

平成21年 5月 13日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790090  
 研究課題名（和文） 新たな機構に基づく環境応答型蛍光団の開発とリガンド分子の蛍光ラベル化への応用  
 研究課題名（英文） Development of novel environment sensitive fluorescent sensor and its application as labeling reagents for various ligand molecules  
 研究代表者  
 平野 智也（HIRANO TOMOYA）  
 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学研究所・助教  
 研究者番号：20396980

研究成果の概要：生体内の特定の蛋白質に選択的に結合するリガンド分子に蛍光を発する分子団を結合させた蛍光ラベル化リガンドは、標的蛋白質の生理機能解析や、薬のリードとなる化合物の探索に有用な機能性分子です。本研究では、こうした蛍光ラベル化リガンドを開発するために用いる蛍光ラベル化剤の開発を行いました。開発されたラベル化剤は、結合前後で蛍光強度が変化する等の有用性を持っており、様々な応用が可能であることを明らかにしました。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：生物有機化学、ケミカルバイオロジー  
 科研費の分科・細目：薬学・創薬化学  
 キーワード：蛍光、分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の特定の受容体に選択的に結合する小分子、いわゆるリガンド分子を蛍光団でラベル化した化合物は蛍光ラベル化リガンドと呼ばれ、ターゲットとなる受容体蛋白質の局在を明らかにすることや、未知の受容体を同定するために有用な機能性分子である。これまでに開発されたほとんどの蛍光ラベル化リガンド分子は、リガンド分子にある程度の長さのリンカーを経由して蛍光団を結合させた構造であることが多い。こうした分子は、受容体に結合前後で蛍光特性に変化が起こりにくい為、受容体に結合したリガンド分子の持つ蛍光のみを検出

したいときには非結合のリガンドを洗浄等の操作で分離する必要がある。これに対して、蛍光団を短いリンカーを介して結合させた化合物は、受容体蛋白質への結合後に結合部位近辺のアミノ酸側鎖などにより蛍光団の外部環境が変化するため、それに対応した蛍光特性の変化を起こすことができる。しかし、立体的に大きな構造の蛍光団をリガンド分子にラベル化してしまうと、受容体蛋白質に対する結合に影響を与えるため、用いることができる蛍光団の種類には限りがあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、前項で述べた従来の蛍光ラベル化リガンドの問題点をクリアした、受容体蛋白質との結合前後で蛍光特性が変化する機能を持った蛍光ラベル化リガンドの開発を目指した。そのような機能を持つためには、ラベルに用いる蛍光団が外部環境の変化に対して蛍光特性が大きく変化する機能を持つ、「環境応答型蛍光団」である必要がある。本研究では、蛍光物質の会合現象と呼ばれる軌道間相互作用の制御に基づく、新規環境応答型蛍光団の開発を行い、リガンド分子の蛍光ラベル化への応用を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究で開発を行う、蛍光物質の会合現象の制御に基づく環境応答型蛍光団の作業仮説を述べる。蛍光物質は基本的に疎水性の高い構造であるため、水溶液中では他の疎水性の高い化合物（以後、消光団と呼ぶ）と疎水性相互作用により会合しやすく、会合した蛍光物質の蛍光は消光することが多い。こうした会合による消光は、ある程度疎水的な環境下におかれると解消され、再び蛍光強度が増大する。我々は、こうした性質が環境応答型蛍光団に利用できると考え、蛍光物質、消光団、それらをつなぐリンカー構造を種々選択し、組み合わせた化合物を種々合成することとした。合成した化合物が環境応答型蛍光団として機能するかを、(1) 溶媒の極性を変化させたときの蛍光強度の変化、(2) 消光物質を包摂する化合物を添加したときの蛍光の変化、という二つの指標によって判断し、評価を行う。望みの環境応答能を持つ蛍光団の開発に成功したら、リガンド分子のラベル化のための官能基を導入し、蛍光ラベル化剤として様々な応用研究を行う。

## 4. 研究成果

環境応答型蛍光団の部分構造を担う、種々の蛍光物質、消光物質、リンカー構造の各々を組み合わせた化合物を合成し、その蛍光特性を検討した。その結果、蛍光物質として Cy7、消光物質として Dabcyl を用いた化合物が、水中ではほとんど蛍光を持たないが、メタノール、アセトニトリルと溶媒の極性が低下していくのにもない、蛍光強度が大きく増大し、最も環境に対する蛍光応答が大きいことを見出した（図1、図2）。

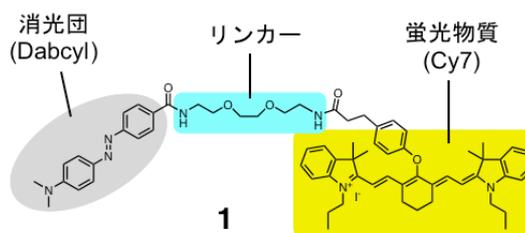


図1 本研究で開発に成功した環境応答型蛍光団1の構造

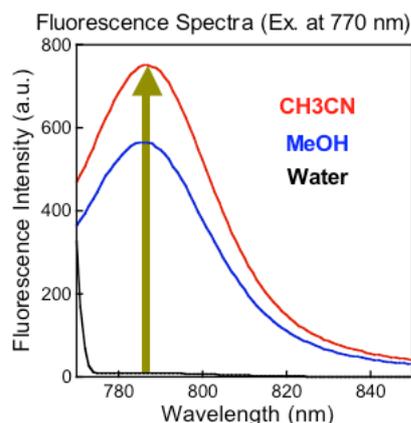


図2 化合物1の水中、メタノール中、アセトニトリル中での蛍光スペクトル

また、この2つを結ぶリンカー構造の長さ及び構成元素により、蛍光団の性質に差が生じることも明らかとした。続いて、開発した蛍光団をリガンド分子のラベル化へと適用するために、活性エステルであるスクシミジルエステル基を導入し、新規蛍光ラベル化剤2の開発を行った（図3）。

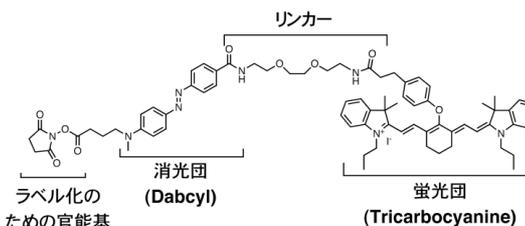


図3 本研究で開発に成功した蛍光ラベル化剤2の構造

化合物2は現在、エストロゲン等の核内受容体リガンド分子を始めとする、様々な分子のラベル化に適用している。

また蛍光ラベル化リガンドのもととなる、新規リガンド分子の開発も行った。甲状腺ホルモン受容体アンタゴニストおよび、ヒストンメチル化酵素の阻害剤の開発はこうした研究の一環であり、従来の化合物よりも高活性の化合物の開発に成功している。

さらに、蛍光ラベル化リガンドを開発するための別の方法論として、化合物ライブラリーの構築も有効であると考え、クマリン骨格をベースとした6-アリルクマリンライブラリーの構築にも成功した。これらの研究成果を組み合わせることによって、薬のリード化合物を探索するスクリーニング系の構築など、産業界にも貢献する成果が生み出されると考えている。

また、こうした成果は、海外の雑誌に論文として掲載され、3件の特許を出願するに至った。

#### 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4件)

- (1) Hirano, T., Osaki, T., Fujii, S., Komatsu, D., Azumaya, I., Tanatani, A. and Kagechika H. "Fluorescent Visualization of the Conformational Change of Aromatic Amide or Urea Induced by *N*-methylation." *Tetrahedron Lett.* **50**, 488–491 (2009) 査読有り
- (2) 平野智也、影近弘之、「ライブラリー構築をもとにした蛍光センサーの開発」、東京医科歯科大学生体材料工学研究所年報第41巻、58–61 (2007) 査読無し
- (3) Hirano, T., Hiromoto, K. and Kagechika, H. "Development of a Library of 6-Arylcoumarins as Candidate Fluorescent Sensors." *Org. Lett.* **9**, 1315–1318 (2007) 査読有り
- (4) Komatsu, T., Hirano, T., Songkram, C., Kawachi, E. and Kagechika, H. "Novel Thyroid Hormone Receptor Antagonists with an *N*-alkylated Diphenylamine Skeleton." *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 3115–3126 (2007) 査読有り

[学会発表] (計31件、主要なもののみを記入)

- (1) 平野智也「蛍光センサー開発を志向した芳香族アミド、ウレア立体構造変化の可視化」、日本化学会第89春季年会、2009年3月、千葉
- (2) 秋山淳「近赤外光で励起可能な環境応答型蛍光団の開発と蛍光ラベル化リガンドへの応用」日本薬学会第129年会、2009年3月、京都
- (3) 久保晴子「オルトジアルデヒド基を持つ蛍光性ATP誘導体の開発と応用」、第34回反応と合成の進歩シンポジウム、2008年11月、京都
- (4) 久保晴子「リン酸化酵素－基質間関係の解析を可能とする新規蛍光性ATP誘導

体の開発」、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008年9月、東京

- (5) 秋山淳「近赤外光で励起可能な新規環境応答型蛍光センサーの開発」、日本分析化学会第57年会、2008年9月、福岡
- (6) Hirano, T. "Development of novel inhibitors of histone methyltransferase" 236th ACS National Meeting, August 2008, Philadelphia, PA, USA.
- (7) 平野智也、星野健太、田中裕二郎、岩浪直子、影近弘之、「ヒストンメチル化酵素阻害剤の創製研究」、日本ケミカルバイオロジー研究会 第3回年会、2008年5月、東京
- (8) 平野智也、小出亜希子、岩下真純、影近弘之、「リン酸化酵素基質の同定を可能とする新規蛍光性ATP誘導体の開発」、日本化学会第88春季年会、2008年3月、東京
- (9) 秋山淳「近赤外光で励起可能な環境応答型蛍光センサーの開発」、日本薬学会第128年会、2008年3月、横浜
- (10) 久保晴子「クマリンを基本骨格とするAND型蛍光センサーの開発」、日本薬学会第128年会、2008年3月、横浜
- (11) 平野智也「チアゾリジンジオン骨格を有するTRアンタゴニストの開発」、日本レチノイド研究会第18回学術集会、2007年11月、東京
- (12) 平野智也「蛍光センサー開発を志向した、クマリンライブラリーの構築」、日本分析化学会第56年会、2007年9月、徳島
- (13) Hirano, T. "Construction of Coumarin Library for the Development of Fluorescent Sensors." Gordon Research Conference, Chemical Sensors & Interfacial Design, July 2007, Newport, RI, USA.
- (14) 平野智也「ジフェニルアミン骨格を有するTRアンタゴニストの開発」、日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会、2007年5月、京都

[図書] (計2件)

- (1) 平野智也「あらゆるリン酸化酵素の選択的阻害を可能とする実験系」蛋白質核酸酵素 (10月号増刊「ケミカルバイオロジー」) **52**, 1802-1803 (2007).
- (2) McMurry, J. and Begley, T.著、長野哲雄監訳、浦野泰照、小島宏建、鈴木紀行、平野智也訳「マクマリー 生化学反応機構－ケミカルバイオロジー理解のために－」東京化学同人 (2007) 総ページ数441.

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称：フェノール誘導体及びその医薬用途

発明者：影近弘之、平野智也、最上知子  
権利者：東京医科歯科大学  
種類：  
番号：特願2007-051655、特許公開2008-214222  
出願年月日：2007. 3. 1  
国内外の別：国内

名称：クマリン誘導体及びその用途  
発明者：影近弘之、平野智也  
権利者：東京医科歯科大学  
種類：  
番号：特願2007-043878、特許公開2008-208039  
出願年月日：2007. 2. 23  
国内外の別：国内

名称：甲状腺ホルモン受容体アンタゴニスト及び医薬  
発明者：影近弘之、平野智也  
権利者：東京医科歯科大学  
種類：  
番号：特願2007-027929、特許公開2008-189620  
出願年月日：2007. 2. 7  
国内外の別：国内

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
平野 智也（東京医科歯科大学・院疾患  
生命・助教）  
研究者番号：20396980