

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560400

研究課題名(和文) 活性型/不活性型2種プローブシステムを用いた天然物結合タンパク質探索法の開発

研究課題名(英文) Development of an Active/Inactive Dual Probe Photoaffinity Labeling System for Identification of Natural Product Binding Proteins

研究代表者

櫻井 香里 (Sakurai, Kaori)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50447512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：天然物の活性発現機構の解明には、結合タンパク質の合理的な同定法の開発が最重要課題である。本研究では、天然物リガンドとして抗癌活性化合物OSW-1を対象とし、(1)有機合成法によりOSW-1を基盤とした活性型フォトアフィニティープローブおよび不活性型プローブを創製し、(2)2種プローブフォトアフィニティーラベリング法の応用によりOSW-1の未知結合タンパク質の探索を行った。本研究で開発した活性型、不活性型フォトアフィニティー・プローブは天然物リガンドの結合タンパク質の探索に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Identification of binding proteins is critical for understanding the mechanism of action for natural products. In this study, we synthesized an active photoaffinity probe based on an antitumor saponin OSW-1 and corresponding inactive photoaffinity probes to apply the previously developed dual-probe photoaffinity labeling method for the identification of OSW-1 binding proteins. We showed that the active and inactive photoaffinity probes we developed were useful in detecting candidate proteins selective toward the active probe.

研究分野：生物有機化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：フォトアフィニティープローブ フォトアフィニティーラベリング 天然物リガンド OSW-1 結合タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

天然物の活性発現メカニズムの解明には、結合タンパク質の合理的な同定法の開発が最重要課題である。天然物が作用する細胞系は1万種以上のタンパク質が広いダイナミックレンジで発現している複雑な系である。アフニティーカラムを用いた従来法では、高発現量の非特異的結合タンパク質が偽陽性検出される問題が古くより未解決であり、多くの場合に結合タンパク質の真偽の検証に労力を要する。特に低発現量タンパク質や膜タンパク質などへの適用は困難であり、一般的な方法論は確立していない。このため天然物リガンドの結合タンパク質を同定するためには、プロテオームを広く探索でき、また特異的な結合活性を有するタンパク質のみを選択的に検出し、単離する手法を確立する必要がある。

我々はこの問題の解決に向けて、結合タンパク質を光反応により共有結合でラベル化するフォトアフニティーラベリング(PAL)法に着目した。本手法は、天然物を光反応基で誘導化したプローブを用いて、タンパク質混合溶液中で特異的にプローブと結合したタンパク質のみを架橋する。生細胞にも適用可能であり、原理的にタンパク質探索の網羅性が高い点が利点である。非特異的なタンパク質との反応性が技術的な問題であるため、われわれは不活性型プローブを併用することで、活性型プローブと非特異的タンパク質との結合作用を競合阻害し、本手法の改良を図った。活性型/不活性型2種プローブをワンポットで併用し、PAL反応生成物を異なる波長の蛍光ラベルにより識別するdual-probe photoaffinity labeling systemを開発し、細胞溶解液中の含有率が0.1%のモデル結合タンパク質の選択的検出に成功した。(Sakurai *et al. ChemBioChem* **2013**, *14*, 421.)。

ユリ科植物由来の抗癌活性サポニンOSW-1(Figure 1)は、非常に強力( $IC_{50} = 0.25$  nM; HeLa細胞)かつ選択的な抗癌活性を示すため注目される。これまでに全合成や構造活性相関研究や作用機構解析について多くの報告があるが、その分子レベルでの作用機構は分かっていない。近年の報告では、アフニティーカラムを用いた化学的手法により oxysterol 結合タンパク質(OSBP; Shair *et al. Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 639.)が、一方細胞生物学的手法では  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger 1(NCX1)が OSW-1 結合タンパク質として発見

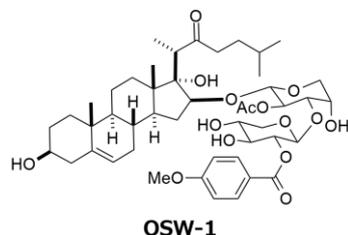


Figure 1. Structure of OSW-1

された(Huang *et al. J. Biol. Chem.*)。これらより、OSW-1には複数の結合タンパク質が存在し、その作用機構は複雑であることが示唆されている。既にOSW-1及び活性型同族体について、産生植物からの簡便な抽出精製法を確立しており、単離した化合物を用いて3次元構造解析を行った結果、初めて活性構造に関する仮説を発表した(Sakurai *et al. Org. Lett.* **2010**, *12*, 5732.)。

## 2. 研究の目的

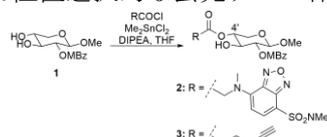
天然物結合タンパク質の合理的な同定法の開発に向けて、プロテオームを広く探索でき、また天然物リガンドの特異的・非特異的結合相互作用を制御し識別する方法論が求められる。本研究では、天然物リガンドとして抗癌活性化合物OSW-1を対象とし、(1)有機合成法によりOSW-1を基盤とした活性型フォトアフニティープローブおよび不活性型プローブを創製し、(2)2種プローブフォトアフニティーラベリング法の応用によりOSW-1の未知結合タンパク質探索への応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

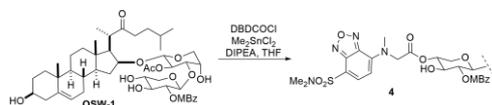
OSW-1を基盤としたフォトアフニティープローブの合成と機能解析に向けて、以下の計画に基づいて本研究を実施した。(1)OSW-1の効率的な誘導化方法およびOSW-1を基盤とした活性型/不活性型フォトアフニティープローブの合成法を確立する。(2)合成した各プローブについて所望の活性の有無を細胞毒性試験により評価する。(3)合成調達した活性型および不活性型プローブを用いて、細胞溶解液とのPAL反応を実施する。活性型/不活性型プローブと反応したタンパク質は、それぞれ蛍光イメージング解析法を用いて検出効率を解析し、OSW-1結合タンパク質探索における有効性を検証する。

## 4. 研究成果

(1) OSW-1の効率的な誘導化方法およびOSW-1を基盤とした活性型/不活性型PALプローブOSW-1は希少サンプルであるため、まずOSW-1の部分構造を模したモデル化合物1において、有機スズ触媒による水酸基の位置選択的アシル化反応を利用して、蛍光ラベルなどの機能性官能基の誘導化方法を開発した(2-3; Scheme 1)。この方法に基づいて、植物試料より精製調達した無保護のOSW-1を用いて、1工程で位置選択的な蛍光ラベル体4の合成

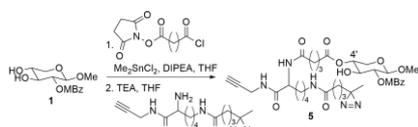


に成功した (Scheme 2)。合成した OSW-1 蛍光プローブを用いた細胞内局在解析の結果、小胞体やゴルジ体が OSW-1 の細胞内作用部位であるという示唆を得た。

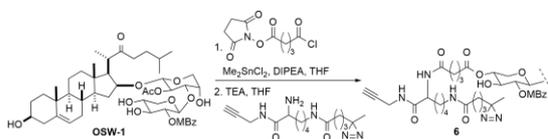


Scheme 2

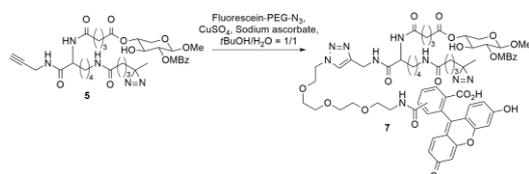
次に、開発した位置選択的アシル化反応を応用し、2段階で光反応基を導入する方法を検討した。モデル化合物を用いて種々の条件を検討し、glutaryl chloride NHS ester を第一段階で導入し、第二段階で光反応基を含むラベル部位をアミド化により導入する方法を得た (5; Scheme 3)。この方法を無保護の OSW-1 に対して適用し、所望のフォトアフィニティープローブ 6 を良好な収率で得た (Scheme 4)。モデル化合物のフォトアフィニティーラベル体は fluorescein-PEG-azide との copper-promoted alkyne-azide cycloaddition (CUAAC) によりさらに蛍光ラベル化し、OSW-1 の糖鎖部分構造を提示した不活性型プローブ 7 を得た (Scheme 5)。また同様のフォトアフィニティーラベルを用いてステロール部位構造を有する不活性型プローブ 8 を合成した (Scheme 6)。



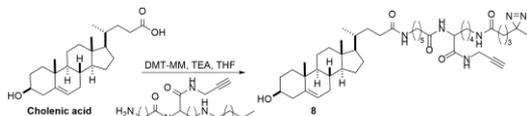
Scheme 3



Scheme 4



Scheme 5



Scheme 6

## (2) 合成した各プローブの細胞毒性試験

合成調達した活性型および不活性型プローブについて、それぞれ期待される活性を有するかどうかを HeLa 細胞を用いて細胞毒性試験を実施した。その結果、活性型プローブは OSW-1 と同等の活性を保持し、不活性型プローブはいずれも不活性であることを確認した。

## (3) 活性型および不活性型プローブを用いた細胞溶解液中における PAL 反応および OSW-1 結合タンパク質探索への応用

合成した活性型・不活性型フォトアフィニティープローブをタンパク質の効率的な検出に用いることができるかどうかを検討した。まず活性型プローブ 6 と不活性型 5, 7-8 それぞれを、sterol への結合特性が既知のモデル系タンパク質である BSA とバッファ中で結合させ、氷浴上で 365 nm の UV を照射し反応させた。反応生成物はアセトン沈殿による粗精製後、Rhodamine-azide を用いて CUAAC 反応条件下で蛍光ラベル化し、電気泳動と蛍光イメージングにより解析した。UV 非照射条件やプローブ非存在条件下の反応生成物との比較から、アルキン基を有するプローブを介さずに、CUAAC によるタンパク質への非特異的な Rhodamine ラベル化が進行し、PAL 反応による結合タンパク質の架橋生成物の解析を妨げることが判明した。このため、CUAAC 反応の条件を検討し、界面活性剤を適量に含有する酢酸ナトリウムバッファを用いた反応条件下で非特異的な蛍光ラベル化を多少抑制できることを見出した。

次に HeLa 細胞溶解液中において、各プローブのそれぞれを用いて PAL 反応を行った。細胞溶解液との PAL 反応生成物を電気泳動解析した場合には分離能が著しく低下したため、未反応プローブの除去や脱塩条件を種々検討した。フォトアフィニティープローブ 5-8 は比較的疎水性が高いため、クロロホルムメタノール沈殿を繰り返す精製条件を用いることとした。この上で細胞溶解液と PAL 反応生成物を蛍光イメージングにより比較解析したところ、活性型プローブに選択的にクロスリンクしたタンパク質が検出された。この結果より、本研究において開発した活性型・不活性型フォトアフィニティープローブは、OSW-1 の結合タンパク質の探索に有用であることが示唆された。今後は、活性型・不活性型 2 種プローブを用いた検出条件をさらに最適化した後、活性型プローブによって選択的に検出された結合タンパク質候補を同定する予定である。

## 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 3 件)

1. Sakurai, K., Ozawa, S., Yamada, R., Yasui, T., Mizuno, S. "Comparison of the Reactivity of Carbohydrate Photoaffinity Probes with Different Photoreactive Groups", *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 1399-1403. Selected as a Cover Picture Article. DOI: 10.1002/cbic.201402051. (査読有)

2. Sakurai, K., Takeshita, T., Hiraizumi, M., Yamada, R. "Synthesis of OSW-1 Derivatives by Site-Selective Acylation and Their Biological Evaluation" *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 6318-6321. DOI: 10.1021/ol503044j. (査読有)
3. Yamada, R., Takeshita, T., Hiraizumi, M., Shinohe, D., Ohta, Y., Sakurai, K. "Fluorescent Analog of OSW-1 and its Cellular Localization" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 1839-1842. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.02.009. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 平泉将登、武下智哉、山田里佳、櫻井香里, "位置選択的モノアシル化反応を用いた OSW-1 不活性体の分子プローブの合成", 第 69 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、横浜国立大学、横浜、2015 年 5 月 16 日
2. K. Sakurai, "Synthesis and Biological Evaluation of OSW-1 Analogs as Chemical Probes", The 8th Singapore International Chemistry Conference, December 15, 2014, Singapore (Invited).
3. 武下智哉、平泉将登、山田里佳、櫻井香里 "位置選択的モノアシル化反応を用いた OSW-1 のビオチンプローブの合成と生物活性評価", 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014、2014 年 10 月 15 日 タワーホール船堀、東京
4. 武下智哉、平泉将登、山田里佳、櫻井香里 "位置選択的モノアシル化反応を用いた OSW-1 の分子プローブの合成", 第 67 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、2014 年 5 月 17 日、慶応大学、横浜
5. M. Hiraizumi, T. Takeshita, R. Yamada, K. Sakurai "Synthesis of a fluorescently labeled analog of antitumor saponin OSW-1", 日本化学会第 94 春季年会 2014 年 3 月 27 日、名古屋大学、名古屋
6. K. Sakurai, "Dual-probe photoaffinity labeling strategy for selective detection of small-molecule binding proteins", 10th Japanese-German Frontiers of Science Symposium, 2013 年 11 月 1 日、京都ブリントンホテル
7. 櫻井香里, "フォトアフィニティーラベリングを用いた低分子-タンパク質相互作用解析", 第 13 回有機合成化学協会関東支部談話会、2013 年 9 月 27 日、和光純薬工業(株)湯河原研修所 (静岡県熱海市)
8. R. Yamada, K. Sakurai, "Fluorescently Labeled OSW-1 and Its Biological Evaluation", 第 48 回天然物化学談話会、2013 年 7 月 5 日、アヤハレークサイドホテル (滋賀県大津市)
9. R. Yamada, K. Sakurai, "Fluorescently Labeled OSW-1 and Its Biological Evaluation", 第 8 回ケミカルバイオロジー学会年会、2013 年 6 月 19 日、東京医科歯科

大学、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 香里 (SAKURAI KAORI)

東京農工大学・大学院工学研究院

准教授

研究者番号:50447512

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: