

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560402

研究課題名(和文) 標的同一の効率化を指向したプローブ分子の簡便合成

研究課題名(英文) Development of short-step synthesis of probe molecules for accelerating target identification

研究代表者

小林 資正 (Kobayashi, Motomasa)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40116033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：微量にしか保有しない活性物質や足がかりとなる適当な官能基を持たない活性物質でも簡便にプローブ分子へと誘導し、標的同一へ応用できる手法の確立を目指して、カルベンあるいはその等価体を高反応性化学種として用いた官能基非依存的な結合形成反応による合成法を確立するとともに、実際の生物活性天然物に適用し、その有用性を示すことが出来た。また、リガンド部位に特異的に結合した標的タンパク質のみを切り出すことを可能とするcleavable siteとして、1,2-ジオールが有効であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：We developed short-step and concise synthetic method of affinity probe molecules derived from bioactive substances, through functional group-independent bond-forming reaction utilizing highly reactive species. The carbene species generated from 3-aryl-3-trifluoromethyldiazirine gave the best result, providing various reaction products efficiently. As a proof-of-concept study, we tried the direct derivatization of a bioactive natural product without anchoring functionality and the pulldown study. Only two-step reaction, the photo-crosslink reaction between diazirine and natural product followed by the Huisgen reaction, provided a biotinylated affinity probe. And the probe molecule was found to capture target protein of the parent compound, although relatively low efficiency and specificity were observed.

We also examined the cleavable site of the probe molecules to detect the specifically bound protein toward probe molecules, and a 1,2-diol unit was found to be the best among we tested.

研究分野：天然物化学

キーワード：標的同一 プローブ分子 生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

多彩な化学構造と強力な生物活性を有する活性天然物は、生体機能解析のための分子プローブとしてだけでなく医薬品やそのシーズとしても大きく貢献している。しかし、これまで見出された数多くの活性天然物の大半は標的分子が明らかにされていないことから、その利用はごく一部に限られてきた。すなわち、活性物質由来のアフィニティブローブ分子を用いて標的タンパク質を捕捉・同定する研究を行うためには、当然のことながら、活性物質を化学変換してプローブ分子を合成する必要がある。活性発現(標的タンパク質との結合)に影響を与えない部位に、誘導化が可能な官能基(アルコール、アミン等)を有する化合物においてのみ可能であるため、研究の対象になり得る活性物質は限定されてしまうのが現状であるといえる。そこで今回申請者は、活性物質由来のプローブ分子を用いた標的分子同定を簡便かつ一般性の高い手法として確立できれば、ケミカルバイオロジー研究や創薬研究の分野に大きな発展をもたらすことができると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、活性物質由来のプローブ分子を用いた標的分子同定におけるこれまでの問題点を克服し、簡便なプローブ分子の調製法の構築と、高い標的分子捕捉能を有するプローブ分子の開発を目指し、以下の目標を設定した。

カルベン等の高反応性化学種を用いた官能基非依存的な結合形成反応を利用することで、不安定かつ微量の活性物質でも簡便にプローブ分子へと誘導できる手法を確立する。

活性物質の構造を特異的に認識して結合した標的タンパク質のみを検出するため、リンカー部に緩和な条件で化学的に切断が可能な化学構造を組み込んだプローブ分子を開発する。

確立した手法の有用性を検証するために、申請者が先に見いだしている抗腫瘍活性物質のプローブ分子を調製し、従来法との比較検討を行う。

3. 研究の方法

<高反応性化学種を用いた官能基非依存的な結合形成によるプローブ化>

微量にしか保有しない活性物質や足がかりとなる適当な官能基を持たない活性物質でも簡便にプローブ分子へと誘導できる手法の確立を目指して、カルベンあるいはその等価体を高反応性化学種として用いた官能基非依存的な結合形成反応を利用した、プロ

ーブ分子の設計・合成を検討した。フォトアフィニティブローブにおいても汎用される 3-aryl-3-trifluoromethyldiazirine を高反応性化学種として用いたラベル化の後、末端アルキンとの Huisgen 反応によりビオチンなどのタグをリンカーを介して導入して目的のプローブ分子へと変換するとともに、これを用いた標的タンパク質の捕捉・同定に着手した。微量の活性物質を用いた場合でも問題なくプローブ化できる手法の確立を目指し、まず単純なモデル化合物を用いて、反応溶媒や温度など、共有結合形成反応条件の最適化について検討した。また、3-aryl-3-trifluoromethyldiazirine 由来のカルベンと同等もしくはそれ以上の反応性が期待される、alkyl diazirine 由来カルベン、aryl azide 由来のナイトレンなどの高反応性化学種を用いたラベル化についても比較検討を行った。

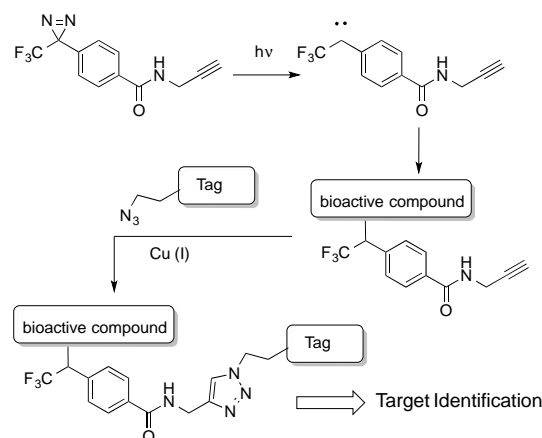


図1 官能基非依存的な結合形成によるプローブ化の概略

<Cleavable site としてのプロモレイミド基の利用>

プローブ分子のリンカー部の適当な位置に、温和な化学反応によって容易に切断が可能な構造(cleavable site)を組み込むことにより、リガンド部位に特異的に結合した標的タンパク質のみを切り出すことが可能となる。新たな cleavable site としてプロモレイミド基に着目し、検討を行った。最近 Baker らは、プロモレイミド基が、タンパク質表面のシステイン残基に対する可逆的なラベル化に利用できることを報告している(*J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 1960)。プロモレイミド基とチオールとで形成される共有結合が、過剰量のホスフィンやチオールなどを作用させることにより、温和な条件で容易に切断されるというものである。申請者はこれをプローブ分子のリンカー部に組み込むことで、cleavable site を有するプローブ分子へと展開

できるのではないかと考えた。

すでに我々は、生体内ペプチド glutathione 由来のビオチン標識プローブを用いて、標的タンパク質である glutathione-S-transferase (GST)を捕捉できる実験系を確立している (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4152)。これをモデルケースとし、プロモマレイミド基をリンカー中に導入したプローブ分子を合成し、タンパク質と結合したプローブ分子をアビジンビーズで捕捉した後、マレイミド基部分での切断反応により GST のみが切り出されてくるか検証することとした。また、1,2-ジオールや azobenzene など、すでに報告されているその他の cleavable site を有するプローブ分子についてもあわせて合成し、比較検討を行った。

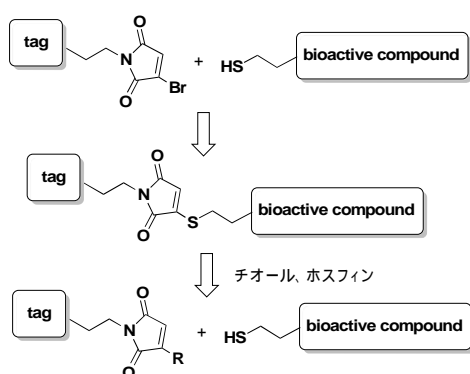
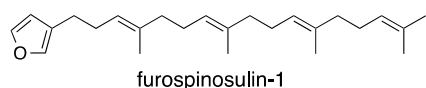


図2 プロモマレイミド基を導入したプローブ分子の作業仮説

<実際の活性天然物への適用>

上記の方法論についてその有用性を検証する目的で、実際の生物活性天然物を用いたプローブ化と標的タンパク質の検出について、従来法との比較検討を行うこととし、申請者らが見出した低酸素環境選択的ながん細胞増殖阻害作用を有する海洋天然物 furospinosulin-1 のプローブ化と結合タンパク質解析を行った。本化合物は誘導化の足がかりとなるような官能基を持っていないことから、上記の方法論を適用するモデルケースとして最適であると考え、カルベンを用いた官能基非依存的誘導化によってプローブ化した後、同プローブを用いてがん細胞の破碎液から結合タンパク質の精製・同定を試みた。

図3 Furospinosulin-1 の化学構造



4. 研究成果

<高反応性化学種を用いた官能基非依存的な結合形成によるプローブ化>

3-Aryl-3-trifluoromethyldiazirine と末端アルキンを有するプローブ分子素子を合成し、1-naphthol をモデル基質として、官能基非依存的ラベル化の反応溶媒や濃度、UV 照射時間、反応温度などの検討を行い、条件の最適化を行った。反応生成物の構造を確認したところ、C-H 挿入やシクロプロパン化などが様々な位置で進行した生成物が得られていることがわかり、種々の官能基を有する活性天然物のプローブ化に適用できる可能性を示すことが出来た。

一方、alkyl diazirine 由来のカルベン、aryl azide 由来のナイトレンなどの高反応性化学種を用いたラベル化についても同様に、1-naphthol をモデル基質として検討を行い、反応効率や生成物の多様性などについて比較検討を行った結果、反応は進行するものの、3-aryl-3-trifluoromethyldiazirine 由来カルベンが最もよい結果を与えることがわかった。

<Cleavable site としてのプロモマレイミド基の利用>

まず、リンカーの途中にプロモマレイミド基を導入した glutathione 由来のビオチン標識プローブの合成を行ったが、再現性よく目的の化合物を得ることができなかった。化合物自身の安定性に問題があることが示唆されたため、その後のタンパク質捕捉や切断反応の検討については断念した。

そこで、すでに報告されている数種の cleavable site について比較検討を行うこととし、過ヨウ素酸処理で切断できる 1,2-ジオール、ホスフィンで切断できるジスルフィド、および $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で切断できる azobenzene をそれぞれ導入したプローブ分子を合成し、プルダウンの後に切断処理を行って得られたタンパク質を比較した。その結果、1,2-ジオールを有するプローブを用いた場合に最も非特異結合したタンパク質の溶出が抑えられ、きれいな電気泳動パターンが得られることが分かった。

<実際の活性天然物への適用>

3-Aryl-3-trifluoromethyldiazirine と末端アルキンを有するプローブ分子素子を furospinosulin-1 と反応させた後、リンカーの末端にアジド基を導入したビオチン誘導體と Huisgen 反応で連結することで、わずか2段階の反応で furospinosulin-1 のプローブ化に成功したので、このプローブ分子を用いてヒト前立腺がん DU145 細胞の破碎液からプルダウンを行った。以前の検討で、furospinosulin-1 由来のフォトアフィニティープローブ分子に特異的に結合し、がん細胞の低酸素環境下での増殖に關与する2種の標的タンパク質の解明に成功しているが、今回新たに合成したプローブ分子でも、実際にこれらのタンパク質が結合していることを明らかにし、本研究のアプローチが一定の有用

性があることを示すことが出来た。一方で、本プローブ分子には非特異的に結合してくるタンパク質が非常に多いこと、ダミーのリガンドとして farnesol を用いて同様に合成したプローブでも同じタンパク質が検出されたことから、この手法だけで標的分子を特定することは困難であると考えられる。今後更なる改良を加え、より汎用性、有効性の高い方法論へと確立していきたい。

大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：20362618

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

伊藤 葵, 古徳直之, 住井裕司, 角居雄太, 小林資正 「Cortistatin A の標的分子同定のためのプローブ分子の合成」第 63 回日本薬学会近畿支部大会 10/12/2013, 同志社女子大学・京田辺キャンパス(京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 資正 (KOBAYASHI MOTOMASA)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：40116033

(2) 研究分担者

古徳 直之 (KOTOKU NAOYUKI)