

平成 21 年 月 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790010
 研究課題名（和文） 蛍光性バイオプローブを用いたアンタゴニストの新規スクリーニング法の開発
 研究課題名（英文） Development of the fluorescent bio-probes for the screening of antagonists.
 研究代表者
 堤 浩（TSUTSUMI HIROSHI）
 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
 研究者番号：70398105

研究成果の概要：HIV 感染、種々の固形癌の転移や血液癌の進行、慢性関節リウマチの炎症等に関与しているケモカイン受容体 CXCR4 に対して特異的に結合する蛍光性アンタゴニストの開発に成功した。この蛍光性アンタゴニストは、CXCR4 リガンド候補化合物のスクリーニングプローブ、および細胞表面に存在する CXCR4 の蛍光イメージングプローブとして有用であることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

(1)ケモカイン受容体 CXCR4 は、HIV 感染、種々の固形癌の転移や血液癌の進行、慢性関節リウマチの炎症等に大きく関わっていることが明らかにされつつあり、重要な創薬ターゲットの一つとして注目されている。CXCR4 に対するアンタゴニストのスクリーニングはラジオアイソトープ（RI）ラベルしたリガンドを競合プローブとしたアッセイにより行われているが、RI ラベル化プローブは大規模スクリーニングに向かないなどの問題点があった。そのため、RI ラベル化プローブに代わるプローブの開発が望まれている。

(2) CXCR4 の細胞における動態を観測する手法として、CXCR4 に蛍光タンパク質を融合して蛍光イメージングする方法が用いられているが、CXCR4 は膜タンパク質であるため、融合した蛍光タンパク質が CXCR4 の機能を阻害することが懸念されている。そのため、より低分子の CXCR4 イメージングプローブの開発が求められている。

2. 研究の目的

背景で述べたように、CXCR4 を標的とした創薬や CXCR4 の機能解明のためには、CXCR4

に対する新たなプローブが必要である。蛍光プローブは高感度かつアッセイが容易であることから、汎用的に利用されているプローブの一つである。そこで本研究では、CXCR4 アンタゴニストのスクリーニングおよび CXCR4 の蛍光イメージングに適用可能な蛍光性 CXCR4 アンタゴニストの開発を行った。

3. 研究の方法

申請者らはこれまでに T140 誘導体をはじめとして多数の CXCR4 アンタゴニストの開発に成功している。その一つである TZ14011 は CXCR4 に特異的かつ強く結合する。また TZ14011 には修飾が可能な D-Lys8 の側鎖アミノ基が存在するため、TZ14011 を基本骨格として蛍光性アンタゴニストの創世を行った。

4. 研究成果

活性エステル法を用いて、TZ14011 の D-Lys8 の側鎖アミノ基に対して選択的にフルオレセインおよびローダミンを修飾することができた。CXCR4 のリガンドである SDF-1 との競合結合阻害実験により、得られた蛍光性 TZ14011 誘導体が CXCR4 に対する結合活性を保持していることを確認した。

(1) 蛍光性 TZ14011 誘導体をプローブとして、蛍光プレートリーダーを用いてアンタゴニスト候補化合物のスクリーニング実験を行なった結果、アンタゴニスト候補化合物の CXCR4 への結合を蛍光強度の変化により検出し、結合活性を評価することができた。蛍光性 TZ14011 誘導体をプローブとして評価した結合活性と、従来の RI 標識プローブを用いて評価した結合活性との間に良い相関関係が見られることから、蛍光性 TZ14011 誘導体が新たな CXCR4 アンタゴニストのスクリーニング用プローブとして有用であることが明らかとなった。

(2) 蛍光性 TZ14011 誘導体を用いて細胞膜表面の CXCR4 の蛍光イメージングを行った。細胞は C 末端側に Green Fluorescent protein (GFP) を融合した CXCR4 を恒常的に発現する NP2 細胞株を用い、Tetramethylrhodamine (TAMRA) を修飾した蛍光性アンタゴニスト (TAMRA-Ac-TZ14011) を用いて実験を行った結果、TAMRA-Ac-TZ14011 の赤色蛍光が細胞表面に観測され、この蛍光は GFP の緑色蛍光とよい一致を示していた。一方、CXCR4 を発現していない細胞では TAMRA-Ac-TZ14011 を作用させても細胞表面に赤色蛍光は観測されなかったことから、TAMRA-Ac-TZ14011 が細胞表面の CXCR4 に特異的に結合することにより、CXCR4 の蛍光イメージングが達成されたものと考えられる。さらに、TAMRA-Ac-TZ14011 を CXCR4-GFP 発現細胞に作用させて時間依存的に蛍光イメージング実験を行った結果、TAMRA-Ac-TZ14011 由来の赤色蛍光が細胞内

部においても観測されることが明らかとなった。この結果は、CXCR4 の細胞内への自発的なインターナリゼーションを可視化できることを示唆しており、TAMRA-Ac-TZ14011 を用いて CXCR4 の時空間的な発現動態や機能解析を行うことができると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H, Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-based Screening, 査読有、*Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1917-1920.

[学会発表](計1件)

田部 泰章・野村 渉・堤 浩・田中 智博・大庭 賢二・駒野 淳・山本 直樹・藤井 信孝・玉村 啓和、蛍光性アンタゴニストを用いた CXCR4 のイメージングと阻害剤のスクリーニング法の確立、日本化学会第 88 春季年会、H20 年 3 月 29 日、立教大学

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堤 浩 (TSUTSUMI HIROSHI)
東京医科歯科大学学生体材料工学研究所
助教
研究者番号 : 70398105

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :