

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710229

研究課題名（和文） フッ素を利用した光親和性プローブの開発と応用

研究課題名（英文） Development and application of fluorine-based photoaffinity probe

研究代表者

紙透 伸治（KAMISUKI SHINJI）

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：30553846

研究成果の概要（和文）：

本研究ではインドールの4位をフッ素で置換した4-フルオロインドールを用いた光親和性標識の手法を開発した。ビオチン化4-フルオロトリプトファンと Neutravidin を用いたモデル実験により、本手法により光親和性標識されたタンパク質の検出が可能であることが明らかになった。本研究はペプチドリガンドの受容体決定などに応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have demonstrated development of novel photoaffinity labeling, in which 4-fluoroindole was utilized as a photoreactive group. Model study revealed that Neutravidin photolabeled with biotinylated 4-fluorotryptophan could be detected. This method is expected to be applied for identification of receptor proteins for peptide ligand.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生体分子科学・生物分子化学

キーワード：光親和性標識、標的タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

光親和性標識は、生理活性物質（リガンド）が直接作用している標的分子の同定やその結合部位を決定する手法として数多く用いられてきた。この手法ではリガンドに光反応基を導入した光親和性プローブを作製する。光反応基は紫外線を照射することにより、カルベン等の活性種を生じる。これらの活性種は非常に反応性が高く、隣接する分子に共有

結合することができる。このためリガンドが相互作用する標的分子を標識することが可能である。

光反応基としてはアリアルアジド、ジアジリン、ベンゾフェノンなどが挙げられるがこれらは比較的大きい。このような大きな官能基はリガンドと標的分子の相互作用を妨げる可能性があり、実際リガンドの生理活性が下がるケースが多く見受けられる。また、光

反応基自体が様々な分子と相互作用する可能性があり、リガンドの真の標的分子と区別することが困難なケースもある。

## 2. 研究の目的

インドールはペプチドやタンパク質を構成するアミノ酸であるトリプトファンに含まれ、多くの生理活性物質に含まれる構造である。インドールの4位をフッ素化した4-フルオロインドールは、光を照射することにより隣接する分子と共有結合を形成させることができる(*J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8060)。そこで本研究では、生理活性物質の標的分子を同定するための手法として、4-フルオロインドールを用いた新規光親和性プローブの開発を目的とする。フッ素は小さい元素であるため、「native」な光親和性プローブを作成することが可能であると期待される。

インドール骨格はアミノ酸であるトリプトファンにも存在する。このため、トリプトファン残基を4-フルオロトリプトファンで置換することにより、この手法は生体内に存在するペプチドリガンドの受容体同定に応用することが可能である。ペプチドリガンドは主にGタンパク質共役型受容体(GPCR)などの細胞膜上に存在するタンパク質に作用する。生体内に多数存在するペプチドリガンドの中には受容体が明らかにされていない「オーファンリガンド」も数多く存在する。また、多くのリガンドは受容体が複数存在するため、既に受容体が同定されていても他に受容体が存在する可能性もある。ペプチドリガンド内のトリプトファンをフルオロトリプトファンに置換した光親和性プローブを用いて、その受容体の同定を行うことが可能である。ペプチドリガンドの受容体は細胞膜上に存在する膜タンパク質であると予想される。光親和性標識法は膜タンパク質を可溶化せずに、立体構造を維持したままリガンドと結合させることができる。このため光親和性標識は、リガンドと膜タンパク質の結合を調べる上で有効な手法である。

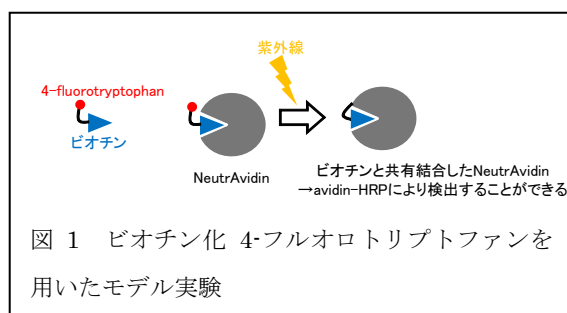
## 3. 研究の方法

まず、インドールの4位にフッ素が導入された4-フルオロトリプトファンをメタノール中で紫外線照射し、実際に光反応が進行するかをNMRなどにより解析した。ここでは実際

の光親和性標識を想定し、タンパク質に影響を与えないような比較的弱い光源を用いた。しかしながら、種々の光源を用いて光反応を行ったが、反応物は確認されなかった。このため、4-フルオロトリプトファンのカルベンの生成効率は低くNMRなどでは検出できないことが示唆された。

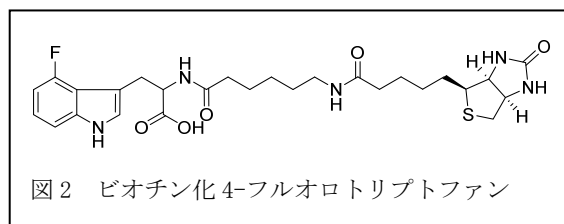
そこで、4-フルオロトリプトファンに蛍光基などを導入した化合物を合成し、実際にタンパク質を光親和性標識し、標識タンパク質をより高感度な蛍光や化学発光などで検出できるかどうかを調べることにした。この実験に先立ち、ポジティブコントロールとして、光反応基として知られるテトラフルオロフェニルアジドに蛍光基であるBODIPYを導入した化合物を合成した。この化合物と牛血清アルブミンなどのタンパク質と混合させることで(非特異的に)結合させ、紫外線を照射し、標識タンパク質をSDS-PAGEにより解析した。その結果、標識タンパク質が蛍光で検出できることを確認した。標識(カルベン生成)効率が低くても、感度が高い蛍光やあるいは化学発光などを用いることで標識タンパク質を十分検出できると予想された。

次に、4-フルオロトリプトファンをビオチン化し、この化合物で光親和性標識したNeutravidinをavidin-HRPにより高感度な化学発光で検出することを試みた(図1)。



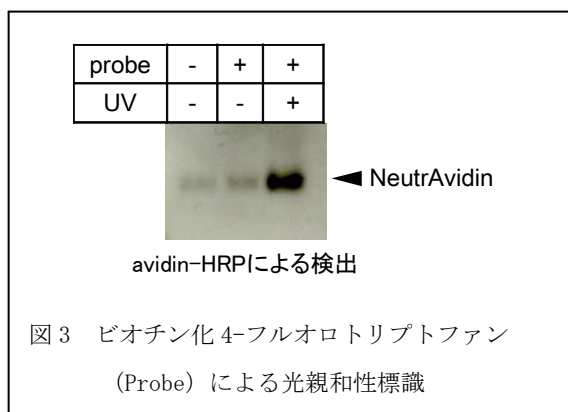
## 4. 研究成果

まず、4-フルオロトリプトファンにビオチンを導入した化合物を合成した(図2)。



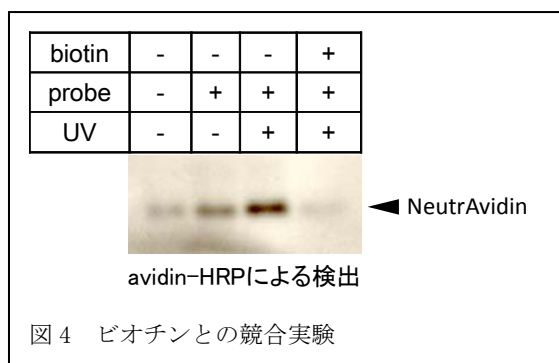
この化合物を Neutravidin タンパク質と相互作用させ、紫外線を照射することにより、光親和性標識を行った。この際、光源としては UV トランスイルミネーター (VILBER LOURMAT) を用いて、312 nm の紫外線を照射した。

得られたビオチン化アビジンを SDS-PAGE で分離し、アビジン-HRP を用いたウェスタンブロット (アビジンブロット) により検出した。その結果、ビオチン化 4-フルオロトリプトファンが (共有) 結合したアビジンと考えられるバンドが検出された。一方、紫外線を照射しない場合、このバンドは検出されなかった (図 3)。このことは、4-フルオロトリプトファンを用いた光親和性標識の検出が可能であることを意味している。



さらに、紫外線の照射方法 (光源からの距離、時間など) の検討を行い、再現性良く光親和性標識が可能なる条件を見出した。

一般的な光反応基であるアリールアジドやジアジリンなどをもつ光親和性プローブを用いて光親和性標識を行うと、非特異的な結合がしばしば見られる。そこで、4-フルオロトリプトファンのビオチン誘導体を用いた光親和性標識が、ビオチン-アビジンの相互作用を介したものであるかを調べるために競合実験を行った。過剰なビオチンとインキュベートした Neutravidin に対し、上記の光親和性標識実験を行った。その結果、ビオチン存在下では、4-フルオロトリプトファンのビオチン誘導体で標識されたバンドは検出されなかった (図 4)。このことは、4-フルオロトリプトファンを用いた光親和性標識により、特異的に結合するタンパク質を検出することが可能であることを示している。



本研究により、4-フルオロトリプトファンを用いた光親和性標識が可能であることが明らかになった。本手法は、トリプトファン残基をもつペプチドリガンドの受容体決定などに応用されることが期待される。

## 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 7 件)

- ① 紙透伸治 (9 人中 1 番目)、Synthesis and Evaluation of Diarylthiazole Derivatives That Inhibit Activation of Sterol Regulatory Element-Binding Proteins、Journal of Medicinal Chemistry、査読有、54 巻、2011、4923-4927  
DOI: 10.1021/jm200304y
- ② 江上寛通 (6 人中 2 番目)、Catch and release of alkyne-tagged molecules in water by a polymer-supported cobalt complex、Organic & Biomolecular Chemistry、査読有、9 巻、2011、7667-7670  
DOI: 10.1039/C1OB06123B
- ③ 真仁田大輔 (12 人中 10 番目)、Camptothecin (CPT) directly binds to human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) and inhibits the hnRNP A1/ topoisomerase I interaction、Bioorganic & Medicinal Chemistry、査読有、19 巻、2011、7690-7697  
DOI: 10.1016/j.bmc.2011.09.059
- ④ 宮野由香 (21 人中 13 番目)、Exploration of the binding proteins of perfluorooctane sulfonate by a T7 phage display screen、Bioorganic & Medicinal Chemistry、査読有、20 巻、

2012、3985-3990  
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.05.016

- ⑤ 竹内倫文 (12 人中 11 番目)、Total Synthesis of (+)-Sch 725680: Inhibitor of Mammalian A-, B-, and Y-Family DNA Polymerases、Organic Letters、査読有、14 巻、2012、4303-4305  
DOI: 10.1021/o1301865u
- ⑥ 草柳友恵 (13 人中 6 番目)、The antitumor agent doxorubicin binds to Fanconi anemia group F protein、Bioorganic & Medicinal Chemistry、査読有、20 巻、2012、6248-6255  
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.09.015
- ⑦ 九十田千子 (10 人中 6 番目)、Ridaifen B, a tamoxifen derivative, directly binds to Grb10 interacting GYF protein 2、Bioorganic & Medicinal Chemistry、査読有、21 巻、2013、311-320  
DOI:10.1016/j.bmc.2012.10.037

[学会発表] (計 1 件)

- ① 紙透伸治  
脂肪合成を阻害する小分子化合物  
日本植物学会  
2011年9月9日  
名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

紙透 伸治 (KAMISUKI SHINJI)  
東京理科大学・理工学部・助教  
研究者番号: 30553846

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: