

# 低分子化合物との共役付加反応を利用した核内受容体修飾法の開発研究

医薬分子化学研究室 小島 拓之

## 【緒言】

タンパク質は生体内で様々な役割を担っており、タンパク質の機能解析は生命現象のメカニズム解明ならびに創薬研究において重要である。タンパク質の解析法は数多く知られているが、中でも蛍光イメージングは局在や挙動などの機能及び発現量を生体環境に近い細胞内で解析可能な点が他の方法より優れている。一般的に使われている GFP などの蛍光タンパク質は構造が大きいいため、タンパク質機能への影響が懸念されている<sup>1</sup>。この問題を解決するため、ペプチドタグを利用した蛍光標識法の開発が行われているが、選択性に課題がある<sup>2</sup>。そこで本研究では、低分子化合物を利用したタンパク質修飾法の開発を目的とした。

## 【結果・考察】

### 1. 共有結合型リガンドを利用したペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR $\gamma$ ) 修飾法の開発研究

近年、薬理作用の増強や作用持続時間の延長を意図した共有結合型リガンドの創製が活発に行われている。そこで、共有結合型化合物に新たな反応点を付与したリガンドを用いることで、低分子化合物のみでのタンパク質修飾が可能になると考えた。著者は、リガンドを共役付加反応によって PPAR $\gamma$ に共有結合させた後、

リガンドに付与した反応点と機能性分子を反応させる、PPAR $\gamma$ の2段階修飾法を立案した (Fig. 1A)。本法は、機能性分子を変更することで様々な機能化に応用できると考えられる。例として、タンパク質の蛍光標識やメチルベスタチンによるプロテインノックダウン<sup>3</sup>、アフィニティータグによるタンパク質精製などが挙げられる。本研究では機能性分子として蛍光プローブを用い、PPAR $\gamma$ の蛍光標識を計画した。新たな反応点としてアジド基を有する共有結合型リガンド **1** とアジド基を持たない比較対照化合物 **2** を設計・合成した。また、機能性分子として蛍光団を有するアルキン体 **3** を合成した。PPAR $\gamma$ に対する修飾反応を ESI-質量分析で検討した結果、PPAR $\gamma$ に対する共役付加反応と Huisgen 環化反応による2段階の共有結合形成が示された (Fig. 1B)。

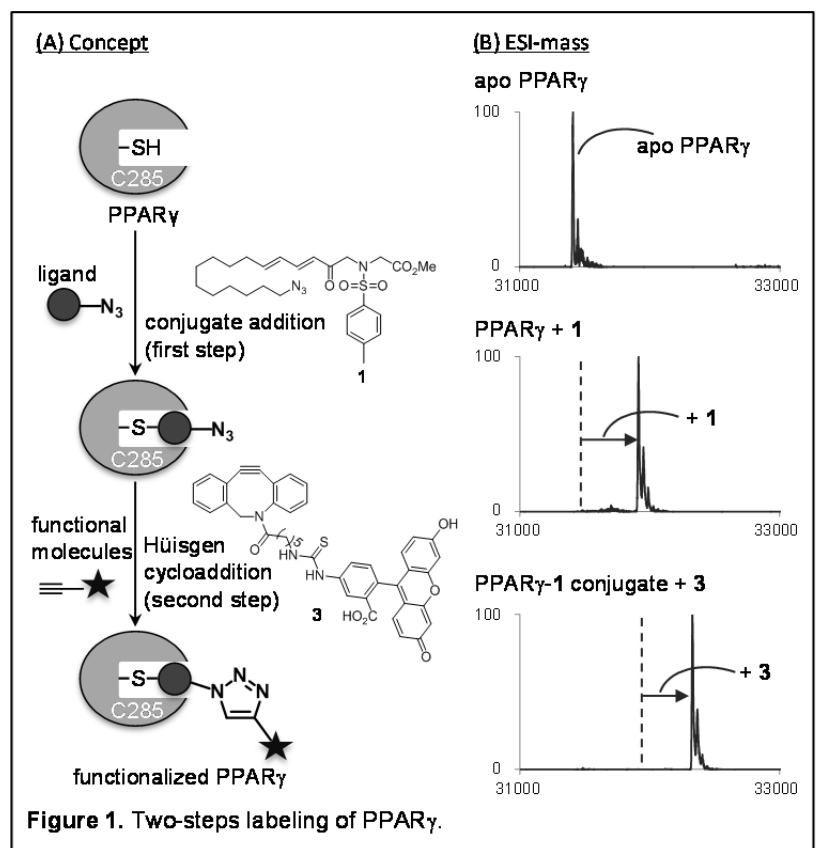
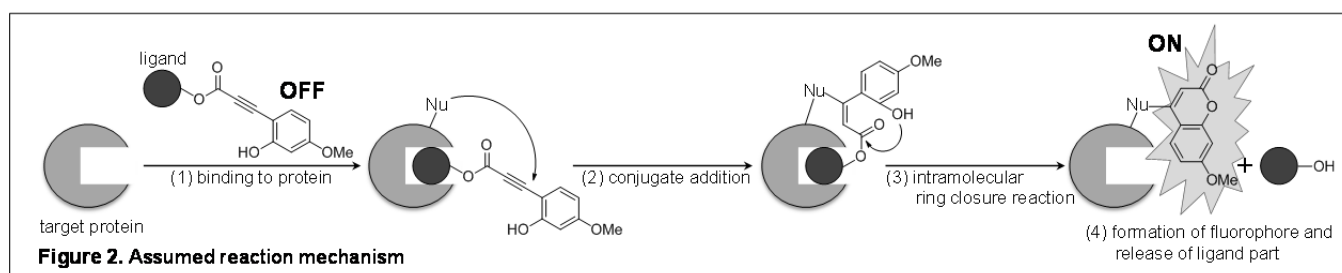


Figure 1. Two-steps labeling of PPAR $\gamma$ .

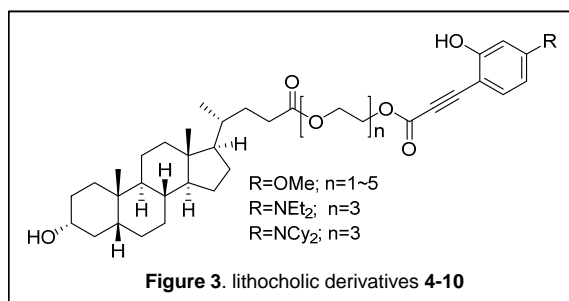
また、X線結晶構造解析の結果より、リガンドの共有結合部位は Cys285 であり、Huisgen 環化体は予想通り PPAR $\gamma$ 表面に位置していることが明らかになった。次に、2段階修飾法を用いて PPAR $\gamma$ の蛍光標識を検討した結果、大腸菌溶菌液中の PPAR $\gamma$ を選択的に蛍光標識することができた。

### 2. 求核性アミノ酸との共役付加反応を利用した新規 Turn-On 型蛍光プローブの開発とビタミン D 受容体 (VDR) 標識への応用

現在までに、金属イオンやグルタチオンなどの低分子化合物、細胞内 pH の測定を目的とした Turn-On 型蛍光プローブ (TO 型プローブ) の開発が活発に行われてきた<sup>4</sup>。TO 型プローブは標的分子と反応して構造が変化することで初めて蛍光を発するため、バックグラウンドが低く、高感度イメージングが可能である。しかしながら、タンパク質に対する TO 型プローブは、Lys 残基を標的とした *O*-nitrobenzoxadiazole プローブのみである<sup>5</sup>。本研究では、Lys 残基を含む様々な求核性アミノ酸へ適用可能な TO 型プローブの開発を目的とした。タンパク質に対する TO 型プローブは、タンパク質に認識されること、タンパク質との共有結合形成に伴って蛍光強度が増大すること、標識後にリガンドが解離することの3点を満たすことが重要である。著者は、アルキンからアルケンへの構造変化を利用することで、以下の(1)~(4)の機構でタンパク質を蛍光標識できると考えた (Fig. 2)。(1) 標的タンパク質にリガンドが結合する (2) 近傍の求核性アミノ酸残基の付加反応によってアルキンがアルケンとなる (3) 分子内閉環反応が進行する (4) 蛍光性クマリンの形成と同時にリガンドがタンパク質から解離する。



以上を踏まえて、VDR の蛍光標識を目的とした7種のリトコール酸誘導体を設計・合成した (Fig. 3)。ESI-質量分析を用いて、VDR に対するクマリン修飾反応を解析した結果、すべての化合物で VDR のクマリン修飾とリトコール酸の解離が観測された。リトコール酸誘導体と反応させた VDR の蛍光スペクトルを評価した結果、反応後に蛍光強度が著しく増大したことから、TO 型プローブであることが示された。さらに、Lys 残基を含む5種のアミノ酸との反応が進行し、蛍光を示した。次に、TO 型プローブの選択性を検討した結果、大腸菌由来のタンパク質共存下でも、VDR を選択的に蛍光標識することができた。



### 【結論】

低分子化合物とタンパク質の共役付加反応を利用した2種類のタンパク質修飾法を提案した。本法は核内受容体にとどまらず様々なタンパク質へ応用することが可能であり、タンパク質の機能解明や医薬品開発に貢献できると考えられる。また、アルキンからアルケンへの構造変化を利用した TO 型プローブの開発に成功した。この結果は、TO 型プローブの分子設計に新たな知見を与えたと考えている。

### 【参考文献】

1) Zimmer, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759-781. 2) Lin, M. Z. et. al. *Physiology.* **2008**, *23*, 131-141. 3) Itoh, Y. et. al. *Y. J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820-5826. 4) Chan, J. et. al. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973-984. 5) Yamaguchi, T. et. al. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1021-1029.

### 【本研究の誌上発表】

**Kojima H.**, Itoh T., Yamamoto K. On-site reaction for PPAR $\gamma$  modification using a specific bifunctional ligand. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 6492-6500.