

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790124

研究課題名（和文） グルタチオントランスフェラーゼ検出プローブを用いた細胞内スクリーニング創薬

研究課題名（英文） Development of GST detection probe, and intracellular drug screening

研究代表者

柴田 綾 (SHIBATA AYA)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：50462693

研究成果の概要（和文）：

本研究ではアリールスルフォニル基を保護基に用いてGST検出のためのプローブ開発を行った。開発したプローブは、基質自身はGSH修飾を受けず排出機構の影響を受けないため、細胞内で安定してシグナルを発生させることが可能である。このアリールスルフォニル基を用いて、GSTで活性化される蛍光、化学発光、<sup>19</sup>F-NMRプローブおよびプロドラッグの合成に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Our aim is to develop of the probe, which is protected by arylsulfonyl group, for GST detection. The deprotected molecule, which is not a glutathione conjugate, makes it possible to achieve signal cell retention. We succeeded in synthesis of fluorogenic probes, bioluminescent probes, <sup>19</sup>F-NMR probes and prodrugs against GST activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、アリールスルフォニル基、蛍光プローブ、化学発光プローブ、<sup>19</sup>F-NMR プローブ

## 1. 研究開始当初の背景

第2相薬物代謝酵素として知られるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)は、がん細胞で過剰発現していることが古くから知

られていた。この GST は、疎水性化合物(発がん性物質、治療薬等)とグルタチオン(GSH)の求核置換反応を触媒する。この反応の結果、GSH 抱合体となった化合物はトランスポーターの1種である多剤耐性タンパク質(MRP)に

よって速やかに細胞外に排出される。この GST の過剰発現が抗がん剤耐性の一因となっているため、細胞内 GST 活性レベルの情報は、抗がん剤等の投薬診断の重要な決定指針となり、未だ不明な環境変化に対する GST の発現調節機構の解明にも寄与すると考えられる。

これまでも、生細胞内 GST 検出のための蛍光発光プローブとしていくつか報告されていた。しかし、既出のプローブは蛍光を発する際にプローブが GSH 抱合体となり、MRP により速やかに細胞外に排出されることから、細胞内 GST の定量的検出は困難であると予測された。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内で安定にシグナルを発生することが可能な GST 検出プローブの開発を目的とした。具体的には、「アリールスルフォニル保護基が GST に認識され、脱保護される」反応メカニズムに基づいて、蛍光、化学発光、<sup>19</sup>F-NMR プローブおよび GST 活性選択的なプロドラッグを合成する。

## 3. 研究の方法

GST の基質となる分子プローブは、GSH と反応するアリールスルフォニル保護基と、機能がマスクされた本体から構成される。アリールスルフォニル保護基が細胞内に導入されると、プローブに対し GSH が GST を触媒として求核置換攻撃を行う。この芳香族求核置換反応の結果、プローブから保護基が除去され、シグナルが発生する (図 1)。この反応の時に、プローブ自身は GSH 修飾を受けないことから細胞内で安定してシグナルを発生することが可能となる。

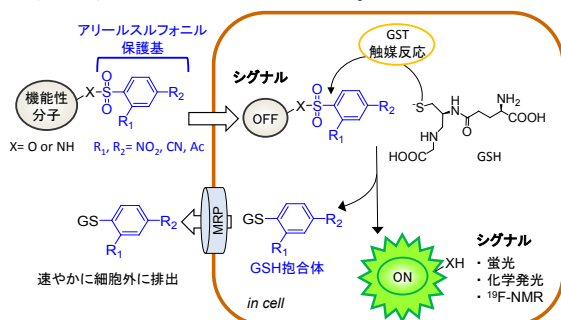


図 1 GST 検出のためのプローブ開発

本研究ではプローブとなる機能性分子として、蛍光基質、化学発光基質および <sup>19</sup>F-NMR の基質を用い、異なるシグナルによる GST の検出を試みた。また、これらプローブ設計で得られた知見をもとに、抗癌剤であるドキソルビシンにアリールスルフォニル基を導入し GST 特異的に薬効を示すプロドラッグの開発も併せて行った。

## 4. 研究成果

### 蛍光プローブを用いた GST 検出

保護基にジニトロベンゼンスルフォニル (DNs) 基、蛍光基質にクマリン、ローダミンおよびクレシルバイオレットを用いて、450 から 650nm までの異なる色調の GST 検出プローブを開発した。次に、これらプローブを用いて、Karolinska 研究所と共同で各種 GST のサブタイプに対する反応性について検討を行った。その結果、今回合成したプローブは、特に GSTA1-1 に対し高い特異性を示すことが明らかとなった。特に DN s-Cv は GST 非存在下と比較してその反応効率が  $2.4 \times 10^9$  倍に増加することが確認できた。さらに DN s-Cv を用いて生細胞内の GST イメージングを行ったところ、細胞内の GST レベルに応じた蛍光発光を得ることに成功した (図 2C)。

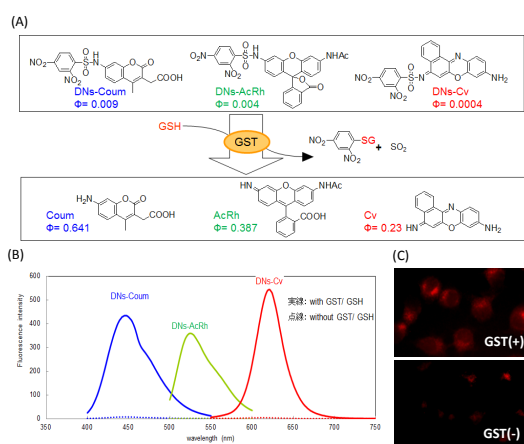


図 2 (A) GST 検出蛍光プローブ, (B) 各蛍光スペクトル, (C) 細胞内イメージング

次に、アリールスルフォニル基に求電子性の異なる様々な置換基を導入し、各種アリールスルフォニル基で保護したプローブと GST の反応性について検討を行った。結果、*p*位アセチル基もしくはシアノ基を用いたアリールスルフォニル基を保護基に用いることで高いシグナル・バックグラウンド比を持つ GST 検出用蛍光プローブを得ることができた。また、各種基質の構造活性相関から、保護基部の電子吸引力が GST に対する反応性の指標である  $k_{cat}$  に関連すること、また保護された基質の構造が GST に対する結合親和性  $K_m$  に関わっていることが示唆された。

### 化学発光プローブを用いた GST 検出

化学発光プローブとしてジオキセタン誘導体を合成した。保護基には蛍光プローブの開発で得られた知見をもとに 4-アセチル-2-

ニトロベンゼンスルフォニル (ANs) 基を用いた。GSH/GST 活性によりプローブから ANs 基が除去されると、アルコキシジオキセタン中間体が生成する。この構造が分解する際に化学発光が起こることを利用して、系内の GST 活性を測定した (図 3A)。

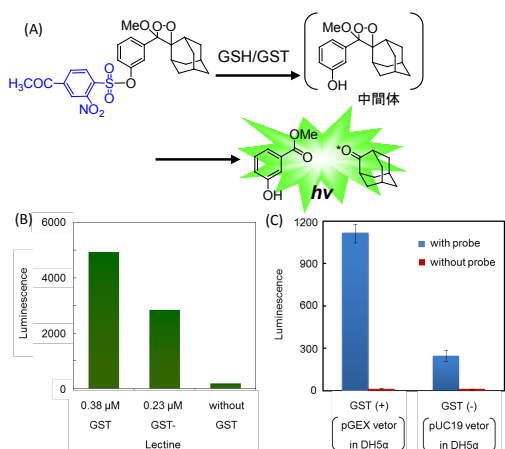


図 3 (A) 化学発光プローブ, (B) 試験管内の GST 検出, (C) 大腸菌内の GST 検出

合成した化学発光プローブを用いて、試験管内の GST の検出を行った (図 3B)。この際 GST 単体以外に、GST とレクチンの融合タンパク質の検出についても合わせて検討した。その結果、合成した化学発光プローブは GST 融合タンパク質の検出も可能であることが明らかとなった。これは、化学発光プローブが GST タグを用いた ELISA 形式での高感度検出へ応用可能であり事を示すものである。さらにこのプローブを用いて生きた大腸菌内の GST 活性の検出を試みた (図 3C)。この結果、GST 発現ベクターである pGEX ベクターを導入した大腸菌で優れた化学発光シグナルを得ることに成功した。

#### <sup>19</sup>F-NMR プローブを用いた GST 検出

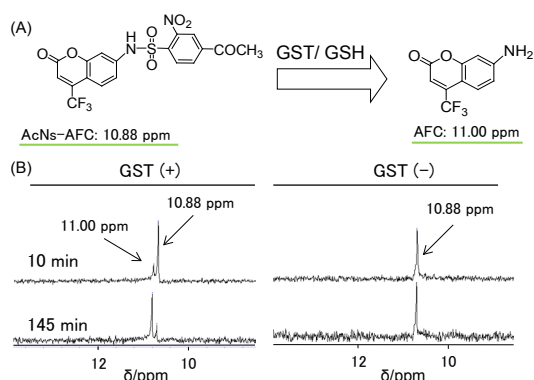


図 4 (A) <sup>19</sup>F-NMR プローブ, (B) 大腸菌内の GST 検出

<sup>19</sup>F-NMR プローブの合成はトリフルオロ基を構造内に持つアミノクマリンを用いて合成した。保護基には発光プローブと同様に ANs 基を用いた。ANs 基が除去されると <sup>19</sup>F-NMR のピークが 10.88 ppm から 11.00 ppm へシフトすることを利用して GST 活性を検出した (図 4A)。このプローブは、各種 GST サブタイプに対する酵素反応性解析から、α GST に対して高い反応性を示した。さらに、大腸菌の培養液にプローブを添加したところ、GST 発現している大腸菌でのみ顕著なシグナル変化を与えた (図 4B)。このことから、このプローブは MRI を用いた癌診断への応用が期待できる。

#### GST 依存的プロドラッグの開発

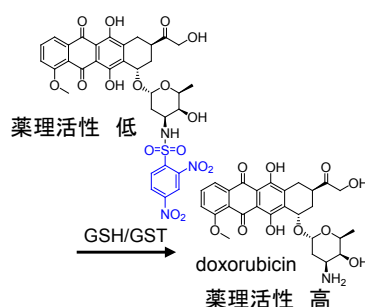


図 5 GST 活性依存的プロドラッグ

プローブ開発で得られた知見をもとに、GST 活性依存的に薬効を示すプロドラッグの開発を試みた。実験には抗がん剤の一種であるドキソルビシン (Dox) を用い、Dox のアミノ基へアールスルフォニル基を導入し、プロドラッグ化を行った (図 5)。この結果、DNs 保護ドキソルビシンは GST 高発現株でより高い薬効を示すことを確認できた。

#### 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 3 件)

- ① Ito M., Shibata A., Zhang J., Hiroshima M., Sako Y., Nakano Y., Kojima-Aikawa K., Mannervik B., Shuto S., Ito Y., Morgenstern R. and Abe H., "Universal Caging Group for In Cell Detection of Glutathione Transferase Applied to <sup>19</sup>F NMR and Bioluminescent Probes.", *ChemBioChem*, (2012) in press. 査読有
- ② Zhang J., Shibata A., Ito M., Shuto S., Ito Y., Mannervik B., Abe H. and Morgenstern R., "Synthesis and characterization of a series of highly fluorogenic substrates for glutathione transferases, a general strategy.", *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14109-14119 (2011). 査読有
- ③ Johansson K., Ito M., Schophuizen C. M., Mathew Thengumtharayil S., Heuser V. D.,

Zhang J., Shimoji M., Vahter M., Ang W. H., Dyson P. J., Shibata A., Shuto S., Ito Y., Abe H. and Morgenstern R., "Characterization of new potential anticancer drugs designed to overcome glutathione transferase mediated resistance.", *Mol. Pharmaceutics*, **8**, 1698-1708 (2011). 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 柴田 綾, Zhang Jie, 伊藤 美香, 周東 智, Mannervik Beng, 阿部 洋, Morgenstern Ralf, 伊藤 嘉浩: 「グルタチオン-S-トランスフェラーゼ検出プローブの合成と性質」、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 12 日、茨城県つくば市
- ② 柴田 綾: 「生物学研究のための光プローブ」、第 6 回理研「バイオものづくり」シンポジウム、2011 年 5 月 10 日、埼玉県和光市
- ③ 伊藤 美香, 柴田 綾, 阿部 洋, Zhang Jie, Morgenstern Ralf, 周東 智, 伊藤 嘉浩: 「新規蛍光プローブの合成とグルタチオントランスフェラーゼに対する基質特異性の解析」、日本薬学会第 131 年回、2011 年 3 月 5 日、静岡県静岡市
- ④ 伊藤 美香, 柴田 綾, 阿部 洋, Morgenstern Ralf, 周東 智, 伊藤 嘉浩: 「グルタチオントランスフェラーゼの基質となる発光プローブの開発」、第 29 回メデジナルケミストリーシンポジウム、2010 年 11 月 17 日、京都府京都市
- ⑤ 柴田 綾、阿部 洋、伊藤 美香、Morgenstern Ralf、周東 智、伊藤 嘉浩: 「細胞内グルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性検出のためのプローブ開発」、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、2010 年 9 月 26 日、大阪府大阪市
- ⑥ 伊藤 美香、柴田 綾、阿部 洋、Morgenstern Ralf、周東 智、伊藤 嘉浩: 「グルタチオン S-トランスフェラーゼの基質となる発光プローブの開発」、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、2010 年 9 月 26 日、大阪府大阪市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: グルタチオン-S-トランスフェラーゼを用いた脱保護法、及びその利用  
発明者: 阿部洋、柴田綾、伊藤嘉浩、伊藤美香  
権利者: 理化学研究所

種類: 特願  
番号: 特願 2010-214260  
出願年月日: 2010 年 9 月 24 日  
国内外の別: 国内

○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  
<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 綾 (SHIBATA AYA)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号: 5 0 4 6 2 6 9 3