PRESS RELEASE

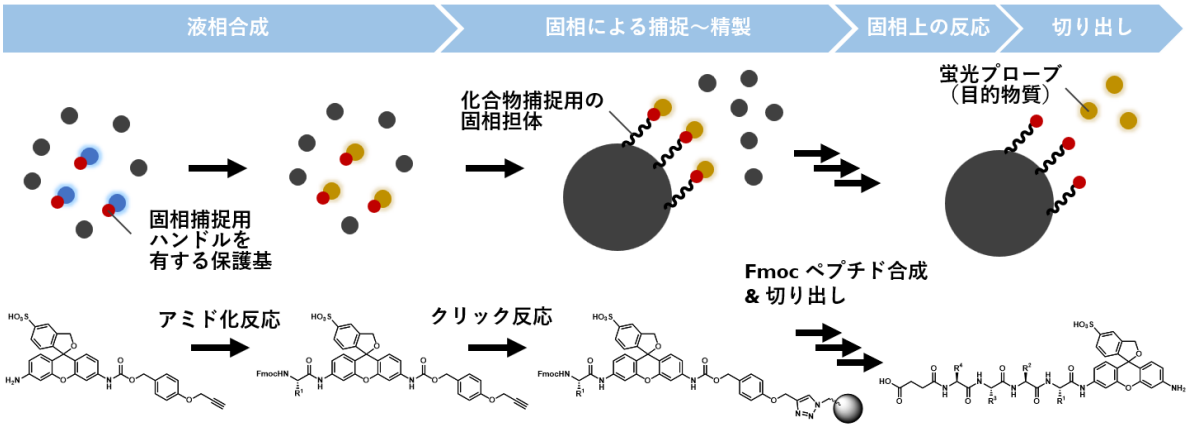
2026 年 7 月 2 日
東京大学
科学技術振興機構（JST）

ケミカルプローブの全自動合成を基盤とする酵素の機能解析の新手法

――疾患と関わるタンパク質機能異常の網羅的な探索を実現――

発表のポイント

◆ 酵素の活性を可視化する「蛍光プローブ」を、カラムクロマトグラフィーなどの精製過程を経ずに自動合成できる仕組みを構築した。
◆ 100 種類以上の 1 分子酵素活性計測用蛍光プローブを合成し、これまで高感度な活性計測が困難であった酵素の活性計測系の開発を可能とした。
◆ 酵素活性を網羅的に解析する enzymomics（酵素機能のオミクス解析）法により、肝障害に関わる血液中の酵素活性異常の様子を明らかにした。



今回開発した SCCR 法による蛍光プローブの合成例。上：SCCR 法における合成の流れ、下：SCCR 法を用いた蛍光プローブ合成スキームの例。

概要

東京大学大学院薬学系研究科の箕田麻弥乃学術専門職員（研究当時）、小松徹准教授、浦野泰照教授らの研究グループは、酵素の活性を可視化するケミカルプローブの一種である「蛍光プローブ」を、カラムクロマトグラフィー（注 1）などの精製過程を経ずに自動合成できる仕組みを構築し、これを用いた新たな酵素活性解析の方法論を提案しました。

特定の酵素によって代謝され、蛍光シグナルの増大によって活性を検出する「蛍光プローブ」は、酵素の生きた機能を直接的に「見る」ことを可能とする有用な研究ツールですが、生体内に存在する多様な酵素を網羅的に解析するためには高い機能性を有する多様な蛍光プローブを効率的に合成することが必要とされています。特に、1 分子酵素活性計測などの高精度な活性計測系にこれを用いるためには、極めて高い化学純度を有するプローブを合成することが求め

られ、通常は１つずつのプローブに対してカラムクロマトグラフィーなどの方法論を用いた精製をおこなうことが必要となるため、合成の効率化は困難と考えられてきました。

これに対し本研究では、多彩な化学反応を使用可能な「液相合成（注 2)」と、精製を簡便化できる「固相合成（注 3)」の利点を融合した Synthesis based on Covalent Capture and Release（SCCR：共有結合性の捕捉・切り出しに基づく合成）戦略を開発しました。本手法では、独自に開発した固相捕捉ハンドル付きの保護基（注 4）を用いることで、液相合成の任意のステップで目的物のみを選択的に固相上に捕捉して固相合成へと移行する合成スキームの構築を可能とし、ペプチド全自動合成機を用いて、高純度のプローブをカラムクロマトグラフィーによる精製を経ずに合成することを実現しました。これにより、100 種類以上のプローブからなる１分子酵素活性計測系ライブラリを短期間で構築することが可能となり、酵素の機能解析用の新規蛍光プローブの創出や新たな血液バイオマーカー（注 5）候補の発見へと繋がる成果が得られました。本手法は、遺伝子やタンパク質量だけでは捉えきれない、疾患に伴う微細なタンパク質機能（proteoform）の変化を包括的に描き出す新たなオミクス階層（enzymomics；酵素機能のオミクス解析、注 6）の樹立に大きく貢献することが期待されるものです。

本成果は、6 月 29 日付で *ACS Central Science* 誌に掲載されました。

発表内容

生体内には数千種類の酵素が存在し、その機能はタンパク質間相互作用、翻訳後修飾などの様々な因子によって制御されています。このため、酵素の機能レベルの変化は遺伝子レベル、mRNA レベルの変化を必ずしも反映しない独自の機能階層を形成しています。一方で、酵素の機能変化は表現型の変化や疾患の成り立ちに密接に関わり、疾患と関わる酵素の機能レベルの変化を正確に理解するために、その「機能」を直接解析することが重要であると考えられてきました。酵素の機能を評価する最も直接的な手法は、酵素の活性によって代謝され蛍光／吸光シグナルの変化によってこれを検出・定量する呈色試薬を用いるもので、このようなケミカルプローブを用いたタンパク質の機能解析は 1930 年代からおこなわれており、これによって見出された機能変化の一部は、健康診断で実施される ALP 検査（注 7）のように、現在でも疾患の診断に有用な情報を与える検査として広く利用されています。

近年、従来の呈色試薬よりも高感度に酵素活性を検出することを可能とするケミカルプローブの一種である蛍光プローブを用いた酵素活性計測法が開発され、タンパク質の機能解析は、生化学、生物学研究、医療分野などへの応用の幅を更に広げてきました。個々の酵素の活性を計測するためには、目的の活性に選択的に応答する蛍光プローブを１つずつ有機合成することが求められますが、生体内に存在する膨大な酵素の種類を考えると、その開発速度自体を大きく向上させる方法論の開発が強く求められていました。一方で、１分子酵素活性計測などの高感度・高精度の酵素活性計測に用いられる蛍光プローブは、1%未満の蛍光性不純物が含まれるだけでも正確なシグナル検出が困難となることから、極めて高い純度を有するプローブを調整することが求められます（**図１**）。これまでの蛍光プローブ合成法では、合成したプローブをカラムクロマトグラフィー法などの精製法を用いて精製することが必要となるため、多様な酵素反応を網羅的に検出する蛍光プローブを効率的に合成することは容易ではありませんでした。

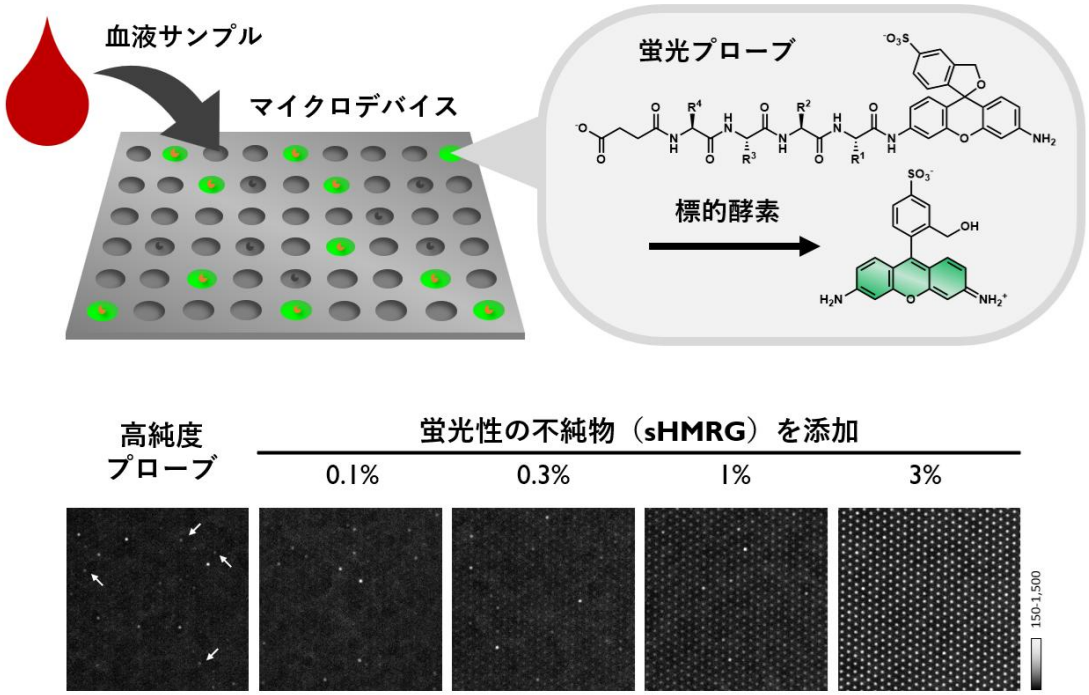


図１：　１分子酵素活性計測系に用いる蛍光プローブへの蛍光性不純物の混入に伴う血液中の酵素活性計測におけるシグナル変化。高純度プローブを用いた際には検出できていた弱い活性を有する酵素（白矢印）の検出が 1%の蛍光性不純物を含む条件では困難になっている。

本研究では、この課題を解決するために Synthesis based on Covalent Capture and Release（SCCR：共有結合性の捕捉・切り出しに基づく合成）という新たな合成戦略を提唱しました。精製を簡便にする合成手法として、濾過によって容易に回収できる固相に化合物を結合させて合成をおこなう固相合成が汎用されますが、適用できる化学反応や反応条件が通常用いられる液相反応と比較して限られるという制約がありました。これに対し、SCCR 法では液相反応をおこなった後、固相への共有結合によって選択的に捕捉できる保護基を結合させた化合物を使って合成をおこなうことで、厳しい条件を用いる必要のある化学反応を液相反応でおこなった後、反応液中から選択的に化合物を固相に捕捉し、その後の修飾反応を固相反応でおこなうという合成スキームの構築が可能となります。これにより、従来は固相合成で合成を完遂させることが困難であった１分子酵素活性計測用の蛍光プローブの合成を、各反応ステップをほぼ量論的に進行させ、クロマトグラフィーによる精製を経ずに高純度の蛍光プローブを得ることができることが確かめられました（**図２**）。

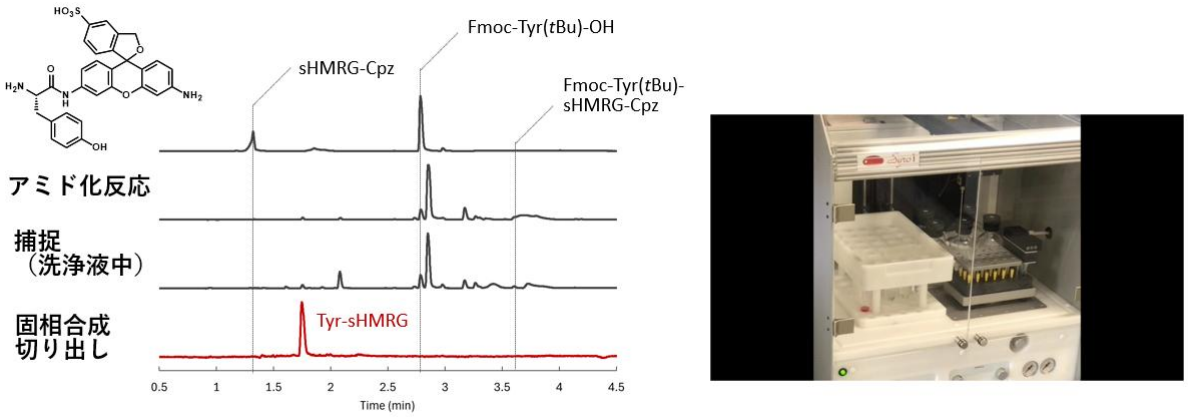


図２： SCCR 法における反応と精製の過程。左：化学反応～精製までの過程のクロマトグラム追跡の結果。目的の蛍光プローブ（Tyr-sHMRG）が高純度に得られることを確認した。右：ペプチド合成機を用いた蛍光プローブの自動合成の様子。

更に、ペプチド合成機を用いたペプチド自動合成法に本系を組み合わせることにより、100 種類以上の多様なペプチド配列を有する１分子酵素活性計測用プローブを自動合成によって合成することに成功しました。

そして、このプラットフォームを活用することにより、これまで１分子酵素活性計測に最適な蛍光プローブが存在しなかった複雑な酵素複合体「プロテアソーム（注 8）」を対象に基質探索をおこない、その機能を１分子レベルで詳細に解析する目的に有用な蛍光プローブを新たに見出しました（**図３**）。

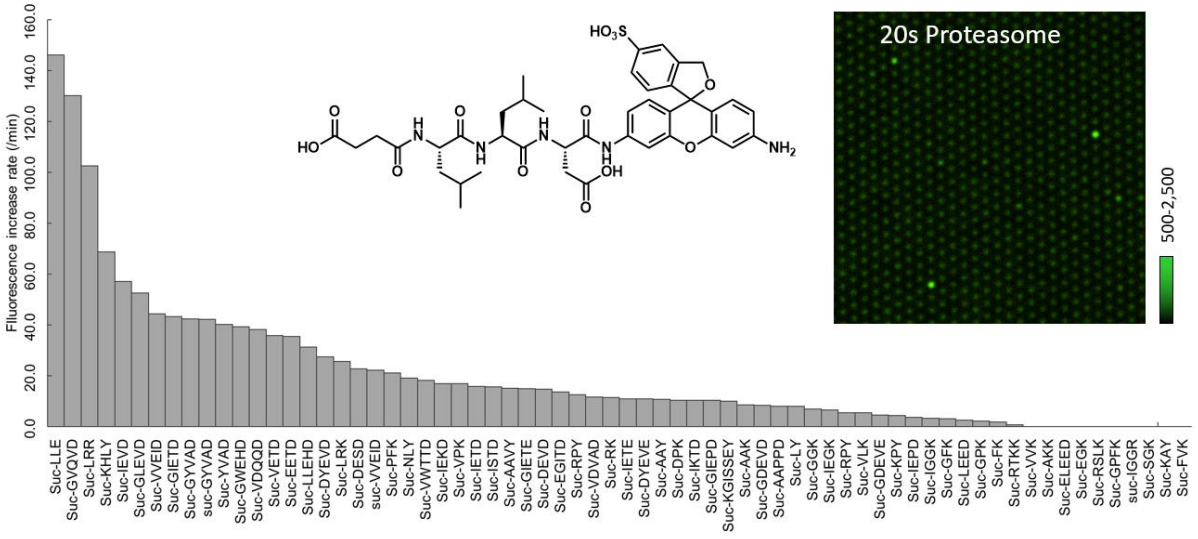


図３： 20S プロテアソームの１分子酵素活性を検出できる蛍光プローブの探索。

また、本系を、生体サンプル中で酵素活性を網羅的に解析し、特定の表現型の変化と関わる酵素活性異常を探索する enzymomics（酵素機能のオミクス解析）研究へと応用し、肝障害における血液中の酵素活性変動を網羅的に解析し、肝障害に関わる活性異常を複数見出すことに成功しました（**図４**）。これは、本手法を用いて調整される１分子酵素活性計測系のライブラリを活用することで、複雑な生体サンプルに含まれる疾患を反映する機能的なサインを抽出することが可能になることを示す結果と言えます。

図４： １分子酵素活性計測を用いた血液中の酵素活性の網羅的解析の結果。Suc-GLEVD などの配列を有する蛍光プローブが肝障害による酵素活性変化を検出できる可能性が示された。

化学の力を使って生命の成り立ちを明らかにするケミカルバイオロジー研究において、高い専門性と多大な時間を有するケミカルプローブの開発過程が研究の律速となる例は少なくありません。本研究が確立した全自動合成プラットフォームが発展することにより、個々の生命科学研究者が自身の目的に応じて独自のケミカルプローブをオンデマンドで開発することが可能となり、ケミカルバイオロジーに基づく新たな診断・治療技術の開発の大幅な加速に貢献することが期待されます。

○関連情報：

「疾患と関わる血液中の酵素活性異常を「1 分子」レベルで見分ける技術の開発」(2020/3/12)
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0111_00017.html
「膵臓がんにおける血液中の酵素活性異常の発見」(2024/1/12)
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0111_90047.html
「1 分子計測リキッドバイオプシー」による膵臓がんの早期発見の実現に向けて」(2026/5/22)
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0111_00067.html

発表者・研究者等情報

東京大学
大学院薬学系研究科
箕田　麻弥乃　学術専門職員（研究当時）
小松　徹　准教授
浦野　泰照　教授（兼：大学院医学系研究科　教授）

論文情報

雑誌名：*ACS Central Science*（June 29, 2026）
題　名：Synthesis based on covalent capture and release enables purification-free fluorogenic probe libraries for single-molecule protease activity profiling
著者名：Mayano Minoda, Tadahaya Mizuno, Takumi Iwasaka, Hiroyuki Kusuhara, Yu Kagami, Shingo Sakamoto, Norimichi Nagano, Chiaki Hori, Kazufumi Honda, Yasuteru Urano, and Toru Komatsu
DOI：10.1021/acscentsci.6c00783
URL：https://doi.org/10.1021/acscentsci.6c00783

研究助成

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST） 創発的研究支援事業「Proteoform レベルのタンパク質機能解析に基づく疾患の理解の深化（課題番号：JPMJFR230B)」、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED） 革新的先端研究開発支援事業ステップタイプ（FORCE）「Proteoform レベルの酵素機能網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発」、次世代がん医療加速化研究事業「プロテアーゼ群を包括する１分子酵素活性バイオマーカーを利用した膵臓がん早期診断技術の開発」、独立行政法人 日本学術振興会（JSPS） 科研費「基盤研究（B)（課題番号：JP19H02846, JP22H02217、JP25K01911)」、科研費「学術変革領域研究（A)（課題番号：JP21A303)」、公益財団法人 内藤記念科学振興財団、公益財団法人 持田記念医学薬学振興財団、公益財団法人 中外創薬科学財団、公益財団法人 MSD 生命科学財団、公益財団法人 篷庵社等の支援を受けておこなわれました。

用語解説

（注1）　**カラムクロマトグラフィー：** 有機合成において化合物の精製に用いられる分離手法の１つ。カラム（筒状の容器）に担体を詰めたものに溶液を流し、脂溶性／水溶性、分子量の違いなどに応じて異なる溶出時間で溶出する化合物を回収することで化合物を精製する。

（注2）　**液相合成：** 化合物を溶液に溶かして化学反応をおこなう合成法。現在おこなわれているほとんどの合成が液相合成を用いられている。

（注3）　**固相合成：** 化合物を溶液に溶解しない固相上に担持して合成をおこなう合成法。固相に結合した化合物以外の夾雑物（きょうざつぶつ）を簡単な洗浄操作で取り除くことが可能であることから、様々なアミノ酸が連なったペプチドなど、繰り返し操作によって多様な誘導体を合成する合成法に用いられる。

（注4）　**保護基：** 化合物の合成の過程で、特定の官能基（化合物の一部分）を選択的に反応させたい場合に、反応して欲しくない官能基に保護基を修飾することで、反応性を

防ぐことがおこなわれる。合成の適切な過程で、特定の条件によって脱保護（保護基を外す反応）をおこなうことで、もとの官能基を回復できる。

（注5） **バイオマーカー：** 特定の疾患や身体の状態に応じて変化する指標となる生体分子。疾患特異的なバイオマーカーを計測することで、疾患の有無や状態を見積もることができる。

（注6） **enzymomics：** タンパク質の中でも主要な機能分子を占める酵素について、その機能を網羅的に解析することで、疾患の成り立ちや表現型の変化に関わるタンパク質機能異常を探索する方法論。

（注7） **ALP 検査：** 血液中の alkaline phosphatase（ALP）と呼ばれる酵素の活性を計測することで、肝疾患、骨代謝異常などの発見に資する血液検査の 1 項目。1937 年に開発された *p*-nitrophenyl phosphate（pNPP）と呼ばれる呈色試薬（ALP 活性によって黄色の色を示す *p*-nitrophenol を生成する）による活性計測法が現在でも広く用いられている。

（注8） **プロテアソーム：** 細胞内の不要なタンパク質を分解するタンパク質加水分解酵素。巨大な分子量を有する複雑なタンパク質複合体として存在し、がんや免疫疾患などの疾患の成り立ちとも深く関わることが近年の研究から明らかになっており、その機能解明のための研究が精力的に進められている。

問合せ先

〈報道に関する問合せ〉
東京大学　大学院薬学系研究科　庶務チーム
Tel：03-5841-4702　E-mail：shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構　広報課
Tel：03-5214-8404　E-mail：jstkoho@jst.go.jp

〈JST 事業に関する問合せ〉
科学技術振興機構　創発的研究推進部
永井　諭子（ながい　さとこ）
Tel：03-5214-7276　E-mail：souhatsu-inquiry@jst.go.jp