

平成 21 年 6 月 15 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：19890179
 研究課題名（和文） 新規フォトリガー反応を利用した細胞内分子送達/可視化システムの創製
 研究課題名（英文） Development of intracellular delivery / bio-imaging system using photoactivatable FRET dye
 研究代表者
 上田 聡（UEDA SATOSHI）
 岐阜薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：50453056

研究成果の概要：

パルミチン酸と GPCR 細胞内ループ領域ペプチドのハイブリッド分子であるペプデュースンの膜透過機構の解明をめざした分子プローブの設計、合成および評価を行った。光切断と FRET 蛍光クエンチングシステムを組み込んだモデルペプチドは、光照射による結合切断により、任意のタイミングで蛍光を復活させることができ、ペプデュースンの膜透過機構の解明に向けた有用なツールとなることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：ペプデュースン・膜透過・ペプチド

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は、細胞の内外を隔てるのみならず、様々な輸送系や情報伝達システムを有し、外界とのインターフェースとして細胞の機能に重要な役割を果たしている。物質の細胞内送達を行うために様々なシステムが考案されているが、今回申請者は G 蛋白共役型受容体（GPCR）モジュレーターである pepducin の細胞膜透過メカニズムに着目した。Pepducin はパルミチン酸と GPCR 細胞内ル-

ープ領域ペプチドのハイブリッド分子であり、細胞に投与した際、脂質部分が細胞膜に外側からアンカリングした後に何らかの機構によりペプチド部分が細胞内側に転移するという非常に興味深い挙動を示す分子である (Covic, L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 2, 643-648)。これまでに脂質修飾による膜アンカリングを利用した DDS は多く知られているが、細胞内に転移して膜透過するシステムについては全く例を見ない。そこで pepducin の膜透過機構を解明することにより、

全く新しい細胞内動態制御システムを創製できるものと考えた。Pepducin に関する先の報告では GPCR 修飾活性による機能評価により、ペプチド部分が細胞内に配向していることを間接的に証明するにとどまっている。Pepducin の膜透過に重要な構造的因子（脂質部分の構造、ペプチド部分のサイズ、配列、ペプチド以外の分子の送達の可否等）を詳細に評価し、新規細胞内送達システムを構築するためには、まず pepducin の機能ドメイン（ペプチド部分）の細胞内移行を可視化する方法論の確立が必須であり、pepducin の膜における配向性の差別化が鍵となる。

2. 研究の目的

本研究では pepducin の細胞内透過機構の解析のために、申請者の開発した Mapoc (4-dimethylaminophenacyloxy carbonyl) 基のフォトトリガー反応を用いた細胞内イメージングシステムを考案し、細胞にダメージを与えることなく細胞内動態を観察する。すなわち本化合物の誘導体を光感受性のリンカーとして pepducin のペプチドと脂質の間に挿入し、さらにこのときそれぞれのユニットに蛍光団を配することにより蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いた細胞内動態イメージングプローブを合成する。

3. 研究の方法

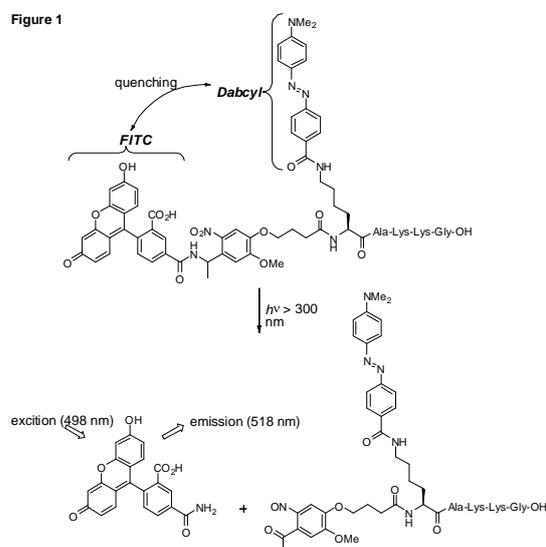
Mapoc 基の吸収極大波長は 340 nm 付近であるが、フェナシル基芳香環には化学修飾の余地が残っており、細胞を用いた実験系に高い適合性を有する保護基とリンカーの開発を指向して、(1);光吸収領域の長波長シフトと光反応性の微調整を目的に、主にフェナシル基芳香環への化学修飾と光反応性の評価を行う。ジメチルアミノフェナシル基のような芳香環を介した電子の push-pull 型の化学構造は可視光領域で励起される蛍光試薬に頻繁に見られるモチーフであり、これを導入することにより細胞への影響をほぼ無視できる 500 nm 付近の照射による切断が期待される。また、(2);新規光感受性リンカーの開発と固相コンビナトリアル合成への応用を視野に入れた固相反応、固相合成への適用を行う。(3);(2)で開発したリンカーを活用し、pepducin 機能ドメインの細胞内移行の可視化と pepducin 膜透過モデルに基づく新規細胞内分子送達システム（ベクター）を構築する。具体的には光感受性リンカーと蛍光クエンチシステムを pepducin に組み込むことにより pepducin の膜透過を可視化するプローブを作成する。本プローブを細胞に投与して照射により蛍光団を放出させれば、膜透過した

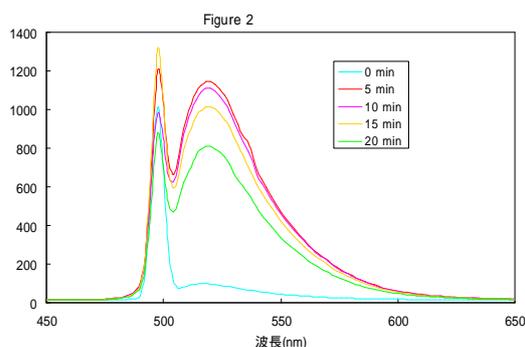
pepducin 由来の蛍光団のみを細胞質内に検出することが可能である (Fig. 2, 左)。このシステムを活用し、pepducin の膜配向制御に関する構造 - 機能相関研究を行う。すなわち、ベクターを構成する脂質構造とペプチド配列を検討することによって、化学構造に基づく膜透過性の差異を系統的に理解する。また、上記で得られたベクターのペプチド側末端に、光感受性リンカーを介して「積荷」であるペプチド、核酸、膜非透過性化合物などを結合させた分子をデザイン、合成する。ここで、「積荷」として許容されるサイズや性質に関する情報を収集し、pepducin と光感受性リンカーを用いた膜非透過性薬物の送達/細胞内分布制御の一般性を検証する。

4. 研究成果

1) FRET クエンチングシステムを組み込んだモデルペプチドの合成と評価

照射による光感受性リンカーの開裂に依存したフルオレセイン蛍光の放出を検証する目的で *o*-ニトロベンジル型光感受性リンカーを用いた FRET モデルペプチドの合成を行った。クロロトリチル樹脂上に保護ペプチド鎖(5 残基)を Fmoc 法にて構築後、別途合成した側鎖に DabcyI を有する Fmoc-Lys(DabcyI)-OH、*o*-ニトロベンジル型光感受性リンカー、フルオレセインの順に縮合を行なった。その後、樹脂を 95%TFA で処理し、側鎖保護基の脱保護と樹脂からの切り出しを行い、逆相 HPLC で精製することにより目的のモデルペプチドを得た。本モデルペプチドに照射 ($h\nu > 300$ nm) したところ、15 分以内にほぼ定量的に光切断反応が進行した。一方でフルオレセインの蛍光強度は照射により増大するものの、照射 5 分以内に時間依存的に減少することが明らかとなった。これは照射によるフルオレセインの分解が一部進行するためであると考えられ

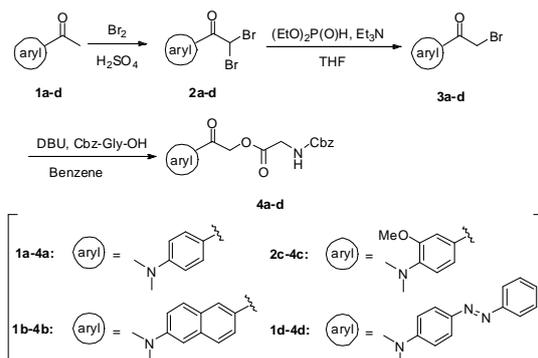




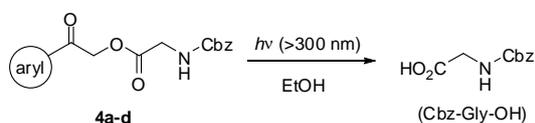
る。現在、上記の蛍光クエンチングシステムを PAR1 (protease- activated receptor-1) の細胞内第 3 ルー プ ペ プ チ ド (RCLSSAVANRSKKSRL) と パ ル ミ チ ン 酸 から なる pepducin に 組 み 込 ん だ ペ プ チ ド の 合 成 を 行 っ て い る。

2) フェナシル基を基盤とする新規光感受性リンカーの合成と評価

以前の研究より、フェナシル型光感受性保護基はケトン α 位に生ずるラジカル安定化が脱保護速度を加速させることが明らかになっているため、電子供与性基の導入により



脱保護速度の加速も同時に期待される。そこで、ジメチルアミノフェナシル型光感受性リンカーの光切断効率の向上をめざし、フェナシル基芳香環への電子供与性基の導入や縮環構造での置換を行い、その光反応性を評価



Compound	Photolysis time (min) ^a	Yield of Cbz-Gly-OH, (%) ^b	$t_{1/2}$ (min) ^c
4a	30	92	13
4b	30	53	29
4c	60	65	39
4d	60	0	-

^aEach sample solution was irradiated with 100W high pressure Hg lamp ($h\nu > 300$ nm) at room temperature.

^bDetermined by measurement of regenerated Cbz-Gly-OH by ¹H NMR. ^cDetermined by the disappearance of **4** by ¹H NMR.

した。

光切断反応の基質となるフェナシルエステル 4a-4d は、対応するアセトフェノン 1 の臭素化とジエチルホスファイトで処理することにより得られるモノプロモ体のエステル化反応により調整した。4a-4 はエタノール中、100W 高圧水銀ランプを用いて照射を行い、放出される Cbz-Gly-OH を指標に各化合物の光反応性を評価した。

4-ジメチルアミノフェニル基を有する化合物 **4a** は 30 分以内に高収率で Cbz-Gly-OH を放出したものの 6-ジメチルアミノナフチル基、または 3-メトキシ-4-ジメチルアミノフェニル基を有する化合物は反応性が低く Cbz-Gly-OH の収率は **4b** で 30 分後に 53%、**4c** で 60 分後に 65%であった。一方で、**4d** は 60 分照射後でも全く切断反応が進行しなかった。今回の条件では既知のジメチルアミノフェナシル型のリンカーより切断速度の優れたリンカーを見出すことはできなかったが、これら化合物の反応性の差は化合物ごとの λ_{max} の差異に起因する可能性も考えられるため、今後は、より長波長の光を用いた光切断反応による評価を行う予定である。

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 4 件)

- S. Ueda, H. Nagasawa Copper-Catalyzed Synthesis of Benzoxazoles via a Regioselective C-H Functionalization/C-O Bond Formation under Air Atmosphere *J. Org. Chem.* (2009), in press (査読有)
- S. Ueda, H. Nagasawa Synthesis of 2-Arylbenzoxazoles by Copper-Catalyzed Intramolecular Oxidative C-O Coupling of Benzanilides *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2008), 47(34), 6411-6413. (査読有)
- S. Ueda, M. Kato, S. Inuki, H. Ohno, B. Evans, Zi-xuan Wang, S. C. Peiper, K. Izumi, E. Kodama, M. Matsuoka, H. Nagasawa, S. Oishi, N. Fujii Identification of Novel Non-peptide CXCR4 antagonists by Ligand-based Design Approach *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2008), 18(14), 4124-4127. (査読有)
- Shinya Oishi, Ryo Masuda, Barry Evans, Satoshi Ueda, Yukiko Goto, Hiroaki Ohno, Akira Hirasawa, Gozo Tsujimoto, Zixuan Wang, Stephen C. Peiper, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Nobutaka Fujii

Synthesis and Application of Fluorescein- and Botin-labeled Molecular Probes for Chemokine Receptor CXCR4.

ChemBioChem (2008), 9(7), 1154-1158.

(査読有)

〔学会発表〕(計 3件)

1. S. Ueda, H. Nagasawa, Copper-catalyzed C-H activation/C-O bond formation for the synthesis of benzoxazoles. The First International Symposium on Process Chemistry, Kyoto, July, 2008
2. 橋本翔太、上田聡、岡田崇宏、奥田健介、永澤秀子 銅触媒を用いた分子内酸化的C-Oカップリングによるオキサゾール環形成反応 日本薬学会第128年回京都 2009年3月
3. 上田聡、岡田崇宏、橋本翔太、奥田健介、永澤秀子 銅触媒を用いた位置選択的C-H活性化/C-O結合形成によるベンゾオキサゾール環形成反応 第34回反応と合成の進歩シンポジウム 京都 2008年11月

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

ベンゾオキサゾール化合物の製造方法

出願日 2008年4月14日、出願番号：
2008-104746) 永澤秀子、上田聡

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 聡 (UEDA SATOSHI)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：5 0 4 5 3 0 5 6

(2)研究分担者

(3)連携研究者