

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17930

研究課題名(和文) 2段階発光機能を搭載したアフィニティープローブの提案

研究課題名(英文) Design of a novel affinity labeling probe exhibiting fluorescence and luminescence

研究代表者

山口 卓男 (Yamaguchi, Takao)

大阪大学・薬学研究科・講師

研究者番号：80596601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生物活性化合物の作用メカニズムを理解する上で、標的タンパク質の同定が必要不可欠である。本研究課題では、生物活性化合物の標的タンパク質を高選択的にラベル化し、同定する技術の開発に取り組んできた。当初計画において、アジドフタルイミドを基盤とした新規のプローブ分子を提案し、検討の結果、期待通りの光反応性と発蛍光性を見出した。本プローブ分子設計により、大過剰の非標的タンパク質存在下において、標的タンパク質のみを特異的に蛍光ラベル化し、同定することに成功した。加えて、質量分析によりラベル化部位を特定することで、リガンド結合サイトの推定にも本手法が利用できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of bioactive small molecules, target protein identification methods are highly important. In this project, a novel affinity labeling probe having azidophthalimide structure was designed. By several model experiments, we revealed that the designed probe is suitable for selective fluorescent labeling of the target protein. Furthermore, the ligand-binding site was successfully determined by this method. We also successfully designed and synthesized several bioactive small molecules.

研究分野：有機合成化学、生物有機化学、ケミカルバイオロジー、創薬化学

キーワード：アフィニティーラベル化 標的タンパク質同定 発蛍光プローブ分子 創薬化学

1. 研究開始当初の背景

表現型スクリーニング等によって得られた生物活性化合物の作用メカニズムを理解し、創薬へと繋げていく上で、標的タンパク質の同定が必要不可欠である。しかしながら、標的タンパク質を簡便かつ高精度に同定することは未だ困難であり、優れた標的タンパク質同定法の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

上記背景から、我々は「小さなタグ」を生物活性化合物に1つ付けるだけの簡便性に優れた標的タンパク質同定法を提案してきた。このようなプローブ分子設計により、標的タンパク質を高選択的に（蛍光）ラベル化し、同定することができるか、検証を目的に研究を実施した。

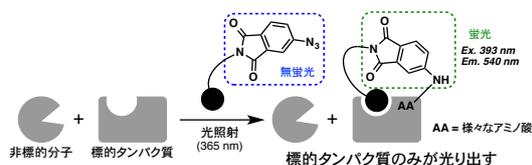
3. 研究の方法

既存の生物活性化合物と標的タンパク質の組み合わせをモデルとし、検証実験を行った。具体的には、炭酸脱水酵素のリガンドであるベンゼンスルホンアミド誘導体に設計した「小さなタグ（アジドフタルイミドタグ）」を結合させ、大過剰の非標的タンパク質存在下において標的タンパク質である炭酸脱水酵素のみが特異的に蛍光ラベル化されるか評価した。加えて、複数の生物活性化合物と標的タンパク質の組み合わせで、同定精度の検証を行った。また、アジドフタルイミドタグ以外にジクロロマレイミドタグを新たに設計し、評価を行った。関連して、生物活性化合物の合成と活性評価も実施した。

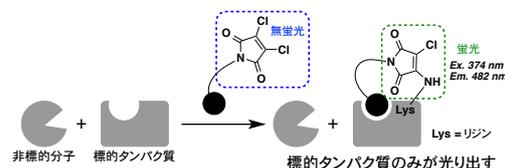
4. 研究成果

当初計画において設計していたアジドフタルイミドタグの光反応性および発蛍光性を評価した結果、期待通りの性質を有することが確認できた。そこで、生物活性化合物にアジドフタルイミドタグを結合させ、緩衝液中で標的タンパク質の蛍光ラベル化が進行するか確認したところ、予想以上の効率で標的タンパク質のラベル化が進行することが明らかになった。非標的タンパク質を大過剰加えた系においても、標的タンパク質への選択的な蛍光ラベル化が確認でき、アジドフタルイミドタグを用いる本手法が標的タンパク質同定法として優れていることが証明された。さらに、細胞系においても標的タンパク質の選択的な蛍光ラベル化に成功した。通常の標的タンパク質同定法では、細胞破砕物から標的タンパク質を同定することになるが、本手法では生きた細胞内で標的タンパク質をそのまま特異的に捕らえることができる。よって、生物活性化合物が細胞内で作用する標的タンパク質を適切に同定できる優

れた手法と言える。また、質量分析による解析では、生物活性化合物の結合サイトの近傍で選択的にラベル化反応が進行していることが明らかになった。本結果から、リガンド結合サイトの特定においても本手法が有用であることが示された。



アジドフタルイミドタグに加え、さらに小型のタグとしてジクロロマレイミドタグを設計し、同様に評価を実施した。本タグに関しては、選択性に課題が残るものの、標的タンパク質の蛍光ラベル化が良好に進行することが確認できた。



周辺の生物活性化合物として、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) のリガンドを創出した他、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) など脂肪酸合成に関わる酵素の阻害剤開発にも同時に成功した。

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 11 件)

1. Kosuke Chiba, Miwako Asanuma, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Takao Yamaguchi, Specific Fluorescence Labeling of Target Proteins by Using a Ligand-4-Azidophthalimide Conjugate, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 8751–8754. (査読有) DOI: 10.1039/C7CC03252H
2. Kosuke Chiba, Yuichi Hashimoto, Takao Yamaguchi, Affinity Labeling with 4-Azidophthalimide (AzPI): Relation between Labeling Rate and Fluorescence Intensity, *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, 65, 994–996. (査読有) DOI: 10.1248/cpb.c17-00546
3. Ryuta Shioi, Shogo Okazaki, Tomomi Noguchi-Yachide, Minoru Ishikawa, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Takao

- Yamaguchi, Switching subtype-selectivity: Fragment replacement strategy affords novel class of peroxisome proliferator-activated receptor α/δ (PPAR α/δ) dual agonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3131–3134. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.05.037
4. Minoru Ishikawa, Takuya Ohzono, Takao Yamaguchi, Yasuo Norikane, Photo-enhanced Aqueous Solubilization of an Azo-compound, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6909. (査読有) DOI: 10.1038/s41598-017-06947-w
 5. Seika Amemiya, Takao Yamaguchi, Yuichi Hashimoto, Tomomi Noguchi-Yachide, Synthesis and evaluation of novel dual BRD4/HDAC inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3677–3684. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmc.2017.04.043
 6. Seika Amemiya, Takao Yamaguchi, Yuichi Hashimoto, Tomomi Noguchi-Yachide, Development of N^6 -(Heteroarylcarbonyl)adenines as BRD4 Inhibitors, *Heterocycles* **2017**, *94*, 1107–1114. (査読有) DOI: 10.3987/COM-17-13667
 7. Shogo Okazaki, Taki Sakai, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Takao Yamaguchi, Structural Development Studies of Pyrazoloketone-Derived Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors, *Heterocycles* **2017**, *95*, 595–607. (査読有) DOI: 10.3987/COM-16-S(S)30
 8. Kosuke Chiba, Yuichi Hashimoto, Takao Yamaguchi, Dichloromaleimide (diCMI): A Small and Fluorogenic Reactive Group for Use in Affinity Labeling, *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 1647–1653. (査読有) DOI: 10.1248/cpb.c16-00501
 9. Shogo Okazaki, Ryuta Shioi, Tomomi Noguchi-Yachide, Minoru Ishikawa, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Takao Yamaguchi, Structure-activity relationship studies of non-carboxylic acid peroxisome proliferator-activated receptor α/δ (PPAR α/δ) dual agonists, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 5455–5461. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmc.2016.08.067
 10. Shogo Okazaki, Tomomi Noguchi-Yachide, Taki Sakai, Minoru Ishikawa, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Takao Yamaguchi, Discovery of N -(1-(3-(4-phenoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)ethyl)acetamides as novel acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC2) inhibitors with peroxisome proliferator-activated receptor α/δ (PPAR α/δ) dual agonistic activity, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 5258–5269. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmc.2016.08.045
 11. Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika, Synthesis of scpBNA- ^{13}C , -A and -G Monomers and Evaluation of the Binding Affinities of scpBNA-Modified Oligonucleotides toward Complementary ssRNA and ssDNA, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 11000–11008. (査読有) DOI: 10.1021/acs.joc.6b02036
- [学会発表] (計 7 件)
1. 櫻井耀太、堀場昌彦、山口卓男、小比賀聡、5位に水酸基を有する 2'-O-メチルシチジン誘導体の合成、日本薬学会 第 138 回年会、2018 年 3 月 25～28 日
 2. 堀江直宏、山口卓男、小比賀聡、各種置換基を導入したグアニジン架橋型人工核酸の合成、日本化学会 第 98 春季年会、2018 年 3 月 20～23 日
 3. 岡田佳那、山口卓男、どど孝介、袖岡幹子、小比賀聡、エステラーゼ活性評価のための蛍光 turn-ON 型プローブ分子の創製、第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017 年 10 月 14 日
 4. 境太希、岡崎翔吾、石川稔、橋本祐一、山口卓男、標的タンパク質のリン酸化を選択的に誘導する分子の創製、日本薬学会 第 137 回年会、2017 年 3 月 24～27 日
 5. 千葉幸介、橋本祐一、山口卓男、アジドフタルイミドを用いる新規標的タンパク質同定法の創出、第 60 回 日本薬学会関東支部大会、2016 年 9 月 17 日
 6. 山口卓男、岡崎翔吾、境太希、谷内出友美、石川稔、橋本祐一、PPAR α/δ デュアル転写誘導活性を有する新規 ACC2 阻害剤の創出、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、2016 年 6 月 15～17 日
 7. 千葉幸介、橋本祐一、山口卓男、アジドフタルイミドを用いた発蛍光型光アフィニティーラベル化法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、2016 年 6 月 15～17 日
- [図書] (計 0 件)
- 無し

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

無し

○取得状況（計 0 件）

無し

〔その他〕

ホームページ等

研究室（大阪大学大学院薬学研究科、生物有機化学分野）のホームページ

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b007/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口卓男（YAMAGUCHI, Takao）
大阪大学大学院薬学研究科・講師
研究者番号：80596601

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し