

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590004

研究課題名(和文) 脱水縮合反応を基盤とした薬物標的タンパク質の効率的探索法の開発

研究課題名(英文) Development of Efficient Sensing Method for Targeting Proteins Based on Dehydrocondensing Reactions

研究代表者

国嶋 崇隆 (KUNISHIMA, MUNETAKA)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10214975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：脱水縮合反応を基盤としたモジュール式アフィニティーラベル化法(MoAL法)は、従来のアフィニティーラベル化法の利点を生かしつつ問題点だけを克服した優れた新規タンパク質探索技術であり、今回この技術の実用化に向けた研究を飛躍的に進展させた。本課題では、薬物の標的タンパクに特異的な効率的標識化反応条件の確立と高効率触媒ユニットの開発、極微量のタンパク質を識別する高感度検出法の開発、未知の標的タンパクの探索実験に成功した。

研究成果の概要(英文)：A modular method for affinity labeling (MoAL method), which is based on dehydrocondensing reactions in aqueous solvents and overcomes problems of conventional affinity labeling method, has been developed. In this research project, we succeeded in construction of highly efficient catalyst units for the MoAL method, development of high sensing method for trace amount of proteins, and detection of an unknown protein for some drugs by MoAL method.

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：標識化反応 トリアジン 脱水縮合 アミド 標的タンパク質 タンパク質探索 触媒反応

### 1. 研究開始当初の背景

多くの薬はタンパク質と相互作用することでその効果を発揮するため、薬物が特異的に作用するタンパク質(標的タンパク)を発見・特定することは、その薬理作用機構を解明する上で最も直接的で重要なアプローチであり、新薬開発が一挙に推進されると考えられる。同様に種々の生理活性物質(ホルモンやアミノ酸などの生体低分子、毒物など)の標的タンパクを特定することは、これらの物質の働く分子メカニズムの解明に係る直接的情報として、生命科学の基礎研究や創薬研究に大きく貢献するものと期待される。

これらはポストゲノム時代の重要な研究課題であるが、薬物の中にはタンパク質と可逆的で弱い相互作用しか示さないものが多いため、標的タンパクの探索は一般に困難を極めている。

従来のタンパク質探索技術として二つの代表的な方法が挙げられる。(1)アフィニティークロマトグラフ法(AC法):AC法は薬物を固定化したビーズ(担体)を用いて特異的親和性のあるタンパク質を捕獲する方法である。その適用範囲は、結合した標的タンパクが単離精製過程で解離しないような高い親和性を有する場合に限られる。また、担体への非特異的なタンパク質の吸着が問題となる。(2)アフィニティラベル化法(AL法):AL法では薬物-タンパク質間の複合体において共有結合を介した標識化を行うため、可逆的で弱い親和性のタンパク質でも特定が可能で、AC法より適用範囲の広い優れた方法と云える。しかし、標識化に使われるアフィニティプローブ(Ap)と呼ばれる薬物誘導体の合成設計が格段に難しく、実用面で大きな課題がある。

これまでに研究代表者らは脱水縮合剤DMT-MMを開発し、水中でカルボン酸とアミンからアミドが合成できることを見出し、この反応に基づく、新しいアフィニティラベル化法を開発した(MoAL法)。このラベル化法では、従来のAL法の欠点である複雑なApを、三つの分子に切り離してモジュールとして適宜組み合わせることにより、高い簡便性と応用性を実現した。実例として、第三級アミン触媒を導入したピオチン(リガンド)を用いて親和性のあるアビジン(タンパク質)のカルボン酸(Asp残基)を特異的にアミド化することに成功した。

### 2. 研究の目的

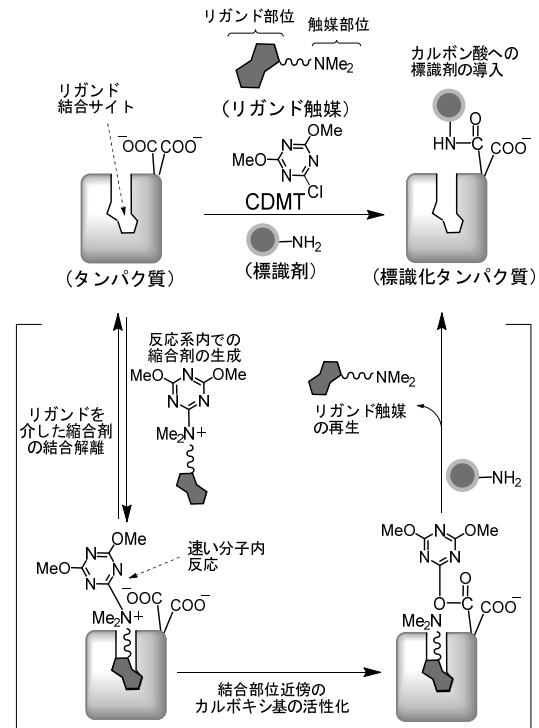
このAL法の利点を生かしつつ問題点だけを克服したMoAL法では、結合することがわかっているアビジン-ピオチン系が用いられ研究された。本研究では、MoAL法を飛躍的に展開させるために、次のような研究を着想するに至った。(1)多様な薬物に適用可能な一般性と、高い反応効率を有するタンパク質標識化法を完成させるとともに、(2)標識化反応を用いて細胞抽出物から標的タン

パク質を探索する技術(検出・同定法)へと展開し、(3)開発した方法を用いて実際に未知タンパクの探索を実施して、技術としての確立を目指す。この技術が確立されれば、現在認可されている医薬品の標的タンパクの網羅的探索が可能になると考えられる。

### 3. 研究の方法

MoAL法は下図に従って進行していると考えられ、これに基づいて計画実施を行った。

触媒的アミド化反応を用いたタンパクの化学修飾  
(モジュール式アフィニティラベル化法: MoAL法)



(1)薬物の標的タンパクに特異的な効率的な標識化反応の確立と高効率の触媒ユニットの開発:未知の微量タンパク質検出には効率的な標識化が必須である。そこで、高い触媒活性を有しリガンドへの導入が容易な触媒部位の開発を行った。また、標識化の対象となるカルボキシ基(Asp、Glu)の存在位置が不明であっても対応可能なように、リガンドからの距離の異なる複数の触媒部位を有するユニットの開発を行った。

(2)極微量のタンパク質を識別する高感度検出法の開発:市販の純品タンパク質とその阻害剤である薬物を利用したモデル系を用いて、蛍光色素による単純な標識化と比べて格段に高感度なウエスタンブロットング法(WB法)を用いた検出方法の開発を行った。次に細胞抽出画分に対して本法を用いて、多数のタンパク質の中から目的とする標的タンパクを検出するための反応条件及び検出条件の最適化を行った。

(3)未知の標的タンパクの探索実験等:開発した方法を用いて実際に医薬品などを用

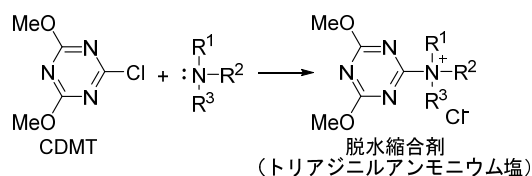
いた未知の標的タンパクの検出を行った。これに成功すれば、以後多様な医薬品の標的タンパクを容易に探索できることになる。

以上3つの研究方法により、新しい標識化法である MoAL 法の飛躍的展開に取り組んだ。

#### 4. 研究成果

(1) 薬物の標的タンパクに特異的な効率的標識化反応の確立と高効率の触媒ユニットの開発

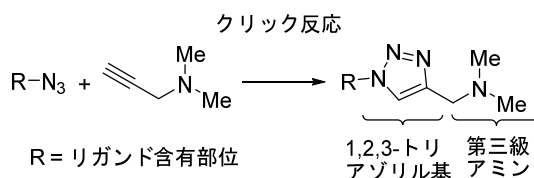
優れた第三級アミン触媒部位の開発：第三級アミン触媒部位が所望の反応性を発現するためには、クロロジメトキシトリアジン (CDMT) と速やかに反応して脱水縮合剤 (トリアジニルアンモニウム塩) を高収率で与えること、得られたトリアジニルアンモニウム塩は水中において安定で、カルボン酸とは特異的に且つ速やかに反応しアミド化反応を起こすこと、が必要不可欠である。



第三級アミン触媒部位は種類によって様々な反応性を示し、CDMT と速やかに反応するものから全く反応しないものまでであるが、この第三級アミンの反応性を決定する物理的、化学的要因についてはこれまで全く解明されていなかった。そこで、詳細な構造活性相関を検討し、高反応性であるために必須な条件について研究を行った。その結果、窒素電子対に対する立体効果すなわち“ゴースアルキル基効果”を提案するに至り、学術論文に発表した。

溶媒や反応基質などの塩基性度がアミド化反応に与える影響：本アミド化反応は、カルボン酸やアミン、触媒の第三級アミン、反応進行とともに生じてくる酸、それを中和するための塩基からなり、複雑な酸塩基平衡のなかで成り立っており、最適な条件の検討を行った。更にこの酸塩基平衡は、溶媒の影響を受けることも明らかとし、学術論文への発表を行った。

1,2,3-トリアゾリル基を導入した第三級アミン触媒の開発：第三級アミンに対して1,2,3-トリアゾリル基を導入すると優れた触媒能を示すことを明らかにした。1,2,3-トリアゾリル基はアジドとアルキンとのクリック反応によって容易に形成できるため、種々のリガンドに対して第三級アミン触媒部位の導入が容易となる。これにより、より簡便な標的タンパク質の探索が可能となる。これらの成果を一編の論文として発表した。



界面特異的に進行する反応：以上の知見に基づいて開発した脱水縮合剤が、一般的な界面活性剤の形成するミセル界面で特異的に反応が進行することを明らかとし、学術論文に発表した。これは脂質の特異的標識化技術のみならず膜タンパクの標識化への展開が期待できる。

トリアジンの電子不足性について：本脱水縮合反応では、トリアジニル基が電子不足性であることを利用している。この電子位不足性について研究を行い、トリアジニルオキシ基やトリアジニルアミノ基が良い脱離基となることを見出し、2編の論文発表を行った。

また、上記研究の中で得られた知見 (トリアジン類の反応性解明、水中脱水縮合反応機構の解明等) から、新しいベンジル化剤の開発を行い、この成果を2編の論文として発表した。この反応剤は MoAL 法とは反応機構が異なる点で本課題から少し外れるものの、生体分子の新しい化学修飾技術としての活用が期待されるので、タンパク標識化への応用も含めて今後新しい方法論・反応剤へと展開を目指す。

我々が独自に開発した MoAL 法のこれまでの研究から、第三級アミン部位を導入したリガンド分子 (リガンド触媒) は厳密な設計を要しないという、実用面から好ましい特徴が示唆されている。そこで、アビジン標識化反応に最適化したリガンド触媒を用い、リガンドが共通であるが標識反応部位となるカルボン酸側鎖 (アスパラギン酸やグルタミン酸) の存在位置が全く異なるストレプトアビジンについて標識化反応を行ったところ、標識化反応が進行することが明らかとなった。この結果は、MoAL 法が未知の標的タンパク質の探索に有用な実用的技術であることを示すもので、既に学会発表を済ませ、現在論文投稿準備中である。

(2) 極微量のタンパク質を識別する高感度検出法の開発

低濃度かつ微量のタンパク質の探索：低濃度かつ微量のタンパク質を探索するために、導入された標識剤を手がかりにして、標的となるタンパク質を検出・同定するための技術開発が必要である。そこで、種々の標識剤を導入したモデルタンパクを用いて酵素抗体法を検討し、ピコグラムレベルでのタンパク質の高感度検出法を確立した。またこの技術を用いて、細胞抽出画分におけるモデル化合物となる薬物標的タンパク質の特異的な標識化とその検出に成功した。その成果に

ついて現在論文執筆中である。

低分子化合物とタンパク質との相互作用の解明：低分子化合物とタンパク質との相互作用の解明は本標識化の高感度検出には必須の課題であり、これらの予備的知見として、蛍光色素 Sulforhodamine 誘導体が血清アルブミンとサイト特異的に結合することを示し、論文発表を行った。

### (3) 未知の標的タンパクの探索実験

上記までの研究成果を基に2次元電気泳動によるタンパク質探索を行い、未知の薬物標的タンパク質の標識化を認めるに至った。現在論文投稿準備中である。

以上のように、期間内にすべての成果を論文発表するには至らなかったものの、脱水縮合反応を基盤としたタンパク質標識化法を大きく展開するに至った。この成果はタンパク質を対象とした生命科学分野に優れた技術となるだけでなく、創薬研究に多大な貢献が期待される。また、本課題から意図しなかった新しい研究が見出され、幅広い研究展開がなされた。

### 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9件)

1. M. Kitamura, F. Kawasaki, K. Ogawa, S. Nakanishi, H. Tanaka, K. Yamada, M. Kunishima, Role of Linkers in Tertiary Amines That Mediate or Catalyze 1,3,5-Triazine-Based Amide-Forming Reactions, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3709–3714, DOI 10.1021/jo500376m, 査読有
2. M. Kitamura, K. Murakami, K. Yamada, K. Kawai, M. Kunishima, Binding of Sulforhodamine B to Human Serum Albumin: A Spectroscopic Study, *Dyes Pigm.* **2013**, *99*, 588–593, DOI 10.1016/j.dyepig.2013.06.011, 査読有
3. M. Kunishima, M. Kitamura, H. Tanaka, I. Nakakura, T. Moriya, K. Hioki, Study of 1,3,5-Triazine-Based Catalytic Amide-Forming Reactions: Effect of Solvents and Basicity of Reactants, *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 882–886, DOI 10.1248/cpb.c13-00368, 査読有
4. K. Yamada, H. Fujita, M. Kitamura, M. Kunishima, A Practical Method for p-Methoxybenzylation of Hydroxy Groups Using 2,4,6-Tris(p-methoxybenzyloxy)-1,3,5-triazine (TriBOT-PM), *Synthesis*, **2013**, 2989–2997, DOI 10.1055/s-0033-1339713, 査読有
5. K. Yamada, K. Masaki, Y. Hagimoto, S. Kamiya, M. Kunishima, A New Method Using 2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine for Facile Elimination of Dimethylamino Group in Eschenmoser's Methylenation for Synthesis of  $\alpha,\beta$ -unsaturated esters, *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, 1758–1760, DOI 10.1016/j.tetlet.2013.01.092, 査読有
6. K. Yamada, H. Fujita, M. Kunishima, A Novel Acid-Catalyzed O-Benzylating Reagent with the Smallest Unit of Imidate Structure, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 5026–5029, DOI 10.1021/ol302222p, 査読有
7. H. Fujita, M. Kunishima, One-Pot Preparation of Oxazol-5(4H)-ones from Amino Acids in Aqueous Solvents, *Chem. Pharm. Bull.* **2012**, *60*, 907–912, DOI 10.1248/cpb.c12-00291, 査読有
8. M. Kunishima, T. Ujigawa, Y. Nagaoka, C. Kawachi, K. Hioki, M. Shiro, Study on 1,3,5-Triazine Chemistry in Dehydrocondensation: Gauche Effect on the Generation of Active Triazinylammonium Species, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15856–15867, DOI 10.1002/chem.201202236, 査読有
9. M. Kunishima, K. Kikuchi, Y. Kawai, K. Hioki, Substrate-Selective Dehydrocondensation at an Interface of Micelles and Emulsions of Common Surfactants, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2080–2083, DOI 10.1002/anie.201107706, 査読有

#### [学会発表](計16件)

1. 加藤大輝、脱水縮合反応を基盤とするタンパク質修飾法(MoAL法)におけるプロープ設計とその評価、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本大学(熊本県)
2. 軽尾友紀子、ベンジルイミダートを經由するアミド結合切断反応の開発、第39回反応と合成の進歩シンポジウム、2013年11月5日、九州大学医学部百年講堂(福岡県)
3. 藤田光、酸触媒トリアジン型パラメトキシベンジル化剤(TriBOT-PM)の開発、第43回複素環化学討論会、2013年10月17日、長良川国際会議場(岐阜県)
4. 山田耕平、イミダートの最小単位のみで構成される酸触媒アリアルメチル化剤の開発、日本プロセス化学会2013サマーシンポジウム、2013年7月18日、つくば国際会議場(茨城県)
5. Hikaru Fujita, A new acid-catalyzed benzylating reagent with the smallest unit of imidate structure: TriBOT, 14th Tetrahedron Symposium, 2013.6.26, Hilton Vienna (Vienna, Austria)
6. 国嶋崇隆、古い化合物の新しい化学～

- 1,3,5-トリアジンを基軸とする反応の開拓～、化学千一夜2013「明日の化学への夢を語ろう」(招待講演) 2013年6月7日、参天製薬(株)能登工場(石川県)
7. 国嶋崇隆、カルボキシ基を標的とする生体分子の化学修飾、Endo-M 研究会(招待講演) 2013年5月17日、金沢勤労者プラザ(石川県)
  8. 木野徹平、血清アルブミンに対する薬物の結合を簡便に検出するセンサーの開発、日本薬学会第133年会、2013年3月30日、パフィニコ横浜(神奈川県)
  9. Kazuma Iwahara, Preparation of Hydrogel Particles by a *in situ* Generated Condensing Agent, The Twelfth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC12), 2012.11.15, Rihga Royal Hotel Kyoto (Kyoto)
  10. 藤田光、究極的に簡素化されたイミダート等価構造を持つ新規ベンジル化剤: TriBOT、第38回反応と合成の進歩シンポジウム、2012年11月6日、タワーホール船堀(東京都)
  11. 正木一将、プロトン性溶媒中でのエナンチオ選択的アミド化触媒の開発、第38回反応と合成の進歩シンポジウム、2012年11月6日、タワーホール船堀(東京都)
  12. 国嶋崇隆、トリアジンの特性を利用した新反応剤の開発、日本プロセス化学会2012サマーシンポジウム(招待講演) 2012年7月19日、京都テルサ(京都府)
  13. S. Nakanishi, Specific Labeling of Avidin and Streptavidin by Modular Method for Affinity Labeling, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011.12.1, Keio Plaza Hotel Tokyo (Tokyo)
  14. K. Yamada, Labeling Study of Cyclooxygenase-1 (COX-1) by Modular Method for Affinity Labeling (MoAL), 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011.11.30, Keio Plaza Hotel Tokyo (Tokyo)
  15. 国嶋崇隆、脱水縮合反応を利用したシクロオキシゲナーゼの特異的標識化反応、第37回反応と合成の進歩シンポジウム、2011年11月7日、あわぎんホール(徳島県)
  16. 国嶋崇隆、カルボキシル基を標的とする生体分子の有機化学、日本薬学会九州支部主催 特別講演会(招待講演) 2011年6月6日、長崎大学(長崎県)

〔図書〕(計1件)

1. M. Kitamura, M. Kunishima, John Wiley & Sons, Ltd, e-EROS (Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis)

4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, 2013, 5 pages.

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

1. 名称: N型糖タンパク質の製造方法  
発明者: 国嶋崇隆、山田耕平  
権利者: 金沢大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-026997  
出願年月日: 25年2月14日  
国内外の別: 国内
2. 名称: 不斉脱水縮合剤  
発明者: 国嶋崇隆、北村正典、山田耕平、正木一将  
権利者: 金沢大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-227249  
出願年月日: 24年10月12日  
国内外の別: 国内
3. 名称: 薬物と高分子化合物相互作用確認用試薬及び相互作用の検査  
発明者: 国嶋崇隆、山田耕平、木野徹平  
権利者: 金沢大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-27242  
出願年月日: 24年2月10日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bioorg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国嶋 崇隆 (KUNISHIMA, Munetaka)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号: 10214975

(2) 研究分担者

山田 耕平 (YAMADA, Kohei)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号: 40583232

(3) 連携研究者

該当者なし