

平成 22 年 3 月 11 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890081
 研究課題名（和文） 簡便なアフィニティーラベル化法の確立とフラボノイド標的タンパク質同定への展開
 研究課題名（英文） Establishment of new affinity label method and reveal of target proteins of flavonoids
 研究代表者
 盛崎 大貴（MORISAKI DAIKI）
 金沢大学・薬学系・助教
 研究者番号：30462740

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) を用いた新規アフィニティーラベル法を確立し、フラボノイドの一種でアポトーシス抑制作用を有するオウゴンンの標的タンパク質を同定することである。
 まずは、オウゴンンの構造にジメチルアミノ基を導入したプローブの設計、合成を試みた。幾つかのルートで試みたが残念ながら目的物を合成することはできなかった。今後はより合成しやすいプローブの設計を行う必要がある。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is two of the following. 1) Establishment of new affinity label method using 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT). 2) To determine target proteins of Wogonin, a kind of alkaloids, which has apoptosis suppression activity using the new label method.
 I tried to design and synthesis compose a Wogonin prove which had tertially amino group. However, I could not compose the prove.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,450,000	435,000	1,885,000
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：ケミカルバイオロジー、アフィニティーラベル

1. 研究開始当初の背景

様々な生理活性化合物の標的タンパク質を同

定することは、生体内における未知の情報伝達経路を解明する手がかりになり、新薬開発

へのブレイクスルーが期待できる。膜タンパク質は生体内の情報伝達に深く関わっているが、活性を保ったまま単離することは難しい。そのため、膜タンパク質を同定する場合はプローブによりタンパク質を化学的にラベル化する AL 法が用いられており、中でも光 AL 法が一般的である。しかし、光 AL 法では次のような問題がある。

1. プローブ内にリガンド、光反応部位、標識部位を導入する必要があり分子設計が複雑
2. 光反応部位は合成を遮光条件下で行う必要があり操作が煩雑
3. 標識剤を検討する際、それぞれプローブを合成する必要があり標識剤の検討が困難

申請者の所属する研究室の国嶋はこれらの問題をすべて解決する全く新しい方法として、2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) を用いた水溶液中での脱水縮合反応を応用した簡便性の高い AL 法の開発を行ってきた¹。この AL 法では 3 級アミノ基を導入した生理活性物質をリガンドとして使用することでその標的タンパク質を蛍光ラベルできる。これまでの研究において、ビオチンプローブを用いることでその結合タンパク質であるアビジンを選択的にラベル化できることなどが分かっている。

この CDMT を用いた AL 法 (convenient AL 法 ; CAL 法) のメリットは以下の通りである。

1. リガンドに 3 級アミンを導入するだけのため分子設計が簡単である。
2. 合成時遮光が必要ない。
3. 標識剤はプローブとは別の分子として系内に加えるだけなので検討が容易である。ただこの方法で実際に未知の標的タンパク質を同定した例はない。

ところで、フラボノイドの一種オウゴンには生薬オウゴンの成分であり、抗ガン活性があることが知られている。ところが最近 Lee らによりオウゴンが抗ガン剤による正常細胞のアポ

トーシスを抑制することが報告された²。つまりオウゴンはガン細胞には細胞毒性を示しアポトーシスを導くが、正常細胞ではアポトーシスを抑制し抗ガン剤の副作用を抑制する。

このオウゴンによる正常細胞のアポトーシス抑制作用は細胞膜上に存在している何らかのタンパク質が関与していることが示唆されているがその詳細は全く不明である。そこで CAL 法を用いてオウゴンのアポトーシス抑制作用に関わるタンパク質を明らかにすることを目指し研究を行うこととした。

1) M. Kunishima *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10760-10761.

2) E. Lee, *et al.* *Journal of Pharmacological Sciences* **2007**, *104*, 355-365

2. 研究の目的

本研究で目指すのは以下のことである。

1. オウゴン及び、関連フラボノイドをリガンドとするプローブの合成設計
2. 合成したプローブによるアポトーシス抑制シグナルの解析
3. CAL 法による標的タンパク質同定法の確立
4. 結合部位の特定とそれに基づくタンパク質-リガンド相互作用の分子レベルでの解明

これまでの知見から正常細胞にはアポトーシス経路を抑制するタンパク質が存在すると推定できる。この標的タンパク質を明らかにすることができれば、他の抗ガン剤の副作用を抑制し、なおかつガン細胞には毒性を示す画期的な抗ガン薬の開発へとつながると期待できる。また通常難しいとされる膜タンパク質でのタンパク質-リガンド相互作用

の分子レベルでの解明も可能になると考えている。そして、本研究において CAL 法を確立しその有用性を示すことができれば今後の標的タンパク質の同定が飛躍的に進展する。

本研究の特徴は標的分子をラベルするのに CDMT を用いた方法を用いていることである。これによりプローブとして用いるリガンドの構造が簡単なものになりプローブの検討が容易になる。実際の操作も細胞にプローブ、CDMT、蛍光試薬を加えるだけという非常に簡便なものである。本研究により CDMT を用いた AL 法の有用性を示せば今後膜タンパク質のさまざまな研究に有用であると期待できる。

3. 研究の方法

当初予定していた研究の計画は以下のとおりである。

① オウゴニンプローブの設計および合成
オウゴニンに CDMT と反応し縮合剤として働くための 3 級アミン部位を導入したプローブを設計する。プローブの検討は次の 3 点に注目して行う。

i) リガンド部位の設計

3 級アミンの導入部位に関しては、これまでに分かっているオウゴニン誘導体の構造活性相関から設計する。フェニル基及び、クロマノン骨格にリンカーを導入したプローブを合成する。オウゴニンの全合成はすでに報告されているのでそれを参考にしたルートで合成する³。

ii) リンカーの検討

3 級アミンとリガンドを結ぶリンカーについて検討する。リンカーの長さによりラベル化されるアミノ酸残基が異なることが予想され、この違いから標的タンパク質の構造に関する知見が得られる。そのためリンカーの長さは本研究において重要であり長さの異なる複数のプローブを合成する。次にリンカーの種類異なるプローブを合成し、その影響を明らかにする。現在

想定しているのは次のリンカーである。

メチレン鎖……合成が容易、ただし脂溶性が高く膜との好ましくない相互作用が予想される。

オリゴエチレングリコール……親水性が高いが合成はやや煩雑になる。

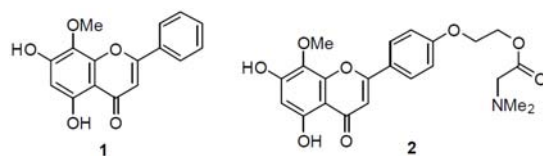
iii) 3 級アミンの検討

3 級アミンに関しては数種類のプローブを合成する。プローブにはオウゴニンと同等のアポトーシス抑制活性が求められる。そのためまず合成したプローブの活性を測定し、高い活性を示したものをプローブとして使用する。オウゴニンをリガンドとしたとき目的のプローブを開発することができなかった場合はオウゴニン関連の他のフラボノイドを使用する。

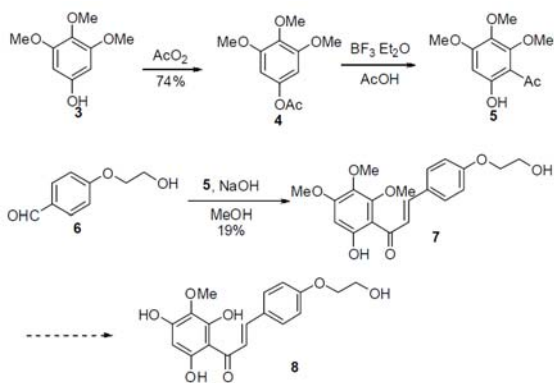
3) A. R. Ree *et al.* *Chem. Pharm. Bull.* 2003, 51(3), 339-340.

4. 研究成果

まずはオウゴニン (1) のフェニル基の 4 位に 3 級アミンを有するプローブ (2) を設計した。3 級アミンとしては以前の実験で良好な結果を与えていた N,N-ジメチルグリシンを導入することとした。

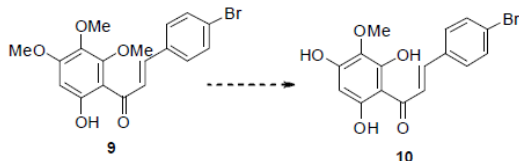


このリガンドを合成するに当たりまずはフェニル基の 4 位にヒドロキシエトキシ基を有するオウゴニン誘導体 (3) を合成することにした。そのルートをいかに示す (Scheme 1)。



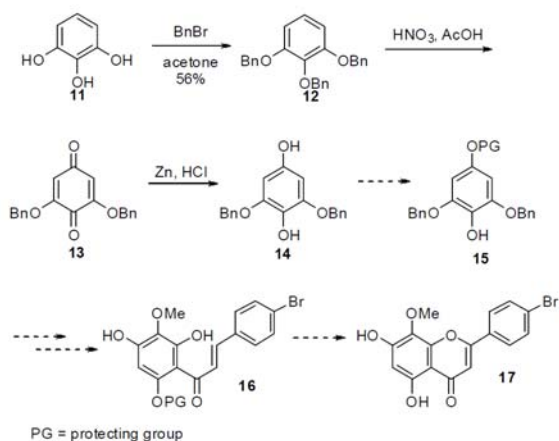
Scheme 1

市販の化合物 **3** の水酸基をアセチル化した化合物 **4** をルイス酸で処理することにより化合物 **5** を得た。この **5** とアルデヒド **6** を塩基条件下アルドール反応に付すことにより **7** を得た。**7** の三つのメトキシ基のうち二つを選択的に脱メチル化するため種々の条件を検討したが目的の **8** は得られなかった。**7** のヒドロキシエトキシ基をブロモ基に替えた化合物 **9** を合成し同様の反応を試みたが目的の **10** を得ることはできなかった (Scheme2)。



Scheme 2

そこで別のルートを試みた。(Scheme 3)



Scheme 3

ピロガロール **11** の水酸基をベンジル化して得た **12** を酸化しキノン **13** を得た。この **13** を

還元したジヒドロキノン **14** の一方の水酸基だけを保護した **15** を経て目的のプローブを合成できると考えた各種保護基を検討したが目的物を得ることはできなかった。

以上のようにオウゴンプローブを合成できなかったため当初の予定していた実験を行うことはできなかった。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盛崎 大貴 (MORISAKI DAIKI)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号：30462740

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし