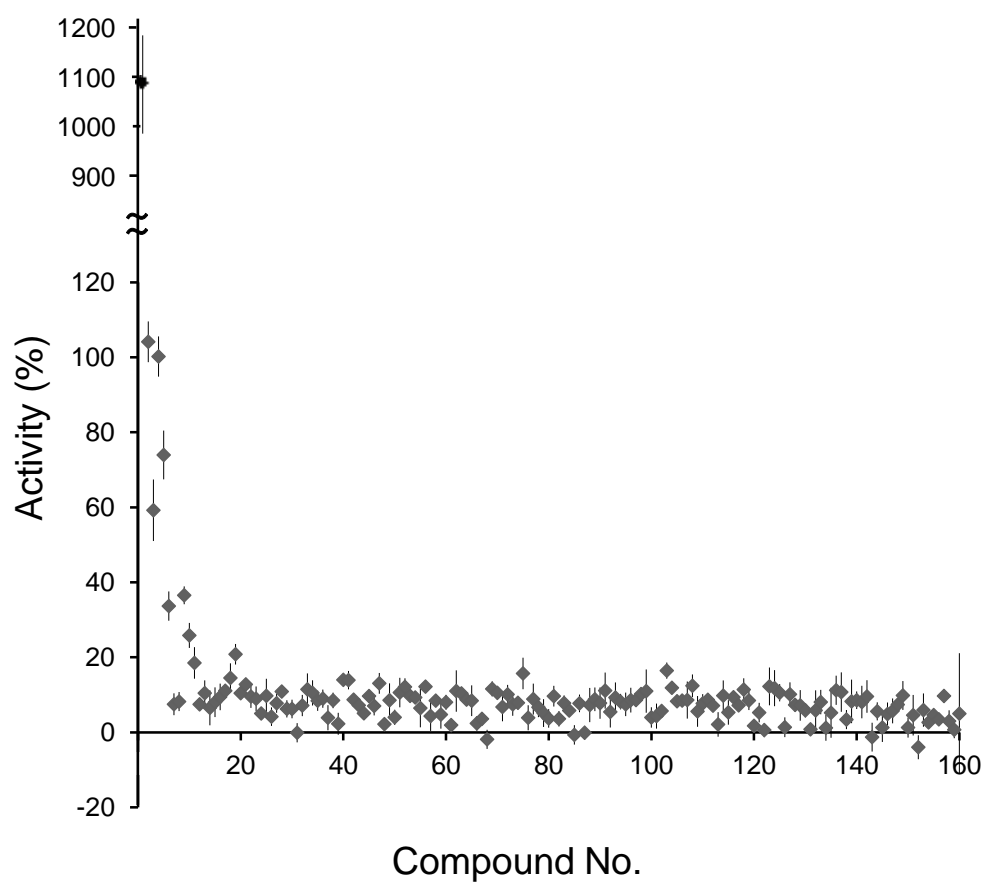


Figure 20スクリーニングの再現性試験

10,957化合物のスクリーニングの結果、上位の160位に入った化合物についてスクリーニングの再現性試験を行った際の相対活性を示す。平均値±標準偏差。

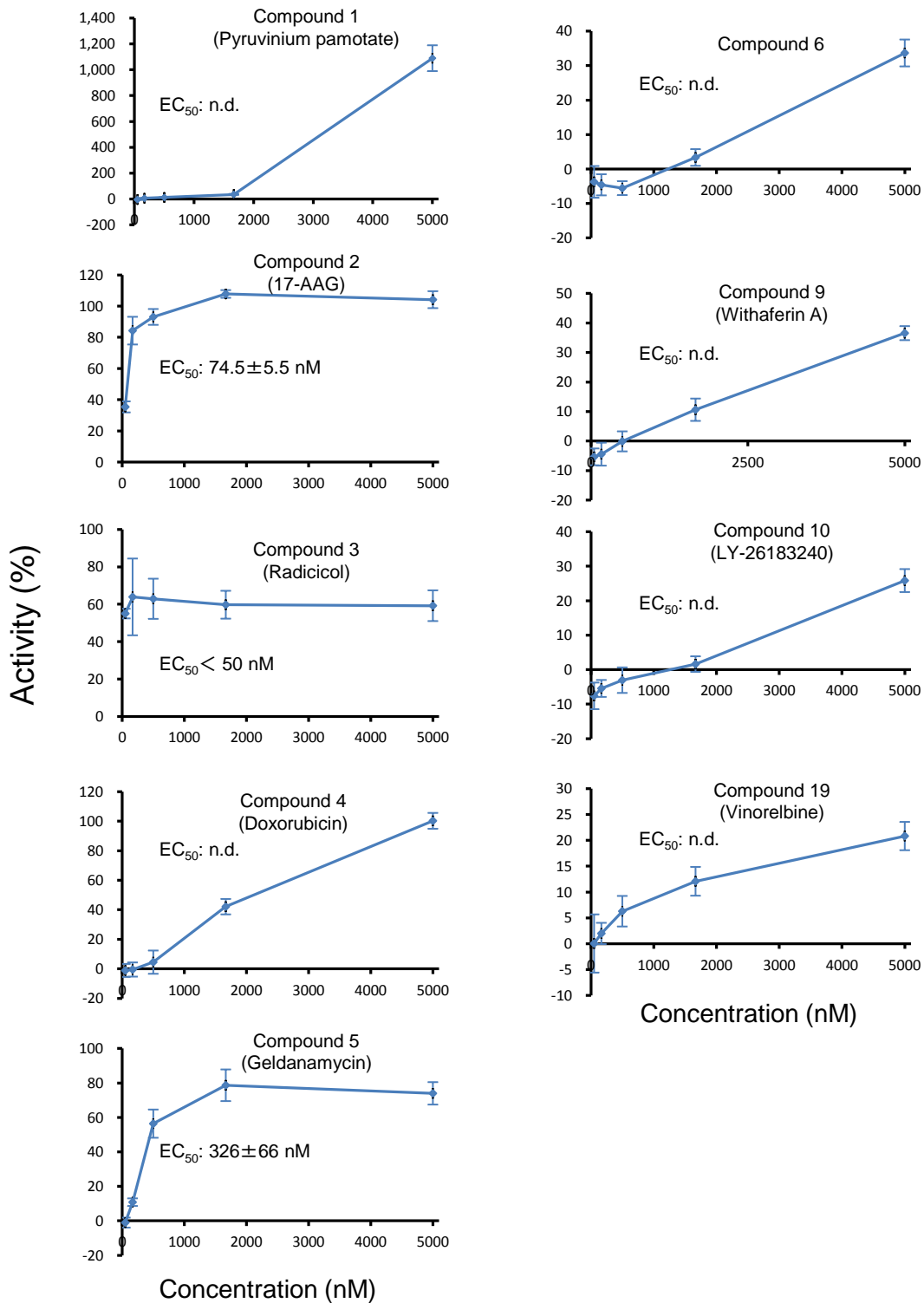
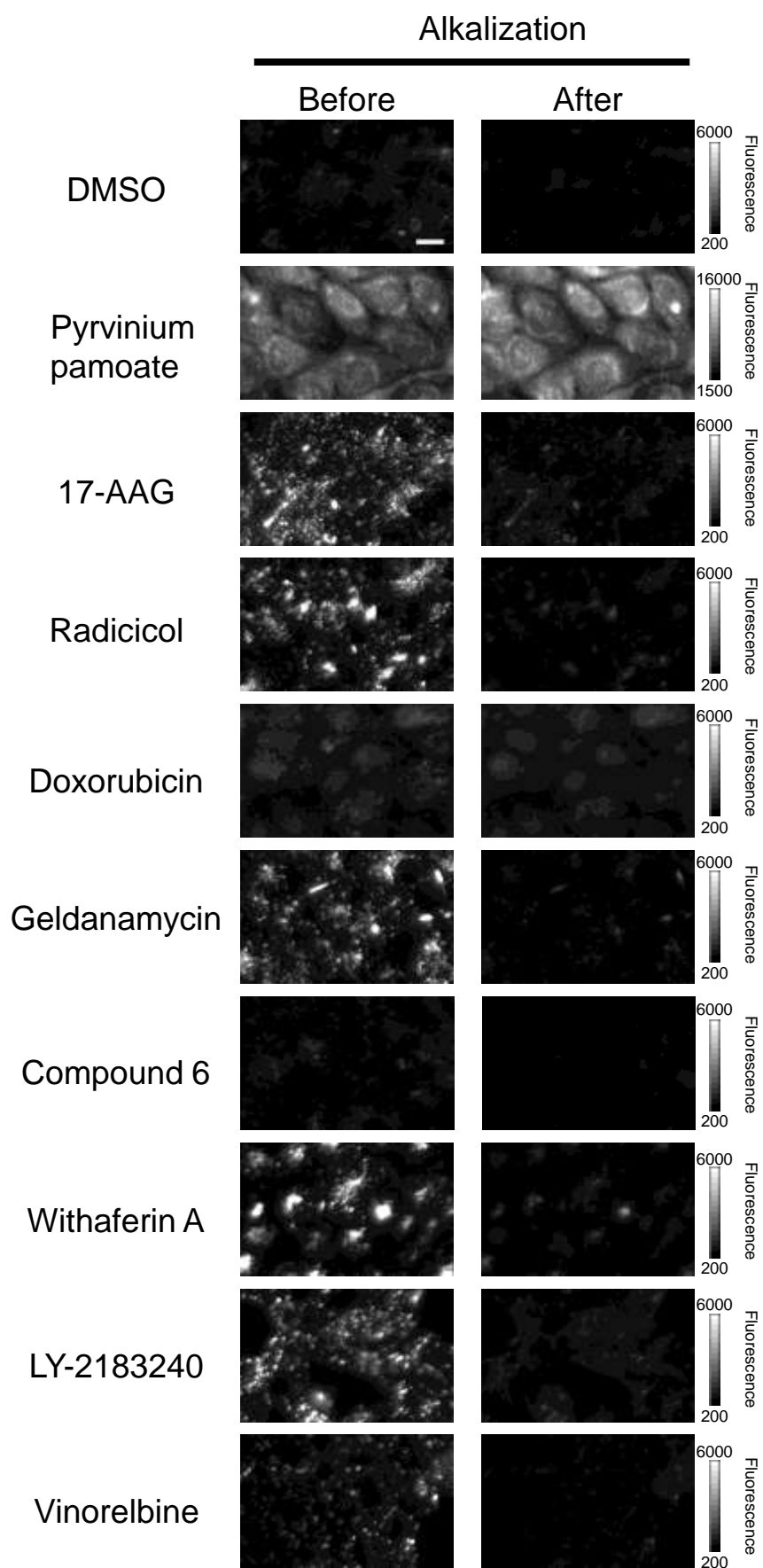


Figure 21 試験化合物の用量反応性試験  
 試験化合物について50, 133, 500, 1333, 5000 nMの濃度にてHalo-HER2内在化試験を行った際の相対活性を示す。平均値±標準偏差。n.d.: not determined.



A



B

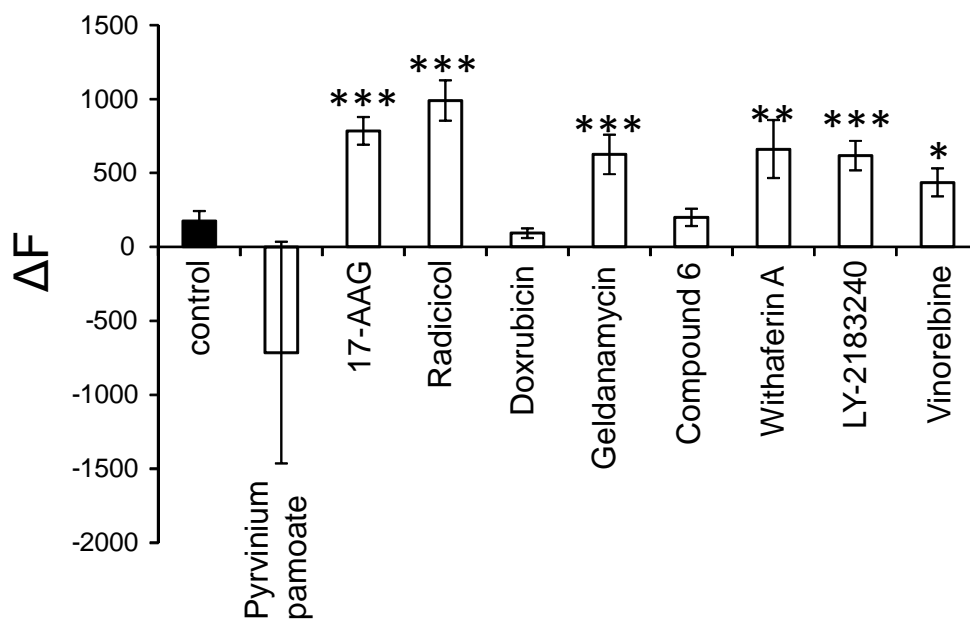


Figure 22 試験化合物によるHalo-HER2内在化イメージング

(A) Halo-HER2内在化のイメージングによる評価

Halo-HER2発現細胞にRhPM Haloリガンドを投与し、さらに試験化合物を投与し、培養した後に、細胞内小胞のアルカリ化処理を行った。アルカリ化の前（左）後（右）の蛍光像を示した。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ を示す。

(B) HER2内在化による蛍光強度変化

Halo-HER2発現細胞にRhPM Haloリガンドを投与し、さらに試験化合物を投与し、培養した後に、細胞内小胞のアルカリ化処理を行った。アルカリ化した前後の蛍光強度の減少  $\Delta F$ を定量した。平均値 $\pm$ 標準偏差。\* $p < 0.01$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$  (two-tailed multiple  $t$ -test with Bonferroni's correction vs. control)

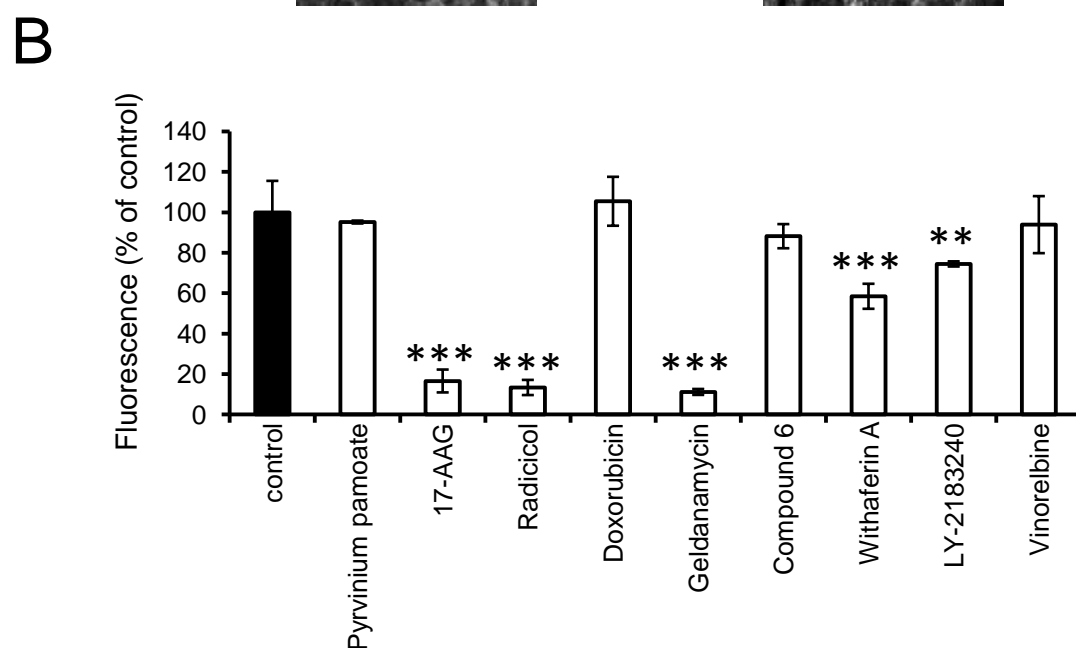
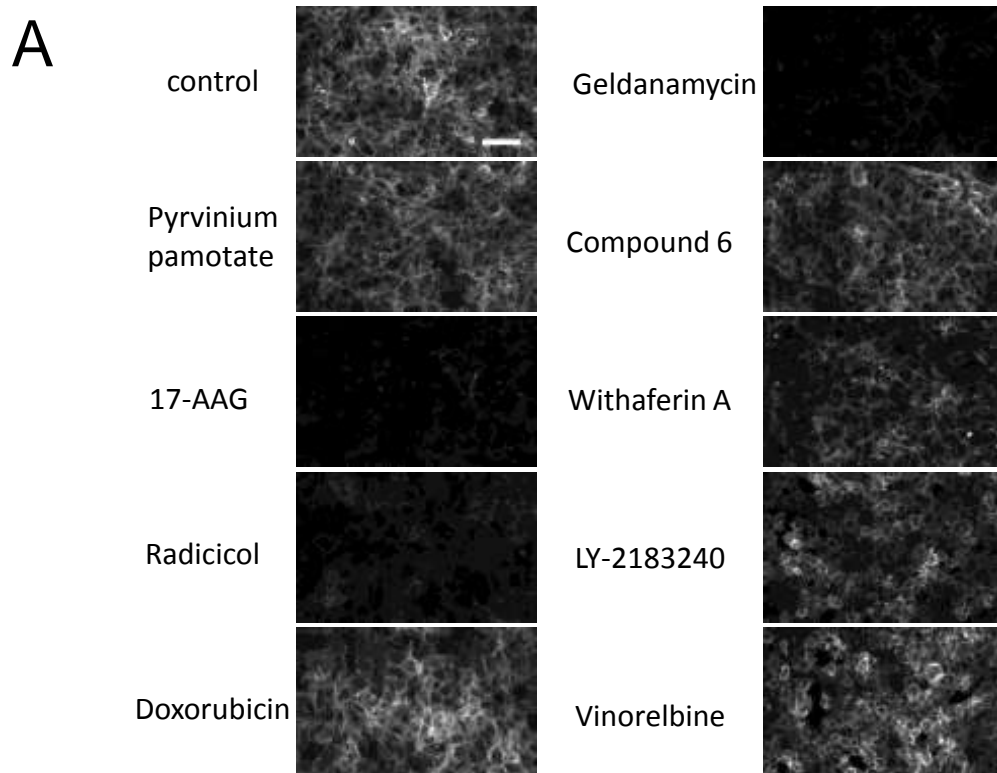


Figure 23 細胞膜上のHalo-HER2イメージング

(A) 細胞膜上のHalo-HER2イメージング

Halo-HER2発現細胞に試験化合物を投与し、培養した後、細胞膜上のHalo-HER2の発現をAlexa647 Haloリガンドで検出した。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ を示す。

(B) 細胞膜上のHalo-HER2発現量

Halo-HER2発現細胞に試験化合物を投与し、培養した後、細胞膜上のHalo-HER2の発現量をAlexa647 Haloリガンドの蛍光強度によって定量した。縦軸は対照投与群の蛍光強度を100%とした際の、各試験化合物投与群の蛍光強度の相対値。平均値 $\pm$ 標準偏差。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$  (multiple comparisons test of Dunnett)

Table. 1 オリゴDNA一覧

PDGFR $\beta$ -F	5'-CCCGTCGACGAATGCTGTGGGCCAGGACAC-3'
PDGFR $\beta$ -R	5'-CCCGCGGCCGCCTACAGGAAGCTATCCTCTGCT-3'
4M5.3-F	5'-ATCGGCCAGCCGGCCGACGTCGTTATGACT-3'
4M5.3-R	5'-TTAGTCGACTGAGGAGACGGTGACTGAGGT-3'
FLAG-F	5'-GATGATGATAAAGTCGACGAACAAAACTCATCTCAGAAGA-3'
FLAG-R	5'-ATCTTTATAATCTGAGGAGACGGTGACTGAGGT-3'
V5-F	5'-TATTAGGTCTGGACTCCACCGTCGACGAACAAAA ACTCATCTCAGAAGA-3'
V5-R	5'-GAGGGTTTGGGATCGGCTTTCCTGAGGAGACGGT GACTGAGGT-3'
TrkB-F	5'-CCCCTCGAGAATGCTAACAAAAGTAATGAGATCCCCTCCACG-3'
TrkB-R	5'-CCCGCGGCCGCCTAGCCTAGGATGTCCAGGTAGA-3'
mTrkB-F	5'-GTGCATCACCCAGGGCAGAGTC-3'
mTrkB-R	5'-TCTATCACCTCGTTGTTTGATAGCTGATAC-3'
4M- $\Delta$ TB-F	5'-CCCGGATCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCT-3'
4M- $\Delta$ TB-R	5'-CCCGAATTCACGCGTCTAGCCTAGGATGTCCAGGT-3'
AktGFP-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGA GCGACGTGGCTATTGTGAAG 3'
AktGFP-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTA CTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
ccdB-F	5'-GGGGATATCACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAACG-3'
ccdB-R	5'-GGGACGCGTACCACTTTGTACAAGAAAGCTGAACG-3'
AraF-F	5'-GGAATTCATATGAACCTGAAGCTCGGTTTTCTGGTGGAGCAAC-3'
AraF-R	5'-CCGCTCGAGCTTACCGCCTAAACCTTTTTTCTCC AGTTCTTCTTTAAAGT-3'
AraF C64A-F	5'-GCTACTCCGGACCCCAAAC-3'
AraF C64A-R	5'-AATAACGAAACCTTTTGGCGCCACTGG-3'

Table. 2 オリゴDNA一覧

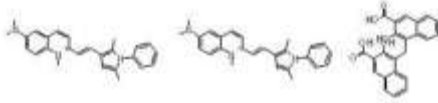
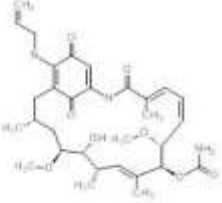
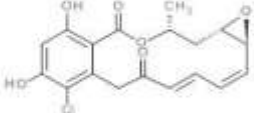
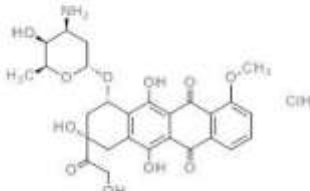
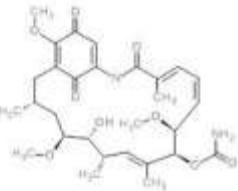
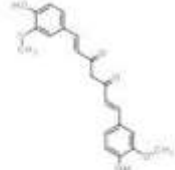

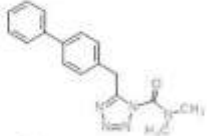
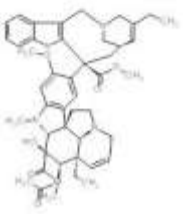
Halo-F	5'-CCCAAGCTTTACCCATACGATGTTCCAGATTACG-3'
Halo-R	5'-CCGGTGCACACTTGGGTACCGGAAATCTCCAGAGTAGAC-3'
HER2-F	5'-GTCTACTCTGGAGATTTCCGGTACCCAAGTGTGCACCGGCA-3'
HER2-R	5'-CCCGTCGACTCACACTGGCACGTCCAGAC-3'
HER2 <sub>ss</sub> -F1	5'-GATCATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCCGC3'
HER2 <sub>ss</sub> -F2	5'-TGGGGGCTCCTCCTCGCCCTCTTGCCCCCGGAGCCGCGAGCA-3'
HER2 <sub>ss</sub> -R1	5'-GAGGAGCCCCCAGCGGCACAAGGCCGCCAGCTCCAT-3'
HER2 <sub>ss</sub> -R2	5'-AGCTTGCTCGCGGCTCCGGGGGGCAAGAGGGGCGAG-3'

Table. 3 スクリーニングにおけるプレート毎のZ'-factor

No.	Z'-factor	No.	Z'-factor
Plate 1	0.71	Plate 21	0.57
Plate 2	0.41 (0.67)	Plate 22	0.65
Plate 3	0.60	Plate 23	0.61
Plate 4	0.62	Plate 24	0.64
Plate 5	0.61	Plate 25	0.71
Plate 6	0.47 (0.75)	Plate 26	0.57
Plate 7	0.69	Plate 27	0.64
Plate 8	0.56	Plate 28	0.64
Plate 9	0.60	Plate 29	0.60
Plate 10	0.56	Plate 30	0.70
Plate 11	0.62	Plate 31	0.66
Plate 12	0.68	Plate 32	0.66
Plate 13	0.72	Plate 33	0.62
Plate 14	0.68	Plate 34	0.72
Plate 15	0.68	Plate 35	0.66
Plate 16	0.56		
Plate 17	0.50		
Plate 18	0.64		
Plate 19	0.68		
Plate 20	0.57		

括弧内は再試験の際の値

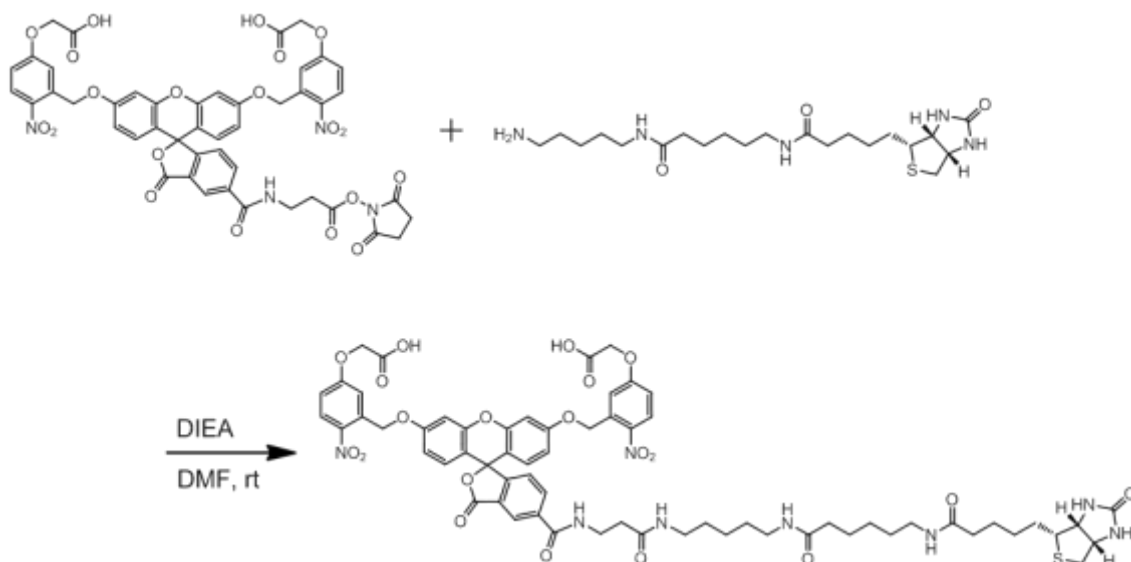
Table. 4 試験化合物の名称と構造

Compound No.	Compound NAME	IUPAC NAME	Compound structure
Compound 1	Pyrvinium pamoate	4-[(3-Carboxy-2-hydroxynaphthalen-1-yl)methyl]-3-hydroxynaphthalene-2-carboxylic acid; 1-methyl-2-[(E)-2-thiophen-2-ylethenyl]-5,6-dihydro-4H-pyrimidine	
Compound 2	17-AAG	[(3S,5S,6R,7S,8E,10R,11S,12E,14E)-21-(allylamino)-6-hydroxy-5,11-dimethoxy-3,7,9,15-tetramethyl-16,20,22-trioxo-17-azabicyclo[16.3.1]docosa-8,12,14,18,21-pentaen-10-yl] carbamate	
Compound 3	Radicalol	(1aR,2E,4E,14R,15aR)-8-chloro-9,11-dihydroxy-14-methyl-1a,14,15,15a-tetrahydro-6H-oxireno[e][2]benzoxacyclotetradecine-6,12(7H)-dione	
Compound 4	Doxorubicin	(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione hydrochloride	
Compound 5	Geldanamycin	(4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-hydroxy-8,14,19-trimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate	
Compound 6		(1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione	
Compound 9	Withaferin A	5,6-Epoxy-4,27-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide	
Compound 10	LY-2183240	N,N-dimethyl-5-[(4-biphenyl)methyl]tetrazole-1-carboxamide	
Compound 19	Vinorelbine	4-(acetyloxy)-6,7-didehydro-15-((2R,6R,8S)-4-ethyl-1,3,6,7,8,9-hexahydro-8-(methoxycarbonyl)-2,6-methano-2H-azecino(4,3-b)indol-8-yl)-3-hydroxy-16-methoxy-1-methyl-1-methyl ester	

## 付録

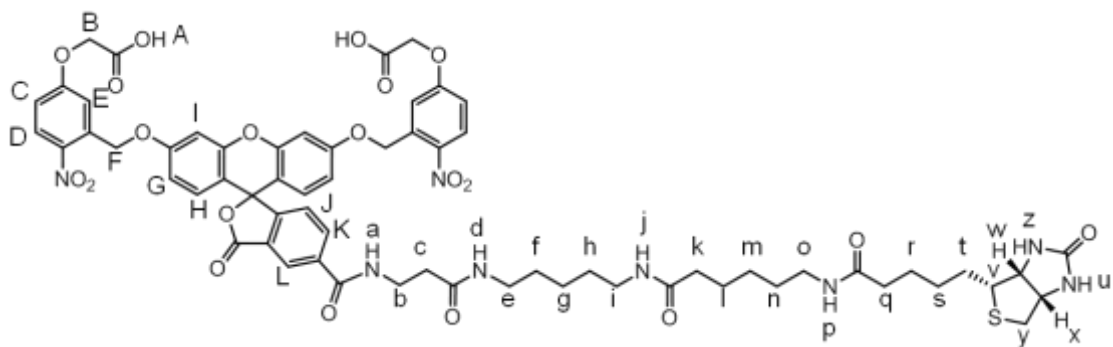
### スペクトル測定

$^1\text{H}$  NMR スペクトルは JEOL JNM-LA300 spectrometer (300 MHz, JEOL) または Bruker AVANCE III 400 spectrometer (400 MHz, Bruker) にて測定した。 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル JEOL JNM-LA300 spectrometer (75 MHz) または Bruker AVANCE III 400 spectrometer (100 MHz) で測定した。マスマスペクトル JMS-T100LC AccuToF for ESI (JEOL) または Bruker microTOF II-TM (Bruker) にて測定した。



Scheme S1 ビオチン化ケイジドフルオレセインの合成



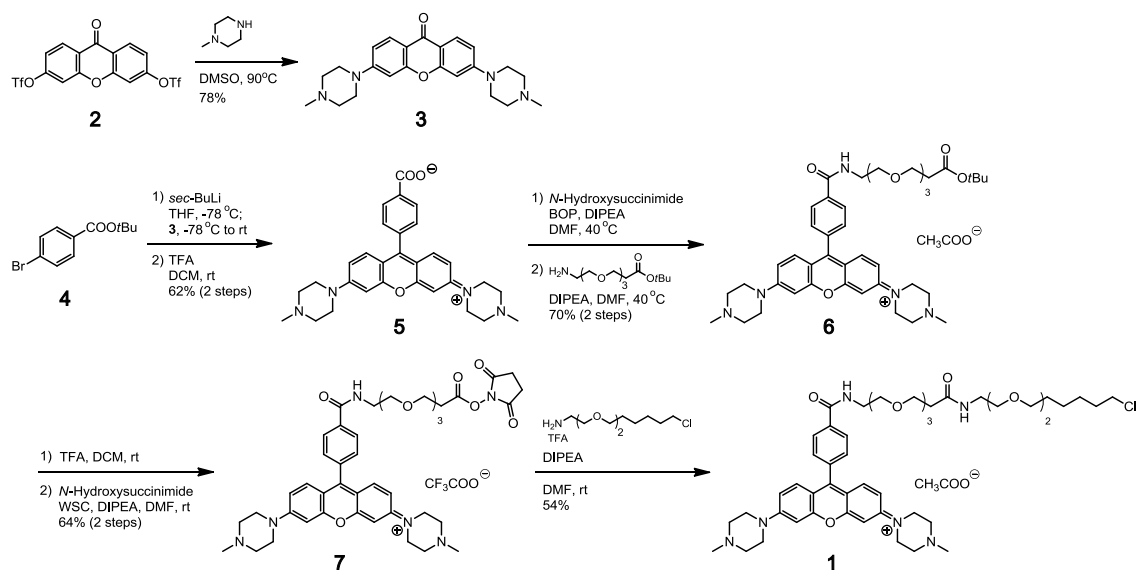


### ビオチン化ケイジドフルオレセインの合成

ビオチン化ケイジドフルオレセインの合成法は Scheme S1 に示した。具体的には 5-Carboxyfluorescein-Bis-(5-Carboxymethoxy-2-Nitrobenzyl) Ether,  $\beta$ -Alanine-Carboxamide, Succinimidyl Ester (1 mg, 1.03  $\mu$ mol) と Biotin-X cadaverine, trifluoroacetate salt (Biotium; 5.7 mg, 10.3  $\mu$ mol) はアルゴン下、大気圧中で *N,N*-dimethylformamide (DMF; 2 mL)、*N,N*-diisopropylethylamine (DIEPA; 3.5  $\mu$ L, 20.4  $\mu$ mol) と共に一時間室温で攪拌した。溶媒を減圧下で留去して、残渣を水及びアセトニトリル中に溶解し、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフ (High performance liquid chromatography: HPLC) で精製して、ビオチン化ケイジドフルオレセインを固体として 0.6 mg (45%) 得た。 $^1\text{H-NMR}$  NMR (400 MHz, DMSO *d*-6) : $\delta$  8.90-8.93 (t, 1H,  $J = 5.2$  Hz; a), 8.47 (s, 1H; L), 8.20-25 (m, 3H; D, K), 7.89-7.92 (t, 1H,  $J = 5.6$  Hz; d), 7.70-7.75 (m, 2H; j, p), 7.45 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz; J), 7.27 (d, 2H,  $J = 2.4$  Hz; I), 7.10-7.13 (m, 2H; C), 7.06 (d, 2H,  $J = 2.4$  Hz; E), 6.83-6.86 (m,

2H; G), 6.76 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz; H), 6.43 (s, 1H; u), 6.36 (s, 1H; z), 5.55 (s, 4H; F), 4.87 (s, 4H; B), 4.28-4.31 (m, 1H; x), 4.10-4.13 (m, 1H; w), 2.97-3.11 (m, 7H; e, i, o, v), 2.79-2.83 (m, 1H; y), 2.38-2.58 (m, 3H; c, y), 2.00-2.04 (m, 4H; k, q), 1.19-1.60 (m, 16H; f, g, h, l, m, n, r, s, t). High-resolution mass spectroscopy (HRMS) (ESI<sup>+</sup>) :

$C_{63}H_{69}N_8O_{20}S$  について計算値  $[M+H]^+ = 1289.4349$  ; 測定値 1289.4360.



Scheme S2 RhPM Halo リガンドの合成

### 3,6-Bis(4-methylpiperazin-1-yl)-9H-xanthen-9-one (化合物 3) の合成

合成法は Scheme S2 に示した。具体的には 9-Oxo-9H-xanthene-3,6-diylbis (trifluoromethanesulfonate) (2) <sup>S1</sup> (490 mg、0.10 mmol) を溶解した無水 DMSO 溶液 (5 ml) に、攪拌下で N-methylpiperazine (1.0 g、10 mmol) を室温で加えた。反応混合物を 90°C で 15 時間攪拌して、脱イオン水 (10 ml) で沈殿させた。沈殿物を採取し、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液および水で洗浄して、減圧化で乾燥させた。粗生成物をカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>-NH/CHCl<sub>2</sub>:MeOH = 10:1) で精製し、化合物 3 を黄色固体として 306 mg (収率 : 78%) 得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) : δ 8.14 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 6.89 (dd, *J* = 2.1 Hz, *J* = 9.6 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 3.42 (m, 8H), 2.58 (m, 8H), 2.37 (s, 6H).

4-(3-(4-methylpiperazine-1-ium-1-ylidene)-6-(4-methylpiperazine-1-yl)-3H-xanthen-9-yl) benzoate (化合物 5) の合成

アルゴンで洗浄したフレイムドライ済フラスコに、*tert*-butyl-4-bromobenzoate (4) <sup>S2</sup> (108 mg, 0.39 mmol) と無水 Tetrahydrofuran (THF; 5 ml) を加えた。その溶液を-78°Cにまで冷却し、1 M の *secondary*-Butyllithium (*sec*-BuLi; 0.5 mmol) を加え、混合物を 5 分間攪拌した。同じ温度で、無水 THF (5 ml) に溶解した化合物 3 (50 mg, 0.13 mmol) をゆっくり (約 20 秒) 添加し、それからこの混合物を室温まで加温し、1 時間攪拌した。2M HCl 水溶液 (3 ml) を添加して反応をクエンチし、室温で攪拌を 5 分間続けた。飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (30 ml) を加えて、全体を Dichloromethane (DCM; 50 ml, 3 回) により抽出した。有機溶媒をブライン (50 ml) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、溶媒を蒸発させて、紫色の固体 (150 mg) を得た。この固体を溶解した DCM 溶液 (3 ml) を攪拌しながら、Trifluoroacetic acid (TFA; 3 ml) を室温に加えた。この反応混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で留去して、残渣を水及びアセトニトリル中に溶解し、逆相カラムを用いた HPLC で精製して、化合物 5 を黒紫色の固体として 40 mg (62 %) 得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 8.20 (m, 2H), 7.48 (m, 4H), 7.28 (m, 2H), 7.20 (m, 2H), 3.80 (m, 8H), 2.62 (m, 8H), 2.37 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 173.7, 160.0, 158.6, 154.1, 153.0, 133.3, 130.7, 130.4, 127.4, 116.3, 115.5,

98.7, 55.5, 47.9, 45.8. HRMS (ESI<sup>+</sup>) : C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> に対する計算値 [M]<sup>+</sup> =

497.2553 ; 測定値 497.2525.

1-(9-(4-((14,14-Dimethyl-12-oxo-3, 6, 9, 13-tetraoxa pentadecyl) carbamoyl)phenyl)-  
6-(4-methylpiperazin-1-yl)-3H-xanten-3-ylidene)-4-methylpiperazin-1-ium acetate (化  
合物 **6**) の合成

化合物 **5** (35 mg, 70 μmol) の無水 DMF 溶液 (5 ml) を攪拌しながら、そ  
れに(Benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate  
(BOP; 160 mg, 0.35 mmol)、N-Hydroxysuccinimide (35 mg, 0.35 mmol) 及び DIPEA  
(240 μl, 0.70 mmol) を室温で加えた。アルゴン雰囲気下で反応混合物を 40°C で  
2 時間攪拌した。溶媒を蒸発させて、残渣を乾燥 DMF (2ml) 中に再溶解した。こ  
の残渣の溶液を攪拌しながら、これに DIPEA (240 μl, 0.70 mmol) と *tert*-Butyl  
12-amino-4,7,10-trioxadodecanoate (110 mg, 0.35 mmol) を室温で添加した。反応  
混合物を、アルゴン雰囲気下、40°C で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で留去し、  
残渣を脱イオン水とアセトニトリル中に再溶解し、逆相カラムを用いた HPLC  
で精製し、化合物 **6** を黒紫色の固体として 37 mg (70%) 得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  
CD<sub>3</sub>OD) : δ 8.15 (m, 2H), 7.70 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 6.93 (m, 2H), 6.69 (m, 2H), 3.81  
(m, 2H), 3.69-3.50 (m, 20H), 2.62 (m, 8H), 2.44 (m, 2H), 2.35 (m, 6H), 1.45 (s, 9H).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>43</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> についての計算値 [M]<sup>+</sup> = 756.4336; 測定値 756.4311.

1-(9-(4-((2-(2-(2-(3-((2,5-DioxopyrrolidineDioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-3-oxo

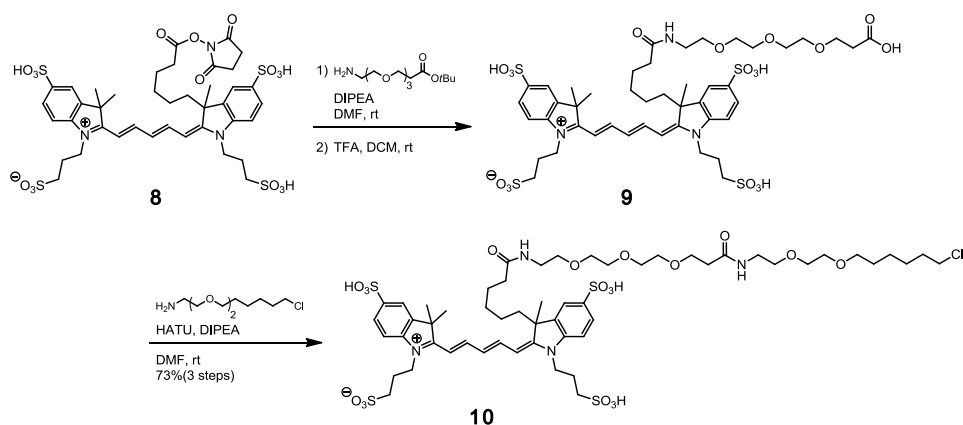
propoxy)etoxy)etoxy)ethyl)carbamoylethyl)phenyl)-6-(4-methylpiperazine-1-yl)-3H-

xanten-3-ylidene)-4-methylpiperazine-1-ium trifluoroacetate (化合物 7) の合成

化合物 6 (37 mg, 49 μmol) を溶解した DCM (3 ml) 溶液を攪拌しながら、それに TFA (3 ml) を室温で添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をトルエン (3 ml) で懸濁し、溶媒を蒸発させて減圧下で乾燥し、暗紫色のオイル (40 mg) を得た。このオイルを溶解した無水 DMF 溶液 (5 ml) を攪拌しながら、water-soluble carbodiimide (WSC; 94 mg, 0.49 mmol)、N-Hydroxysuccinimide (49 mg, 0.49 mmol) 及び DIPEA (340 μl, 0.98 mmol) を室温で添加した。アルゴン雰囲気下、反応混合物を室温で 5 時間攪拌した。溶媒を減圧下で留去して、残渣を脱イオン水とアセトニトリルに再溶解し、逆相カラムを用いた HPLC で精製して、化合物 7 を暗紫色の固体として 25 mg (64%) 得た。<sup>1</sup>HNMR (300 MHz, アセトン-d<sub>6</sub>): δ 8.23 (m, 2H), 7.65 (m, 2H), 7.57-7.44 (m, 4H), 7.27 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 3.69-3.56 (m, 20H), 3.34 (m, 8H), 2.97 (m, 2H), 2.59 (s, 6H), 2.07 (s, 4H). HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> について計算値 [M]<sup>+</sup> = 797.3874; 測定値 797.3865.

1-(9-(4-((25-Chloro-12-oxo-3, 6, 9, 16, 19-pentaoxa-13-azapentacosyl)carbamoyl)phenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-3H-xantene-3-ylidene)-4-methylpiperazin-1-ium acetate (化合物 1) の合成

化合物 7 (25 mg, 31  $\mu$ mol) の無水 DMF 溶液 (2 ml) 溶液を攪拌しながら、それに DIPEA (54  $\mu$ l, 0.31 mmol) 及び 2-(2-(6-Chlorohexyl)oxy)ethaneamine trifluoroacetate<sup>S3</sup> (105 mg, 0.31 mmol) を室温で添加した。反応混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で 10 時間攪拌した。溶媒を減圧下で留去し、残渣を脱イオン水とアセトニトリル中に再溶解し、逆相カラムを用いた HPLC で精製して化合物 1 を黒紫色の固体として 15 mg (54%) 得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.15 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.55 (m, 2H), 7.41 (m, 4H), 3.72-3.44 (m, 34H), 3.34 (m, 8H), 2.99 (s, 6H), 2.41 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.38 (m, 4H), 1.23 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  174.0, 154.4, 154.1, 153.3, 135.5, 133.0, 131.0, 127.9, 127.8, 114.8, 113.3, 102.7, 72.2, 71.6, 71.5, 71.4, 71.3, 71.2, 71.1, 70.5, 68.3, 68.2, 55.9, 52.3, 46.2, 46.1, 45.7, 40.9, 40.4, 37.6, 33.8, 30.8, 27.7, 26.5. HRMS (ESI<sup>+</sup>) : C<sub>49</sub>H<sub>70</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Cl について計算値 [M]<sup>+</sup> = 905.4944 ; 測定値 905.4962.



Scheme S3 Alexa647 Halo リガンドの合成

3-(2-((1*E*,3*E*,5*E*)-5-(3-(32-Chloro-6,19-dioxo-10,13,16,23,26-pentaoxa-7,20-diazadotriacontyl)-3-methyl-5-sulfo-1-(3-sulfopropyl)indolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-5-sulfo-3*H*-indol-1-ium-1-yl)propane-1-sulfonate (化合物 10) の合成

Alexa647 Halo リガンド (化合物 10) の合成法は Scheme S3 に示した。具体的には Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Carboxylic Acid, Succinimidyl Ester (1 mg, 0.78  $\mu\text{mol}$ ) (**8**) の無水 DMF 溶液 (0.5 mL) を攪拌しながら、そこに DIPEA (1.4  $\mu\text{l}$ ) および *tert*-Butyl 12-amino-4,7,10-trioxadodecanoate (2.8 mg, 7.8  $\mu\text{mol}$ ) を室温で添加し、反応混合物を遮光下室温で 11 時間攪拌した。そして、濾過した後、逆相カラムを用いた HPLC で精製して、暗青色の固体を得た。LRMS ( $\text{ESI}^+$ ) :  $\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{S}_4$  について計算値 $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 1118; 測定値 1118。このように取得した固体を DCM (3 mL) に溶解させ、攪拌下で TFA (1 mL) を加えた後、遮光下室温で 6 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を逆相カラムを用いた HPLC で精製して、化合物 **9** を暗青色の固体として 0.9 mg 得た。LRMS ( $\text{ESI}^+$ ):  $\text{C}_{45}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{S}_4$  について計算値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1062; 測定値, 1062。続いて、化合物 **9** (0.84  $\mu\text{mol}$ ) の無水 DMF 溶液 (0.5 mL)



を攪拌しながら、そこに DIPEA (1.5  $\mu$ l, 8.6  $\mu$ mol)、2-(2-((6-Chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethaneamine<sup>S3</sup> (4.2  $\mu$ mol) および 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate methanaminium (HATU; 1.6 mg, 4.2  $\mu$ mol) を室温で添加し、反応混合物を遮光下室温で 4 時間攪拌した。そして、濾過した後、逆相カラムを用いた HPLC で精製して、化合物 **10** を暗青色の固体を 0.57  $\mu$ mol (水溶液の吸光度より算出) (73%) 得た。HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>55</sub>H<sub>83</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>19</sub>S<sub>4</sub> について計算値 [M+H]<sup>+</sup> = 1267.42956 ; 測定値 1267.42732.

- S1. Mineno, T., Ueno, T., Urano, Y., Kojima, H. & Nagano, T. Creation of superior carboxyfluorescein dyes by blocking donor-excited photoinduced electron transfer. *Org. Lett.* **8**, 5963–5966 (2006).
- S2. Wu, L. & Burgess, K. Synthesis and spectroscopic properties of rosamines with cyclic amine substituents. *J. Org. Chem.* **73**, 8711–8718 (2008).
- S3. So, M., Yao, H. & Rao, J. HaloTag protein-mediated specific labeling of living cells with quantum dots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 419–423 (2008).