

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560449

研究課題名(和文)細胞内でのクロスリンク過程を可視化する発蛍光型光親和性標識基の開発

研究課題名(英文)Development of fluorescence-emitting photoaffinity probe that enables the visualization of cross-linking process within cells.

研究代表者

難波 康祐 (NAMBA, Kosuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：50414123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：単分子で白色の蛍光を示す新規蛍光分子を開発した。この単分子白色蛍光分子は約数分の光照射によって分解し、青色蛍光を示す分子へと変換されたことから、本蛍光分子はタンパク質の標識化の過程を蛍光色の変化で検知できる有用な光親和性標識基となることが示唆された。また、黄色や赤色を示すコンパクトな蛍光分子、チオールのみと特異的に反応し、蛍光を大きく増大するチオールセンサーの開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：A white-light-emitting molecule was developed. Since the fluorescence color of this molecule was changed from white to blue by UV irradiation within several minutes, this molecule was suggested to be a useful photoaffinity probe that can detect the labeling process of target protein by the observation of fluorescence color change. Furthermore, development of yellow and red fluorescence compact molecules and novel thiol sensor, substantially increasing the fluorescence intensity by the specific addition of thiol groups, were achieved.

研究分野：有機合成化学

キーワード：
蛍光分子 光親和性標識 チオールセンサー 単分子白色発光 1,3a,6a-トリアザペンタレン 蛍光標識

1. 研究開始当初の背景

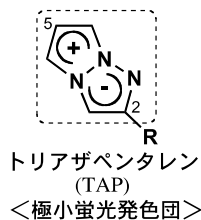
光親和性標識法 (photoaffinity labeling) は、生物活性低分子化合物と標的タンパク質を光照射により不可逆的な共有結合でクロスリンク (架橋) させる標識化法である。本法を用いて生きた組織や細胞中に存在する標的タンパク質を直接的・選択的に標識することが出来れば、自然な状態での内在性タンパク質の動的解析が可能となる。これには、1) 低分子リガンドの細胞内での挙動追跡、2) 相互作用している状態での光照射、3) 細胞へのダメージを軽減する最小限の光照射、4) 標識化タンパク質と残存低分子プローブとの区別、などを可能にする革新的なプローブの開発が必要であった。

2. 研究の目的

我々は、光親和性標識(photoaffinity labeling) に関わる全てのプロセスを可視化するという新しい概念を提案する。すなわち、1,3a,6a-トリアザペンタレン(TAP)の蛍光特性を利用することで、「生物活性化合物の細胞内挙動→タンパク質との相互作用→共有結合形成(クロスリンク)→標識化されたタンパク質の追跡」の全てのプロセスを可視化できる画期的な光親和性ラベルを設計・合成・検証する。これにより、生物活性低分子化合物の標的タンパク質を生きた細胞内で直接的・選択的に標識化し、その標識化されたタンパク質の働きを細胞内で直接解析できる画期的なツールを当該領域の研究者に提供する。

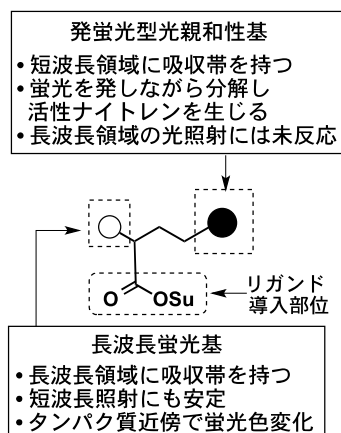
3. 研究の方法

当研究室で開発された最小の新規蛍光分子 1,3a,6a-triazapentalene



(TAP)を基盤として新たな光親和性標識基の開発を

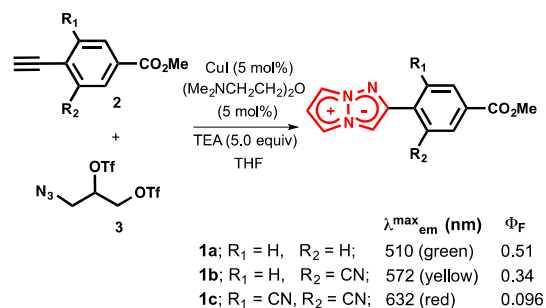
行う。すなわち、1) 短波長領域に吸収帯を持ち、光照射によって蛍光を発生しながらナイトレンを発生する TAP 誘導体、および 2) 長波長領域に吸収帯を持ち、かつ周囲の環境に反応して蛍光波長を変化させる TAP 誘導体をそれぞれ開発する。それらの TAP 誘導体が開発できれば、光親和性標識基として、二つの TAP 誘導体とリガンド導入部位を併せ持つ化合物の開発を行う。この光親和性標識基を生物活性化合物に導入することで、以下のような標識が可能となる。すなわち、長波長側の蛍光で組織内での挙動追跡を行い、標的タンパク質との相互作用を確認した段階で短波長側の光照射によってナイトレンを発生させる。このとき、短波長側の蛍光によってナイトレンの発生を確認し、細胞への光照射を最小限にする。ついで、標識されたタンパク質を長波長側の蛍光で追跡するというものである。



以上の新規光親和性標識基の開発を目指し、本研究では先の二つの TAP 誘導体の開発を試みた。

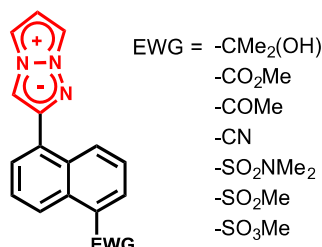
4. 研究成果

まずは長波長の蛍光を示す安定な TAP 誘導体の開発に取り組んだ。TAP の蛍光波長は 2 位置基の電子求引性に応じて長波長側にシフトすることから、2 位のベンゼン環に電子求引基を導入していくことにした。種々の電子求引基を有するフェニルアセチレン誘導体 2 とアジド 3 との click 反応は円滑に進行し、望む TAP 誘導体 1 を高収率で与えた。検討の結果、4 位にメチルエステルを有する 1a では緑色、2 位にシアノ基と 4 位メチルエステルを有する 1b では黄色、2, 6 位にシアノ基と 4 位メチルエステルを有する 1c は赤色の蛍光を示した。以上のようにして、黄色および赤色の長波長の蛍光を示す TAP 誘導体を創製することに成功した。また 1b は、メチルエステル部位を加水分解によりカルボン酸へと変換後、スクシンイミドエステル (NHS) とすることでアミンの標識試薬とした。この NHS 体は種々のアミンと容易に縮合し、得られた縮合体は強い黄色の蛍光を示した。従って、4 位のメチルエステル部位を生物活性化合物との連結部位に利用可能であることを明らかにした。

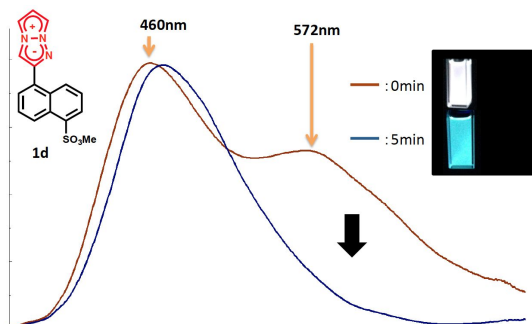


長波長蛍光を示す TAP 誘導体の開発に成功したことから、次に光照射により分解すると共に蛍光色を変化させる誘導体の開発に取り組んだ。TAP の蛍光は TAP 環から 2 位置換基への CT 遷移であることが計算により明らかになっている。そこで、2 位置換基

にナフタレン環を導入すれば、TAP 環からの CT 遷移とナフタレン環の局所励起により 2 種類の異なる発光メカニズムが可能と考えられた。すなわち、TAP 環が光照射により分解すれば発光メカニズムが変化し波長変化を誘起すると予想された。そこで、ナフタレン環上に種々の置換基を有する 2-ナフチル-TAP 誘導体を合成し、それらの蛍光特性を調査した。

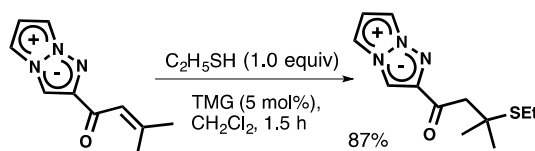


その結果、電子求引性の置換基としてスルホン酸メチル、スルホニル基、およびシアノ基を有する誘導体が白色の蛍光を示すことが明らかとなった。スルホン酸メチルを有する基質 **1d** の蛍光スペクトルを測定したところ、460 nm と 572 nm の二つの蛍光極大を有しており、この二つの蛍光極大が全波長領域をカバーしていることによって白色蛍光を発していることが分かった。また、**1d** は 365 nm の光を照射した直後は二つの蛍光極大を示しているものの、連続的な光照射を行うと、約 5 分後には 572 nm の蛍光極大は消失し、460 nm の蛍光のみとなった。これにより、連続的な照射により白色蛍光は数分で青色の蛍光へと変化する。572 nm の蛍光は TAP 環からナフタレン環への CT 遷移であることが計算により示唆されていることから、連続的な光照射により **1d** の TAP 環が分解したことが示唆されている。現在、光照射による分解物の構造を解析中であるが、超低濃度条件でのみ単一の生成物を与え、通常の濃度では複雑な混合物を与えることから、分解過程でナイトレンが生じているものと考えられる。従って、ナフタレン環に直結した TAP 誘導体は、活性ナイトレンの消失を蛍光色の変化で検知できる光親和性標識基となる可能性が示唆された。今後は、分解の過程を明らかにし、2-ナフチル-TAP を用いたクロスリンク実験に取り組む予定である。



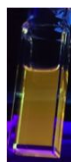
また、生物活性化合物に TAP を導入する基

質として、アミンを標的とした先の NHS 体の他に、チオールを標的としたビニルケトン体の開発も行った。すなわち、2 位にフェニル基を有していないコンパクトな標識基として TAP-VK1 を開発した。TAP-VK1 は種々のチオールと特異的に反応し、アミンやアルコール類とは全く反応しなかった。また、チオールが付加することによって、蛍光強度が大幅に増強された。これにより、TAP-VK1 が全て反応せずに残った場合にも、残存蛍光として蛍光観察に干渉しないことが期待された。実際に、過剰の TAP-VK1 を用いて生理活性ペプチドを標識し、その反応混合物をそのまま細胞に処理することも可能であった。すなわち、過剰の TAP-VK1 は蛍光を発することなく、望む標識体みの挙動追跡が可能であった。さらに、TAP-VK1 はチオールのみと特異的に反応し、反応後には蛍光強度を大幅に増大させることから、チオールセンサーとしての利用も期待されている。今後は TAP-VK1 の蛍光特性を利用して、病気の診断薬などの開発を行っていく予定である。

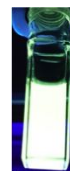


TAP-VK1 (1.2 equiv)

$\lambda_{(abs)}^{max}$ 409 nm
 $\lambda_{(em)}^{max}$ 574 nm
 $\Phi_F = 0.023$



$\lambda_{(abs)}^{max}$ 389 nm
 $\lambda_{(em)}^{max}$ 521 nm
 $\Phi_F = 0.19$



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 14 件)

- 1) M. Yoshida, A. Kobayashi, A. Nakayama, K. Namba, *Tetrahedron*, **2016**, in press.
- 2) M. Yoshida, A. Kobayashi, K. Namba, *Heterocycles*, **2016**, in press.
- 3) A. Nakayama, S. Nishio, A. Otani, A. Mera, A. Osawa, K. Tanino, K. Namba, *Chem. Pharm. Bull.*, **2016**, in press.
- 4) K. Namba, K. Takeuchi, Y. Kaihara, M. Oda, A. Nakayama, A. Nakayama, M. Yoshida, K. Tanino *Nat. Commun.* **2015**, 6, 8731.
- 5) M. Shibata, R. Fuchigami, T. Kotaka, K. Namba, K. Tanino. Acid-catalyzed [4+3] cycloaddition reaction of *N*-nosyl pyrroles. *Tetrahedron*, **2015**, 71, 4495-4499. (査読有)

- 6) K. Namba, A. Osawa, A. Nakayama, A. Mera, F. Tano, Y. Chuman, E. Sakuda, T. Taketsugu, K. Sakaguchi, N. Kitamura, K. Tanino. Synthesis of Yellow and Red Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene and Theoretical Investigation of Optical Properties. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1083-1093. (査読有)
- 7) 大澤歩, 難波康祐. 小型蛍光発色団 1,3a,6a-Triazapentalene. 社団法人日本化学会生体関連機能関連化学部会 NEWS LETTER. **2015**, *29*, 11-14. (査読なし)
- 8) Araki, K. Kousaka, K. Namba, Y. Murata, J. Murata. 2'-Deoxymugineic acid promotes growth of rice (*Oryza sativa* L.) by orchestrating iron and nitrate uptake processes under high pH conditions. *Plant. J.* **2015**, *81*, 233-246. (査読有)
- 9) Y. Yoshida, T. Mizuguchi, K. Namba. One-pot synthesis of tri- and tetrasubstituted pyridines by sequential ring-opening-cyclization-oxidation reaction of N-arylmethyl 3-aziridinylpropiolate esters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *22*, 14550-14554. (査読有)
- 10) K. Namba, Y. Shobo, K. Fujimoto, I. Shoji, K. Tanino. N-Acyl-N-tosylhydrazine as a Synthon To Construct Tetrasubstituted Carbon Centers Possessing a Nitrogen Group. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 5196-5203. (査読有)
- 11) Y. Yoshida, T. Kasai, K. Namba. Total synthesis of (-)-HM-3 and (-)-HM-4 utilizing a palladium-catalyzed addition of an arylboronic acid to an allenic alcohol-Eschenmoser-Claisen rearrangement. *Synlett*, **2014**, *25*, 1160-1162. (査読有)
- 12) Y. Yosida, K. Kinoshita, K. Namba. Synthesis of functionalized 2-vinyl-2,3-dihydropyrroles and 3-methylene-1,2,3,4-tetrahydropyridines by palladium-catalyzed cyclization of β -enaminocarbonyl compounds with allylic bisacetates. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2394-2403. (査読有)
- 13) 難波康祐, 実践的合成研究を基盤としたイネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する研究. *ファルマシア*, **2014**, *50*, 305-309. (査読なし)
- 14) 難波康祐, ムギネ酸類の実用的合成と機能解明プローブへの展開, *月刊ファインケミカル*, **2014**, *43*, 15-22. (査読なし)
- [学会発表](計 67 件)
招待講演のみ抜粋
1. 難波康祐 「Palau'amine の全合成薬学会第 136 年会、シンポジウム「天然物ケミカルバイオロジー」、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
2. 難波康祐 「化学合成の限界に挑むものづくり: palau'amine の全合成」、日本化学会第 96 春季年会 特別企画「有機合成化学を起点とするものづくり戦略」、2016 年 3 月 24 日、同志社大学 (京都府京田辺市)
3. 難波康祐 「Palau'amine の全合成」、有機合成化学協会東海支部 総合講演会、2015 年 12 月 12 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)
4. 難波康祐 「有機合成を基盤とした新規機能性分子の合成研究」、徳島大学大学院医歯薬学研究部 第 12 回 公開シンポジウム、2015 年 11 月 5 日、徳島大学 (徳島県徳島市)
5. 難波康祐 「Palau'amine の全合成～なぜ複雑な天然物を作るのか?～」、プロセス化学東四国フォーラムセミナー、2015 年 10 月 3 日、徳島文理大学 (徳島県徳島市)
6. 難波康祐 「生物活性天然物の実践的合成研究」、愛媛大学大学院特別講演会、2015 年 9 月 28 日、愛媛大学 (愛媛県松山市)
7. 難波康祐 「Palau'amine の全合成」、アスピオファーマ株式会社講演会、2015 年 7 月 6 日 (兵庫県神戸市)
8. 難波康祐 「イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する有機化学的研究」、難波康祐 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 29 日、岡山大学 (岡山県岡山市)
9. 難波康祐 「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」、Osaka City University International Conference、2015 年 3 月 9 日、大阪市立大学理学部 (大阪府大阪市)
10. 難波康祐 「機能解明および実用化を指向した天然有機化合物の実践的合成研究」、慶応義塾大学理工学部講演会、2014 年 12 月 12 日、慶応義塾大学理工学部 (神奈川県横浜市)
11. 難波康祐 「機能解明や実用化を指向した微量天然有機化合物の実践的合成研究」、関西学院大学理工学部講演会、2014 年 11

月 28 日、関西学院大学理工学部(兵庫県三田市)

12. 難波康祐「ムギネ酸およびパラウアミンの合成研究～有機合成の実力向上を目指して～」有機合成化学協会中四国支部第 71 回パネル討論会：天然物合成を通してみる「有機合成の実力」、2014 年 11 月 21 日、愛媛大学工学部(愛知県松山市)
13. 難波康祐「複雑な天然有機化合物の実践的合成研究」、熊本大学大学院特別講義、2014 年 11 月 18 日、熊本大学理学部(熊本県熊本市)
14. 難波康祐「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」, *The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products*, 2014.10.28. Life Science Center(Toyonaka-shi, Osaka, Japan)
15. 難波康祐「生物活性天然物の機能解明を指向した実践的合成研究」、武田薬品工業 CMC 研究センター、2014 年 9 月 16 日、武田薬品工業(大阪府大阪市)
16. 難波康祐「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」Asubio Pharmaceuticals, Inc., 2014 年 9 月 1 日、アスピオファーマ(兵庫県神戸市)
17. 難波康祐「生物活性天然有機化合物の機能解明及び実用化を指向した実践的合成研究」、住友化学株式会社 健康・農業関連事業研究所、2014 年 6 月 13 日、住友化学(兵庫県宝塚市)
18. 難波康祐「イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する有機化学的研究」、理研シンポジウム-有機合成化学を起点とするものづくり戦略、2014 年 6 月 9 日、理化学研究所(埼玉県和光市)
19. 難波康祐「実践的合成研究を基盤とした新規土壌改良素材をよび蛍光素材の開発」、新規素材探索研究会第 13 回セミナー

一、2014 年 6 月 6 日、新横浜フジビューホテル(神奈川県横浜市)

その他、一般発表 48 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 著書：第 12 章 機器分析による分析, 土川博史, 難波康祐, 中尾佳亮, 田中克典, 有機合成実験法ハンドブック 第 2 版, 公益社団法人有機合成化学協会監修, 丸善出版株式会社, 2015, 91-123 (総ページ数 1202)。
2. 第 4 章 Click 反応を利用した小型蛍光分子の合成, 難波康祐, 谷野圭持, ファインケミカルシリーズ「クリックケミストリー-基礎から実用まで-」, 高田十志和, 小山靖人, 深瀬浩一監修, 株式会社シーエムシー出版, 2014, 29-38 (総ページ数 1202)。

〔その他〕

徳島大学薬学部
有機合成薬学分野ホームページ
<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/lab/bot/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

難波 康祐 (NAMBA, Kosuke)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：50414123

(3)連携研究者

村田 佳子 (MURATA, Yoshiko)
公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・主席研究員
研究者番号：60256047