

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19850011
 研究課題名(和文) 新規のオルガネラ選択性を有する蛍光色素の開発
 研究課題名(英文) Development of new fluorescent material
 研究代表者
 下川 浩輝 (SHIMOGAWA HIROKI)
 京都大学・化学研究所・助教
 研究者番号：70447928

研究成果の概要：

平成 19 年度の実験において電気泳動およびMSスペクトル解析によって9B8のターゲットタンパク質としてミトコンドリア外膜に存在するSLC25A5というタンパク質を同定した。平成20年度では9B8の各種類縁体を合成して化合物の構造活性相関を行った。これらの実験結果から、9B8がターゲットタンパク質と共有結合を介して結合するためには分子内のβ-ケトスルフィド部位が極めて重要である事がわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,350,000	405,000	1,755,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：蛍光色素、ミトコンドリア、外膜、スクリーニング、合成化合物

1. 研究開始当初の背景

蛍光色素は、細胞や組織を生きた状態で染色して観察するための道具として使われている。現在までに、ミトコンドリア、リソソーム、小胞体、ゴルジ体、核など様々なオルガネラ選択的な蛍光色素が市販されている。しかしながら、例えばペルオキシソームのように細胞を生かした状態で染色することが出来る蛍光色素が開発されていないオルガネラもいくつか存在する。

2. 研究の目的

(1) 我々がスクリーニングによって発見した9B8が特異的に結合するタンパク質を同定することによってオルガネラ選択性を明らかにする。

(2) 9B8の構造活性相関研究を行い、9B8がどのようにして標的タンパク質と相互作用しているか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 9 B 8 のターゲットタンパク質の同定

申請者は平成 19 年度の実験において 9 B 8 のターゲットタンパク質を同定するためにアフィニティーカラムを用いたターゲットタンパク質の同定やクロスリンカーを用いたターゲットタンパク質の同定法を試みた。しかしながら、いずれの方法でもターゲットタンパク質の同定はできなかった。

そこで、あらかじめ HeLa 細胞を 9 B 8 で処理して、この細胞をホモジナイズした後に、スクロース密度勾配遠心法によりオルガネラ分画し、SDS-PAGE で分離したところ、蛍光で染色されたバンドを検出することができた。このバンドを切り出して MS 分析した。(図 1)

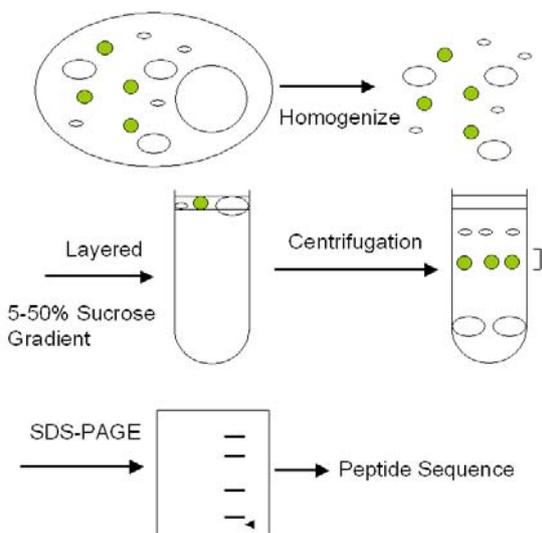


図 1 オルガネラ分画

(2) 9 B 8 の構造活性相関研究

次に、9 B 8 の構造活性相関研究を計画した。具体的には 9 B 8 のジメチルフェニル基および分子内の β -ケトスルフィド部位をさまざまな置換基に変換することにした。(図 2)

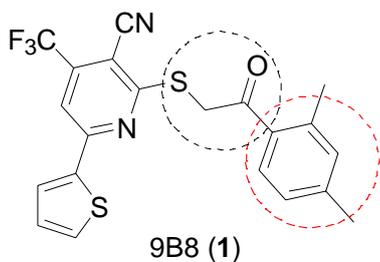


図 2 構造活性相関

合成方法は、市販の 2 と 3 a または 3 b を出発原料に用いて、トリエチルアミンとともに還流すると 4 a および 4 b が得られると考えられる。得られた 4 a-b をベンジルプロマイドおよび β -ケトハロゲンとカップリングさせることでさまざまな 9 B 8 の類縁体を合成することにした。(図 3)

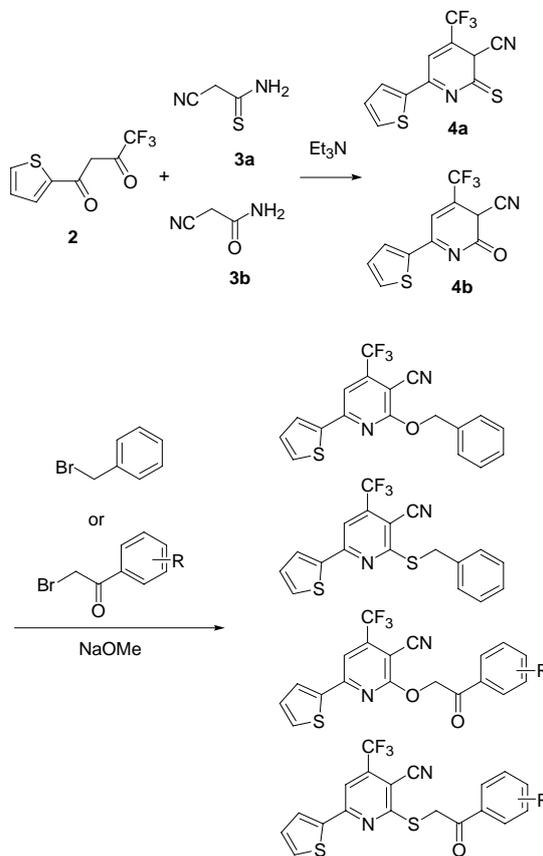


図 3 合成計画

4. 研究成果

(1) スクロース密度勾配遠心法の結果

研究方法 (1) の手順に従って、スクロース密度勾配法により SDS-PAGE を行った結果、およそ 30K のあたりに蛍光で染色されたバンドを見出すことができた。(図 4) 同様の操作を細胞の抽出液 (in vitro 系) に対しても行ったところ、同位置に同じ染色されたバンドを見ることができた。

これらの結果から、9B8 はターゲットタンパク質に対して共有結合を介して結合していることが示唆された。

そこで、このバンドを切り出して MS 分析によって化合物が結合しているタンパク質を同定することにした。

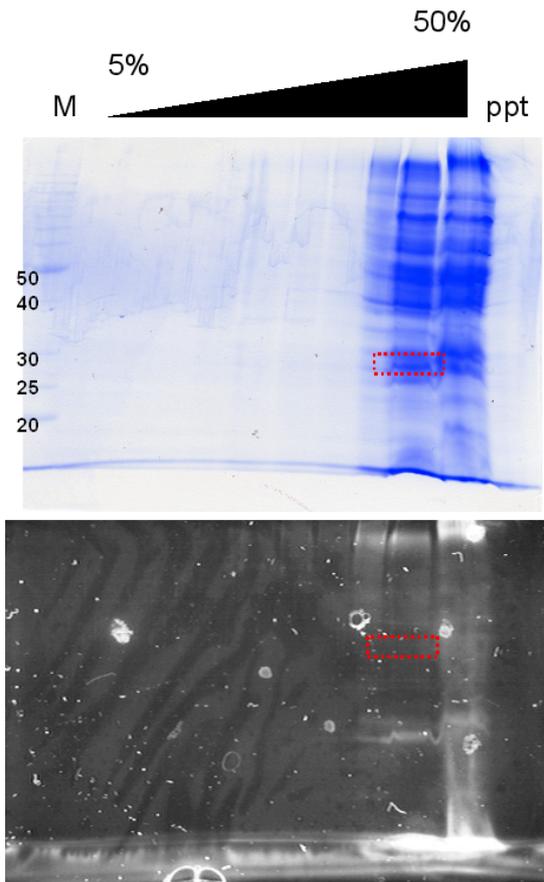


図4 スクロース密度勾配遠心法の結果

MS分析の結果、ミトコンドリア外膜に存在するSLC25A5というタンパク質を同定することができた。(図5)

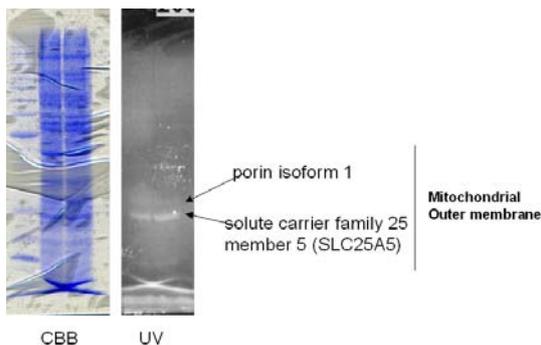


図5 MS解析の結果

(2) 9B8の構造活性相関研究の結果

(1)までの研究でターゲットタンパク質は同定できたが、“どのようにして化合物がタンパク質と共有結合をしているのか?”という疑問が残る。

研究代表者は、9B8(1)のβ-ケトスルフィド部位がミトコンドリアに存在する酵素によって、酸化あるいは還元のような代謝

を受けて反応性に富んだ反応中間体を生成してターゲットタンパク質と共有結合するのであると考えた。

そこで、研究方法(2)の合成計画に従って図6に示した7種類の9B8類縁体を合成した。

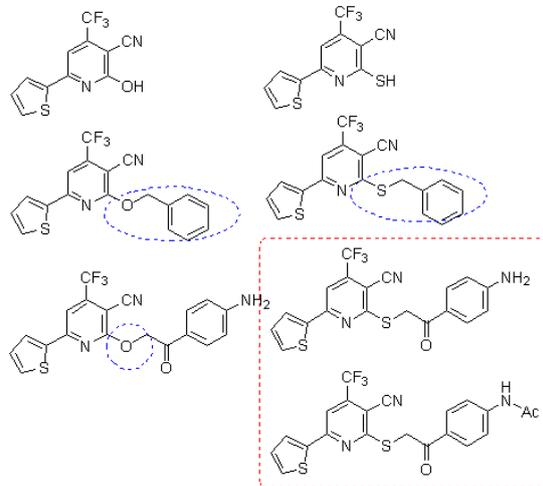


図6 9B8類縁体

これらの類縁体の細胞内の局在性を調べた。その結果、β-ケトスルフィド部位を持つ化合物以外は、すべて局在性を示さなかった。これらの実験結果から、9B8(1)がターゲットタンパク質と共有結合を介して結合するためにはβ-ケトスルフィド部位が極めて重要である事がわかった。

さらに、これらの研究の最中に、9B8それ自体では弱い蛍光しか発せず、何らかの構造変化を受けて、強い蛍光物質へと変化していることがわかった。そして、この生成物がミトコンドリア外膜を蛍光に染色する本体の化合物であることがわかってきた。そこでこの本体の構造を調べた結果、β-ケトスルフィド部位が9B8の持つシアノ基に求核攻撃して巻き込んだ化合物が染色物質の本体であることがわかった。(図7)



図7 環化化合物

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2件)

① Jung, D.; Shimogawa, H.; Kwon, Y.; Mao, Q.; Sato, S.; Kamisuki, S.; Kigoshi, H.; Uesugi, M.

Wrenchnolol Derivative Optimized for Gene Activation in Cells.

J. Am. Chem. Soc., 131, 4774-4782. 2009

査読あり

② 下川浩輝、上杉志成
化合物推理ゲーム 11月号
ファルマシア

2008年11月 1108-1111

査読なし

[学会発表] (計4件)

① 下川浩輝, Dongju Jung, Youngjoo Kwon, Qian Mao, 佐藤慎一, 紙透伸治, 木越英夫, 上杉志成

レンチノロール類縁体による細胞内転写活性化

第4回ケミカルバイオロジー学会年会

平成21年5月18~19日

神戸市産業振興センター

② 山添紗有美、下川浩輝、佐藤慎一、上杉志成

細胞接着を促進するダンベル型小分子化合物、アドヘサミンの発見と作用機序

第4回ケミカルバイオロジー学会年会

平成21年5月18~19日

神戸市産業振興センター

③ Sayumi Yamazoe, Hiroki Shimogawa, Shin-ichi Sato, and Motonari Uesugi

Discovery and Mechanism of Adhesamine, a Dumbbell-Shaped Small Molecule that Promotes Cell Adhesion

10th KAIST-KYOTO Chemical Symposium

平成20年12月

Deajeon, Korea

④ 山添紗有美、下川浩輝、佐藤慎一、上杉志成

細胞接着を促進するダンベル型小分子化合物、アドヘサミンの発見と作用機序

第27回メディシナルケミストリーシンポジウム

平成20年11月

大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 浩輝 (SHIMOGAWA HIROKI)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：70447928