

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2011

課題番号：22790009

研究課題名（和文） 二段階活性化型の高精度タンパク標識プローブの精密設計と機能評価

研究課題名（英文） Design and synthesis of dual activated bioprobe for proteins and DNAs

研究代表者

高須 清誠 (TAKASU KIYOSEI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：10302168

研究成果の概要（和文）：

申請者がこれまで集積した精密有機合成に関する知見を基盤に細胞内タンパクもしくは核内 DNA を選択的に化学修飾できる機能性低分子を開発した。当初はタンパク標識化剤の創製を目指していたが、グルタチオン等のチオール官能基との反応性があまりよくなかったことが明らかとなったため、第二の目標であった DNA 標識化剤の開発に研究方向をシフトした。

誘導体合成の結果選択した化合物を用いて DNA 切断活性の評価を行った。種々の酸性 pH の緩衝液中、プラスミド DNA と 37 °C で 24 時間培養すると、pH の低下に伴い DNA の切断活性が向上した。また pH 6.5 の緩衝液中、種々の濃度の 5 を用いて 37 °C、24 時間培養したところ、最小 0.3 mM で DNA の切断が見られ、濃度依存的に DNA 切断活性が向上することも確認できた。以上のことから研究計画で提案した方法は有効であることを証明できた。

研究成果の概要（英文）：

We have developed pH-responsive DNA cleaving agents using fused-cyclobutanols as precursors activated via ring contraction rearrangement. It is important for improvement of reactivity to design molecules stabilizing cation intermediates. In addition, we found that benzo-fused cyclobutanol showed DNA cleavage activity and this activity was stronger with higher concentration and more acidic pH condition. Further investigation about DNA alkylation mechanism and higher active compounds are ongoing in our laboratory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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、有機合成化学、生体高分子、化学修飾、DNA 切断活性、シクロブタン、pH 応答

1. 研究開始当初の背景

生命現象の形質表現では、極微量に存在するタンパクなどの内因性物質が、高濃度に存在する他物質（標的タンパクから見ると不純物）の中で、生理活性物質と特異相互作用することで惹起される例も多い。生細胞中の微量の標的タンパクの局在や濃度変化を可視化（イメージング）は生命現象の分子レベルでの精密理解に直結すると考えられ、GFP 導入タンパクや低分子蛍光プローブなどのリアルタイム可視化ツールの開発が国内外で精力的に行われている。ところで、現在の重要な課題のひとつに「精度」向上がある。無数の不純物が高濃度に存在する細胞中で、ごく低濃度に存在する標的タンパクだけを低分子により標識化する技術は限られ、特に、低分子物質と標的タンパクの結合定数が十分に大きくない場合（実際はほとんどがこれに相当）では、非選択的修飾が目的の修飾を圧倒的に凌駕し可視化効率が極めて悪くなる。本課題では、申請者が開発した独創的な化学反応を基盤に、標的タンパクの低分子による化学修飾の「精度」を大幅に向上させるための方法論「二段階活性化方式プローブ」の提案を目標とする。

2. 研究の目的

申請者がこれまで集積した精密有機合成に関する知見を基盤に細胞内タンパクを選択的に化学修飾できる機能性低分子を開発する。タンパク修飾までに二重の刺激を必要とすることで選択性発現の閾門を経ることにより、従来よりも精度的に大幅に優れたタンパク標識化剤の開発を可能とする。グルタチオン還元酵素の高精度イメージングによる細胞内酸化ストレスの可視化計測をモデルとしたプローブ開発研究を通して、微細生命現象の解明のための生化学ツールおよび新たな方法論の提案することを期間内目標とした。

3. 研究の方法

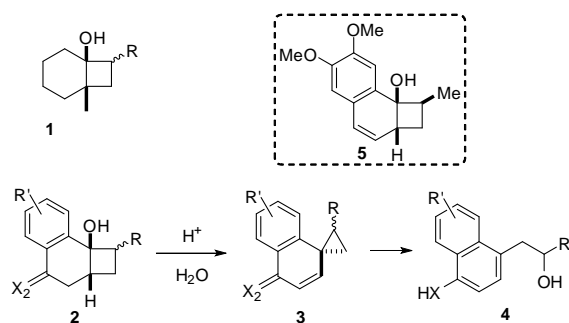
本研究では、精密分子設計に基づく二段階活性化方式プローブの有機合成、及び、グルタチオン還元酵素（GSR）の効率的かつ選択的

な標識化・可視化実験を2本柱にして検討を行う。合成パートでは、これまでに合成したプラットフォーム **1** に修飾を施し、脱離基・蛍光タグの適切な導入形態を検討する。また、前駆体 **1** および活性体 **2** (Fig. 1) と純粋 GSR との反応性（特に反応速度論および反応効率）について検討を加え、プラットフォームの再デザインを行う。ケミカルバイオロジーパートでは、上記結果をふまえて GSR を過剰発現させた大腸菌等を用いて細胞破砕物もしくは細胞内での GSR の可視化を検討し、二段階活性化方式の問題点の洗い出しを行う。特に、2つの刺激の与え方の最適化に重点をおき、生細胞での GSR の可視化を行い細胞内ストレスの計測に応用する。ケミカルバイオロジー研究は、必要に応じて GSR の取扱い（過剰発現法等）を専門とする国内研究者に協力や助言を仰ぐ予定である。

4. 研究成果

双環性シクロブタノール **1** に対して強酸性条件で転位反応を検討したが、ほとんど反応が進行しなかった。これは水酸基が脱離するには基質の反応性が充分でなかったためと考えられる。そこで、脱離後のカルボカチオンが安定化するよう隣接位に芳香環が縮環した三環性シクロブタノール **2** を設計・合成した。その結果、予想通り格段に転位の反応性が向上した。しかしこの場合の生成物は、スピロシクロプロパン **3** でなく、共存する水で三員環が開環したナフタレン化合物 **4** であった (Scheme)。アルキル化剤創製を前提とする場合、生じた **3** が速やかに DNA 等の生

Scheme. Rearrangement and Ring Opening Reaction of Benzo-fused compounds **2** in aqueous media



体高分子と付加体を形成することは細胞選択性を高めるには好都合と考えられる。

誘導体合成の結果選択した **5** を用いて DNA 切断活性の評価を行った。種々の酸性 pH の緩衝液中、プラスミド DNA と 37 °C で 24 時間培養すると、pH の低下に伴い DNA の切断活性が向上した。また pH 6.5 の緩衝液中、種々の濃度の **5** を用いて 37 °C、24 時間培養したところ、最小 0.3 mM で DNA の切断が見られ、濃度依存的に DNA 切断活性が向上することも確認できた。現在、計画通り合成シクロブタノールがスピロ三員環を經由してアルキル化剤として働いているかについて、DNA-低分子コンジュゲートの生成を確認する検討も行っている。

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 9 件)

- ① Acid-Catalyzed [2 + 2] Cycloaddition at Room-Temperature with Suppression of Side Reactions by Using a Flow Microreactor System, Kurahashi, K.; Takemoto, Y.; Takasu, K. *ChemSusChem* **2012**, *5*, 270-273. DOI: 10.1002/cssc.201100373
- ② Formal (3 + 3) Cycloaddition of Silyl Enol Ethers Catalyzed by Trifric Imide: Domino Michael Addition-Claisen Condensation Accompanied with Isomerization of Silyl Enol Ethers, Azuma, T.; Takemoto, Y.; Takasu, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1190-1193. DOI: 10.1248/cpb.59.1190
- ③ Catalyst-Controlled Torquoselectivity Switch in the 4 π Ring-Opening Reaction of 2-Amino-2-azetines Giving β -Substituted α,β -Unsaturated Amidines, Shindoh, N.; Kitaura, K.; Takemoto, Y.; Takasu, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8470-8473. DOI: 10.1021/ja202576e
- ④ Unprecedented Synthesis of *N,N*-Divinylamines by Tf₂NH-Catalyzed Reaction of Ynamide with Ketimine, N. Shindoh, Y. Takemoto, K. Takasu. *Heterocycles* **2011**, *82*, 1133-1136. DOI: 10.3987/COM-10-S(E)87.
- ⑤ Synthesis and Properties of Chiral Thioureas Bearing an Additional Function at a Remote Position Tethered by a 1,5-Disubstituted Triazole. Takasu, K.; Azuma, T.; Enkhtaivan, I.; Takemoto, Y. *Molecules*, **2010**, *15*, 8327-8348. DOI: 10.3990/molecules15118327.
- ⑥ Enantioselective Total Synthesis of (-)- and (+)-Petrosin. Toya, H.; Okano, K.; Takasu, K.; Ihara, M.; Takahashi, A.; Tanaka H.; Tokuyama, H. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5196-5199. DOI: 10.1021/ol1022257.
- ⑦ Auto-tandem Catalysis: Facile Synthesis of Substituted Alkylidenecyclohexanones by Domino (4 + 2) Cycloaddition-Elimination Reaction. K. Takasu. T. Tanaka, T. Azuma, Y. Takemoto, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8246-8248. DOI: 10.1039/C0CC03336G.
- ⑧ Stereocontrolled Synthesis of Spiro[n.2]alkenes by Ring Contraction of Fused-Cyclobutanols. K. Takasu, Y. Nagamoto, Y. Takemoto, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8427-8432. DOI: 10.1002/chem..201000930.
- ⑨ Synthesis of Trifunctional Thioureas Bearing 1,5-Disubstituted Triazole Tether by Ru-Catalyzed Huisgen Cycloaddition. K. Takasu, T. Azuma, Y. Takemoto, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2737-2740. DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.03.053

[学会発表] (計 5 件)

- ① シクロブタンの合成化学：反応開発から生体機能性分子への応用まで。高須清誠、京都府立大学生命分子化学科セミナー・鴨叡会セミナー、2012.1.31 (京都府、京都府立大学)
- ② 触媒制御での 4 π 電子環状反応における回転選択性の逆転：不飽和アミジンの立体選択的合成、高須清誠、平成 23 年度化学系学協会東北大会：有機化学コロキウム、2011.9.17 (宮城県、東北大学)
- ③ Waste-minimized Enol Silylation Catalyzed by A Triflimide-amine Co-catalyst, Kiyosei Takasu, The Second International Symposium on Process Chemistry, 2011. 8.

11. (Kyoto)

- ④ Catalytic Synthesis of Silyl Enol Ethers by Bronsted Acid-Base Catalysis, Kiyosei takasu, 18th International Conference on Organic Synthesis, 2010, 8.1, Bergen (Norway)
- ⑤ Atropisomerism of α,β -unsaturated amidines: Stereoselective synthesis by catalytic domino reaction and optical resolution, Kiyosei Takasu, 22nd International Symposium on Chirality, Sapporo, 2010, 7.12

[図書] (計 2 件)

- ① Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, Kiyosei Takasu 2012, Wiley.
(共著) 印刷中
- ② ナノバイオ技術と創薬研究, 高須清誠、2012, メディカルドウ (共著) pp.72-77.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: シリルエノールエーテル類の製造法
発明者: 高須清誠、竹本佳司、倉橋慧
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: PCT
番号: JP2011/54945
出願年月日: 2011. 3. 2
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/gousei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高須 清誠 (TAKASU KIYOSEI)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号 10302168

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし