

Title	免疫疾患のモニタリングを指向した新規蛍光プローブの開発
Sub Title	Development of a novel fluorescent probe for monitoring immune diseases
Author	花岡, 健二郎(Hanaoka, Kenjiro)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究において、慶應義塾大学・医学部・病院リウマチ・膠原病内科に所属する研究分担者のこれまでの研究により得られた肉芽腫性炎症部位に高発現するmatrix metalloproteinase-12 (MMP-12)を標的として、このMMP-12の発現を検出可能な新たな蛍光プローブの開発に取り組んだ。MMP-12は蛋白質の切断活性を有する酵素であることから、まずはMMP-12により選択的に切断される基質認識部位のアミノ酸配列を調べた。研究分担者らとのディスカッションを通して、in vitroの酵素アッセイにおいてMMP-12以外での切断報告が無いCXCL(C-X-C motif chemokine ligand)やCXCR(C-X-C motif chemokine receptor)、MMP-12ノックアウト動物を用いてin vivoでMMP-12の関与が示されたIFN (interferon)-α/γに着目して、14～16残基の候補配列を23個選定した。さらにペプチド合成機によって、これらの候補アミノ酸配列をFmoc固相合成法により合成し、ペプチドのN末端に5-carboxyfluoresceinを標識した。この蛍光標識ペプチドに対してMMP-12を反応させ、切断効率をHPLCによって評価した。候補ペプチド23個のうち、MALDI-MSによって合成を確認できた21個について酵素アッセイを行った。その結果、酵素反応2時間後において、8種類のペプチドの切断率は85%を超えた。同じ条件において市販の非選択的なMMP-12の基質の切断率が80%だったことから、この8種類は高い効率で切断されたと考えた。また、MMP-2, 7, 9の3つのアイソザイムを用いてアイソザイム選択性を評価したところ、8個の候補ペプチドのうち1個の切断率は16時間後においても10%以下と非常に小さかった。このことから、MMP-12によって高効率かつ高選択的に切断される基質ペプチドの同定に成功した。これまでに、MMP-12の選択的な切断配列の報告はなく、今後は、見出した基質ペプチドを介して蛍光団と消光団とを結合させたFRET型蛍光プローブを開発していく。 The co-investigators, who belong to division of rheumatology department of internal medicine Keio university school of medicine, have found MMP-12 highly expressing in the granulomatous inflammatory site for its diagnosis so far. In this study, we try to develop a novel fluorescent probe for detecting the expression of MMP-12. MMP-12 is an enzyme which cleavages the specific amino acid sequences, so we firstly searched the amino acid sequences which are selectively cleaved by MMP-12. Through the discussion with the co-investigators, we selected 23 candidate amino acid sequences consisting of 14-16 amino acid residues as MMP-12's selective substrate sequences including CXCL (C-X-C motif chemokine ligand) and CXCR (C-X-C motif chemokine receptor), which are not reported to be cleaved by enzymes except MMP-12, and IFN (interferon)-α/γ, which was reported to be related with MMP-12 by the in vivo experiment with MMP-12-knockout animals. Further, we synthesized these candidate peptides conjugated with 5-carboxyfluorescein at the N-terminal of each peptide with the peptide synthesizer by using Fmoc solid-phase peptide synthesis. We reacted these fluorescent dye-labelled peptides with MMP-12, and evaluated the cleavage efficiency of these peptides by HPLC. Among 23 candidate peptides, 21 peptides were synthesized confirming by the MALDI-MS analysis, and we performed the enzymatic assay of the synthesized peptides. As a result, the cleavage efficiencies of 8 peptides were more than 85% after 2 hour-incubation with the enzyme. Since the cleavage efficiency of the commercially available non-selective substrate for MMP-12 was 80% in the same condition, we thought that these 8 peptides were cleaved by MMP-12 high-efficiently. We evaluated the isozyme selectivity of these candidate peptides against 3 isozymes, MMP-2, 7, 9, and the cleavage efficiency of one of 8 peptides was less than 10%, i.e., very low, after 16-hour incubation with the enzymes. From these results, we successfully identified the highly selective and efficient substrate peptide for MMP-12. So far, there is no report of the selectively cleavable amino acid sequence for MMP-12, and we will develop a FRET-based fluorescent probe for the MMP-12 activity by linking the fluorophore and the dark quencher via the identified substrate peptide.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000014-20230005

2023年度 学事振興資金（部門横断型共同研究） 研究成果実
績報告書

研究代表者	所属	薬学部	職名	教授	補助額	1,800千円
	氏名	花岡 健二郎	氏名（英語）	Kenjiro Hanaoka		

研究課題（日本語）

免疫疾患のモニタリングを指向した新規蛍光プローブの開発

研究課題（英訳）

Development of a novel fluorescent probe for monitoring immune diseases

研究組織

氏 名 Name	所属・学科・職名 Affiliation, department, and position
花岡 健二郎（Kenjiro Hanaoka）	薬学部・大学院薬学研究科・教授
佐々木 栄太（Eita Sasaki）	薬学部・大学院薬学研究科・専任講師
山田 創太（Sota Yamada）	薬学部・大学院薬学研究科・特任助教
金子 祐子（Yuko Kaneko）	医学部・大学院医学研究科・教授
松本 紘太郎（Kotaro Matsumoto）	医学部・大学院医学研究科・助教

1. 研究成果実績の概要

本研究において、慶應義塾大学・医学部・病院リウマチ・膠原病内科に所属する研究分担者のこれまでの研究により得られた肉芽腫性炎症部位に高発現するmatrix metalloproteinase-12 (MMP-12)を標的として、このMMP-12の発現を検出可能な新たな蛍光プローブの開発に取り組んだ。MMP-12は蛋白質の切断活性を有する酵素であることから、まずはMMP-12により選択的に切断される基質認識部位のアミノ酸配列を調べた。研究分担者らとのディスカッションを通して、in vitroの酵素アッセイにおいてMMP-12以外での切断報告が無いCXCL(C-X-C motif chemokine ligand)やCXCR(C-X-C motif chemokine receptor)、MMP-12ノックアウト動物を用いてin vivoでMMP-12の関与が示されたIFN(interferon)- α/γ に着目して、14～16残基の候補配列を23個選定した。さらにペプチド合成機によって、これらの候補アミノ酸配列をFmoc固相合成法により合成し、ペプチドのN末端に5-carboxyfluoresceinを標識した。この蛍光標識ペプチドに対してMMP-12を反応させ、切断効率をHPLCによって評価した。候補ペプチド23個のうち、MALDI-MSによって合成を確認できた21個について酵素アッセイを行った。その結果、酵素反応2時間後において、8種類のペプチドの切断率は85%を超えた。同じ条件において市販の非選択的なMMP-12の基質の切断率が80%だったことから、この8種類は高い効率で切断されたと考えた。また、MMP-2, 7, 9の3つのアイソザイムを用いてアイソザイム選択性を評価したところ、8個の候補ペプチドのうち1個の切断率は16時間後においても10%以下と非常に小さかった。このことから、MMP-12によって高効率かつ高選択的に切断される基質ペプチドの同定に成功した。これまでに、MMP-12の選択的な切断配列の報告はなく、今後は、見出した基質ペプチドを介して蛍光団と消光団とを結合させたFRET型蛍光プローブを開発していく。

2. 研究成果実績の概要（英訳）

The co-investigators, who belong to division of rheumatology department of internal medicine Keio university school of medicine, have found MMP-12 highly expressing in the granulomatous inflammatory site for its diagnosis so far. In this study, we try to develop a novel fluorescent probe for detecting the expression of MMP-12. MMP-12 is an enzyme which cleavages the specific amino acid sequences, so we firstly searched the amino acid sequences which are selectively cleaved by MMP-12. Through the discussion with the co-investigators, we selected 23 candidate amino acid sequences consisting of 14-16 amino acid residues as MMP-12's selective substrate sequences including CXCL (C-X-C motif chemokine ligand) and CXCR (C-X-C motif chemokine receptor), which are not reported to be cleaved by enzymes except MMP-12, and IFN (interferon)- α/γ , which was reported to be related with MMP-12 by the in vivo experiment with MMP-12-knockout animals. Further, we synthesized these candidate peptides conjugated with 5-carboxyfluorescein at the N-terminal of each peptide with the peptide synthesizer by using Fmoc solid-phase peptide synthesis. We reacted these fluorescent dye-labelled peptides with MMP-12, and evaluated the cleavage efficiency of these peptides by HPLC. Among 23 candidate peptides, 21 peptides were synthesized confirming by the MALDI-MS analysis, and we performed the enzymatic assay of the synthesized peptides. As a result, the cleavage efficiencies of 8 peptides were more than 85% after 2 hour-incubation with the enzyme. Since the cleavage efficiency of the commercially available non-selective substrate for MMP-12 was 80% in the same condition, we thought that these 8 peptides were cleaved by MMP-12 high-efficiently. We evaluated the isozyme selectivity of these candidate peptides against 3 isozymes, MMP-2, 7, 9, and the cleavage efficiency of one of 8 peptides was less than 10%, i.e., very low, after 16-hour incubation with the enzymes. From these results, we successfully identified the highly selective and efficient substrate peptide for MMP-12. So far, there is no report of the selectively cleavable amino acid sequence for MMP-12, and we will develop a FRET-based fluorescent probe for the MMP-12 activity by linking the fluorophore and the dark quencher via the identified substrate peptide.

3. 本研究課題に関する発表			
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)
○丸岡 龍太、山田 創太、佐々木 栄太、松本 紘太郎、竹下 勝、花岡 健二郎（一般ポスター発表）	MMP-12活性検出を目指した特異的基質ペプチド配列の探索	日本薬学会第144年会	2024年3月29日
Kenjiro Hanaoka（招待講演）	Development of far-red to near-infrared xanthene dyes and their application to fluorescent probes	FASEB Science Research Conferences - The Optical Probes Conference: Discovery to Application-	2023年6月7日
花岡 健二郎（招待講演）	活性硫黄種を検出する蛍光プローブの開発とその応用	第17回メタボロームシンポジウム セッション：代謝イメージング	2023年10月19日
○松本 紘太郎、鈴木 勝也、間木 麻友、大西 慎一、吉田 広人、竹下 勝1、藏本 純子、矢澤 真樹、加藤 達也、志水 秀行、伊藤 努、山田 創太、佐々木 栄太、花岡 健二郎、野口 真理子、松本 義弘、竹内 勤、金子 祐子（口頭発表）	トランスオミックス解析による血管炎組織特異的分子の同定と臨床的有用性評価	第10回JCRベーシックリサーチカンファレンス	2023年11月24日
花岡 健二郎（招待講演）	細胞内局所pHを測定するレシオ型蛍光プローブの開発	第96回日本生化学会大会	2023年11月2日