

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560415

研究課題名(和文)高反応性官能基を用いた低分子化合物のレセプター同定と環境探査への試み

研究課題名(英文)Development of chemical probes for linking small molecules and their receptors.

## 研究代表者

西村 慎一(Nishimura, Shinichi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30415260

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)：生命は遺伝子に直接コードされる核酸やタンパク質と、間接的にコードされるあるいは環境から取得する低分子化合物やイオンがモジュールとしてはたらき、それらが複雑に相互作用することにより成り立つ。そこでモジュール間の相互作用を包括的、かつ動的に検出することが生命の理解の基盤となる。本研究では低分子化合物、特に脂質分子に注目して、分子間に共有結合を形成させる方法論を用いて分子間相互作用の検出方法の開発を行った。すなわちコレステロールやリン脂質にリンカーを介して反応性の高い官能基と蛍光官能基を連結し、脂質プローブを合成した。そして脂質プローブを用いて、脂質と膜タンパク質との相互作用の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins interact with membrane lipids for their structural stability and proper function. However, lipid-protein interactions are poorly understood at a molecular level especially in the live cell membrane, due to current limitations in methodology. In this research project, we synthesized amphiphilic lipid probes that can be used to link membrane lipids and membrane proteins in vivo. Cholesterol and phospholipids were both conjugated to a fluorescent tag through a linker containing thiourea. In the erythrocyte, the cholesterol probe fluorescently tagged the anion transporter band 3 via thiourea. Tagging by the cholesterol probe, but not by the phospholipid probe, was competitive with an anion transporter inhibitor, implying the presence of a binding pocket for cholesterol at around Lys557 in this ~100 kDa protein. Our strategy would be effective when analyzing lipid-protein interactions in vivo in the live cell membrane.

研究分野：天然物化学

キーワード：分子間相互作用 脂質 生体分子 共有結合

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムワイドな実験材料の整備とインフォマティクス解析の進歩により、生理活性化合物と遺伝子間の相互作用を網羅的に検出することで生理活性化合物の作用経路を予測することが可能になってきた。また、実験対象を生育必須遺伝子にフォーカスすることで、化合物の標的経路をより簡便に推測することも明らかになってきた。しかし化合物が直接的に作用する分子を同定することは依然として非常に困難であり、有用な生理活性を示す化合物の作用を分子レベルで理解することが出来ないまま、時間のみが経過することが多々ある。こういった問題を解決するため、共有結合により分子間相互作用をより確実に検出しようとするアプローチが古くから利用されてきた。近年、生理活性をもつ低分子化合物の標的分子同定を目的として、反応性の高い官能基の開発や利用方法の模索が再燃している。本研究ではこの方法論を特に弱い相互作用を持つ低分子化合物に導入したいと考えた。生命を理解しようとした時、必ずしも強い相互作用ばかりとは限らない生体低分子と生体高分子間の相互作用ネットワークを検出し再構築することは不可欠であると考えられる。また、それは疾患の理解や創薬を出口とした時には特に重要であり、本申請研究にある方法論が一般性を得られればその波及効果は高い。

## 2. 研究の目的

生命は遺伝子に直接コードされる核酸やタンパク質と、間接的にコードされるあるいは環境から取得する低分子化合物やイオンがモジュールとしてはたらき、それらが複雑に相互作用することにより成り立つ。そこでモジュール間の相互作用を包括的、かつ動的に検出することが生命の理解の基盤となる。本研究では特に、脂質分子に注目した。脂質分子は遺伝子に間接的にコードされている低分子化合物であるため遺伝学的な機能変調が難しく、流動性が高いため生化学的な解析も確立されているとはいえず、どのようなタンパク質と、いつ、どこで相互作用しているのかを知ることが難しい分子種の一つだからである。生体膜中で分子間に共有結合を形成させることが出来れば、膜脂質の機能解析が爆発的に進むことが期待できる。

申請者らは最近、5-sulfonyl tetrazole という官能基を用いて生体高分子の標識化が可能であることを報告している (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1608-1611.)。本研究では生体膜脂質のような低分子化合物に5-sulfonyl tetrazole などの共有結合を形成しうる官能基を導入し、生体高分子との相互作用を口バストかつ包括的に検出する方法論の構築を目指した。

## 3. 研究の方法

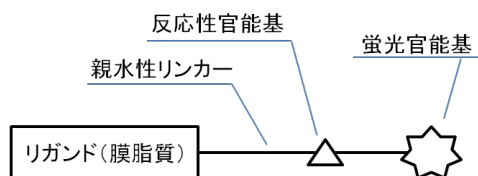
内因性であれ外因性であれ、低分子化合物の生体内における機能を解析するためには2つのアプローチがある。1つは遺伝学的な相互作用を、もう1つは物理的相互作用を指標にするものである。しかし前者の場合、表現型を出しにくい分子を対象にすると、スクリーニングは困難なものとなる。例えば、短時間処理や細胞レベルでは効果が少ない生薬や、細胞中に豊富に存在する脂質分子のような場合である。そのような時、物理的相互作用を指標に相互作用する分子を特定することが望まれる。しかし物理的相互作用を指標にする場合においては、相互作用が弱かったり、相手分子の存在量が少ない場合には正確に相互作用相手を同定することは容易ではない。そこで物理的相互作用を確実に検出するために、古くから共有結合の導入が検討されてきた。このためにはシステイン残基による求核攻撃をねらった maleimide、diazirine や aryl azide などの光反応性官能基、また、最近では B. F. Cravatt 博士 (Scripps 研究所) らによって生体内のセリン加水分解酵素の網羅的検出のために精力的に使用されている fluorophosphonate などの官能基が利用されており、浜地格博士 (京大院工) らは tosyl 化学や DMAP 化学、LDAI 化学といった官能基の反応性に着目した生体高分子の標識化の技術開発を展開している。また、S. A. Sieber 博士 (München 大学) らは天然物中にみられる反応性の高い官能基を利用することで抗生物質の作用機序解析がたとえマルチターゲットでも可能であると提案している。

本申請研究では (i) 5-sulfonyl tetrazole などの反応性官能基を組み込んだプローブ分子の求核種との反応性を検討することで低分子化合物とレセプターとの相互作用を安定的に検出する方法論を確立し、(ii) 脂質分子という超基本的な生体構成低分子をモデルとして、流動性が高くマルチターゲットな低分子化合物と生体高分子間の相互作用を包括的にとらえるための基盤技術の構築を試みた。

## 4. 研究成果

## ・分子間相互作用を検出する化学プローブの設計と合成

膜脂質をリガンドに設定し、プローブを設計・合成した。膜脂質は化学修飾をすると性質が大幅に変わってしまうことが多々あるが、本研究では両親媒性を維持させることを優先して設計した (図1)。すなわちコレステロールは3位の水酸基から親水性のリンカーを介して反応性官能基と蛍光基を結合した。リン脂質にはホスファチジルエタノールアミンを用い、アミノ基から親水性のリンカーを介して反応性官能基と蛍光基を結合させた。



**図 1.プローブ分子の設計** .リガンドと反応性官能基、蛍光官能基を親水性の高いリンカーで連結した .

### ・脂質プローブによる膜タンパク質の標識

合成したプローブの生体膜への親和性と膜タンパク質の標識化について、赤血球を用いて検討した。期待通りコレステロールプローブは赤血球膜へ結合した (図 2a)。一方でリガンドを欠くコントロールプローブでは赤血球膜への結合は見られなかった。

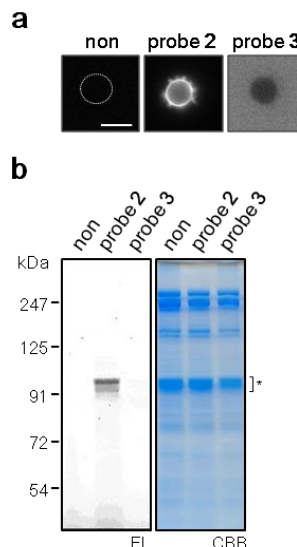
次に、プローブで処理した赤血球を溶解し、SDS-PAGE で分離後、ゲルの蛍光シグナルを検出した。すると、脂質をリガンドに設計した場合に、90-100 kDa のタンパク質が蛍光標識されることが明らかとなった (図 2b)。ゲルを切り出し、質量分析によりこのタンパク質はアニオントランスポーターであるバンド 3 タンパク質であることが明らかとなった。なお、赤血球に結合しないリガンドを欠くプローブで処理した場合には標識は見られなかった。

### ・チオウレアの反応性

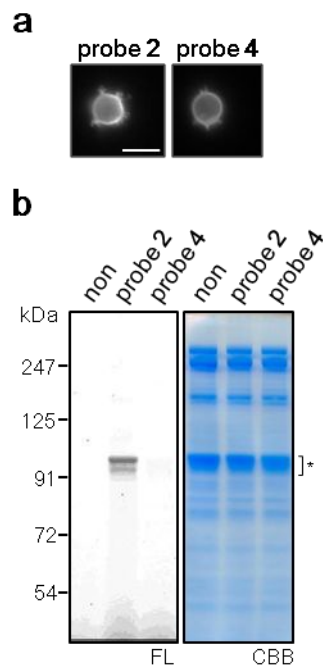
合成した脂質プローブにはタンパク質と反応しうる複数の官能基がふくまれていたため、申請者らは種々のプローブを合成し、その反応性を検討した。すると、チオウレアがバンド 3 タンパク質と脂質プローブとの反応点であることが明らかとなった (図 3)。

次にチオウレアの反応性を検討した。種々検討すると、赤血球膜中での反応はバンド 3 タンパク質の阻害剤によって抑えられることが明らかとなった。用いた阻害剤は特定のリジン残基と共有結合することが知られており、チオウレアがアミノ基と反応する可能性が示唆された。そこで、水溶液中でチオウレアと過剰量の *n*-プロピルアミンを混合すると、反応速度は遅いものの、一つの生成物が確認された。これを精製し、構造を決定してみると、チオウレアと *n*-プロピルアミンが反応し、グアニジンへと変換した化合物であることが明らかとなった。

チオウレアを含む薬剤がタンパク質中のシステインと共有結合を形成することで効果を発揮する例が知られている。本研究で用いた脂質プローブの場合には、赤血球膜のシステインを保護した場合にもバンド 3 タンパク質の標識化が進行した。少なくとも脂質プローブとバンド 3 との相互作用にはシステイン残基は関与しないと考えられる。



**図 2.コレステロールプローブによる赤血球タンパク質の標識化** .赤血球をコレステロールプローブ (プローブ 2) およびリガンドの無いプローブ (プローブ 3) で処理し、蛍光顕微鏡 (a) と蛍光スキャナー (b) をもちいて蛍光シグナルを検出した . \*印はバンド 3 タンパク質 .



**図 3.コレステロールプローブによる赤血球タンパク質の標識化** .チオウレアを持つコレステロールプローブ (プローブ 2) と持たないコレステロールプローブ (プローブ 4) による標識を蛍光顕微鏡 (a) と蛍光スキャナー (b) をもちいて検出した .チオウレアが無くても赤血球には結合するが、タンパク質の標識化はされない . \*印はバンド 3 タンパク質 .

### ・バンド 3 タンパク質における脂質結合サイトの可能性

本研究で合成した脂質プローブによるバ

ンド3タンパク質の標識化は、チオウレアの反応性の低さを考慮すると、バンド3タンパク質に脂質結合部位が存在することを示唆していた。そこでコレステロールのプロープとホスファチジルエタノールアミンのプロープを用いて比較解析を行うことにした。

まず、ホスファチジルエタノールアミン由来のプロープはコレステロールプロープと同程度にバンド3タンパク質を標識した。ところが、前述のバンド3タンパク質の阻害剤に対する応答は異なっていた。すなわち、コレステロールプロープは阻害剤と競合するものの、ホスファチジルエタノールアミン由来のプロープは競合しなかった。これは標識サイトが異なることを示しており、リガンドであるコレステロールとホスファチジルエタノールアミンの結合部位も異なる可能性を示唆していた。これらの結果から、共有結合性を有する脂質プロープは膜タンパク質中の脂質結合部位の探索に有用であることが明らかとなり、更なる検証により、結合サイトが明らかになると期待できる。なお、以上の結果は現在、論文投稿中である。

#### ・脂質プロープの赤血球以外の細胞への適用

合成した一連の脂質プロープの可能性を、赤血球以外の細胞を用いて検討することにした。まず、プロテオーム情報が十分に蓄積している分裂酵母についてである。生細胞に脂質プロープを取り込ませることに成功していないが、スフェロプラストとにすることで脂質プロープによる複数のタンパク質の標識化が検出された。また、ヒト培養細胞においても複数の標識化タンパク質が検出できることを確認した。今後、オミックス解析と組み合わせることにより膜脂質とタンパク質の包括的な相互作用ネットワーク解析が可能になると期待できる。

#### 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)

[学会発表](計 1 件)

森山彰博, 西村慎一, 掛谷秀昭. 生体膜を標的とする天然物の作用機序解析を指向した LiDEL 法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会・第9回年会. 大阪, 6月, 2014 (優秀ポスター賞を受賞).

[その他]

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/sc-mols/ci/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

西村 慎一 (NISHIMURA, Shinichi)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 30415260