



Title	ボロン酸を捕捉補助基とするプローブ分子の合成と機能評価
Author(s)	郭, 修哈
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60082
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【2】

氏 名	郭 修 哈
博士の専攻分野の名称	博 士（薬学）
学 位 記 番 号	第 2 5 7 2 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 12 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	ボロン酸を捕捉補助基とするプローブ分子の合成と機能評価
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小林 資正 (副査) 教 授 藤岡 弘道 教 授 宇野 公之 教 授 小比賀 聡

論 文 内 容 の 要 旨

天然薬物資源から見出される活性天然物は、その化学構造の多様性と強力な生物活性から、今なお新しい医薬品やリード化合物の探索源として有用である。一方で近年、化学の視点から生命現象を解明していくケミカルバイオロジー研究が盛んに行われているが、天然活性化合物はその構造の複雑さ故、生体内の標的分子との間に鍵と鍵穴のような特異的な相互作用を形成することから、生体のシステムを研究するためのツールとしてだけでなく、種々の未知な細胞内情報伝達及び細胞機能の調節に関わる分子の働きを解明するケミカルツールとしても重要な役割を担ってきている。

ケミカルバイオロジー研究の一つに生物活性物質の作用メカニズムを解明するためのプローブ分子を用いた標的タンパク質の同定があげられる。天然より得られた生物活性物質を医薬リードへと展開するためには、その詳細な作用メカニズムを解明することが不可欠であり、そのための最も直接的かつ有効な方法は、活性物質由来のプローブ分子を用いて結合タンパク質を捕捉することである。

一般的に、標的タンパク質の同定に用いるプローブ分子は、活性物質に対してある程度の長さのリンカーを介してビオチンなどのタグを導入したアフィニティープローブが合成され、利用されている。細胞破碎液にプローブ分子を加えて標的タンパク質と結合させた後、アビジンビーズなどによるブルダウン、非特異結合したタンパク質の洗浄による精製などを経て、標的タンパク質の捕捉・同定が可能となる。一方で、このようなプローブ分子では、リンカーを含めたタグの導入により分子サイズが大きくなり、標的タンパク質との親和性が大きく低下することがある

ジアジリンやベンゾフェノンなどの光反応性基を導入したフォトアフィニティープローブが利用される場合はこれら光反応性基の嵩高さが標的タンパク質との結合に障害となったり、溶媒などタンパク質以外の様々な分子とも反応してしまうため、望みのタンパク質との結合率はそれほど高くはないと言われている。また、共有結合で不可逆的に結合していることが、後のタンパク質の構造解析において障害となる場合があるなど、不利な面も持ち合わせている。

このような問題点を解決するために、著者は、標的タンパク質との親和性を向上させるような官能基を組み込むことで機能が向上したプローブ分子を合成できるのではないかと考え、捕捉補助基となりうる官能基としてボロン酸基に着目した。

ボロン酸基のホウ素原子は電子不足で、空の2p軌道を有し、求核性のヘテロ原子と可逆的な共有結

合を形成する性質を有することが知られている。また、ボロン酸基の高いルイス酸性は、特別の活性化を必要とせずに各種アミノ酸残基と強く結合することが期待できる。従って、既存のプロープ分子の中の適当な位置にボロン酸基を導入すれば、プロープ分子のタンパク質捕捉能を向上させることが出来ると考えた。また、ボロン酸基とタンパク質との結合は可逆的であるため、適切な条件のもとで解離させることで標的タンパク質は天然型のままで得られることとなり、フォトアフィニティープロープの場合とは異なり、質量分析などによる構造解析には支障とならないと考えられる。

以上のことから、著者は、捕捉補助基としてボロン酸基を導入したプロープ分子を設計し、合成した。またボロン酸基を有する側鎖の導入によって、プロープ分子と標的タンパク質の親和性が向上するかどうかを検討した。

捕捉補助基としてのボロン酸の機能を検証するためのモデル実験として、グルタチオンをリガンドとするプロープ分子への適用を計画した。上杉らは、グルタチオンに対して、ポリエチレングリコールリンカーを介してピオチンタグを導入したプロープ分子が、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を過剰発現させた大腸菌の破碎液からGSTを捕捉し、精製できることを報告している。この分子の適当な位置にボロン酸基を導入したプロープ分子を合成することで、GSTの捕捉能が上がるかどうかを検討することとした。

ボロン酸基の導入には、側鎖末端にボロン酸基を有するアミノ酸誘導体をビルディングブロックとして用いることとした。側鎖の末端に二重結合を有するアミノ酸誘導体を原料とし、数工程を経て、目的とするボロン酸基を有するグルタチオンのアフィニティープロープ分子の合成に成功した。

合成したプロープを用い、GSTを過剰発現させた大腸菌の破碎液からGSTの精製を行うことで、その機能の評価した。その結果、ボロン酸基を分子の適切な位置に導入することでプロープ分子とGSTとの親和性が向上し、ボロン酸基はプロープ分子と標的タンパク質との結合をより強固にする捕捉補助基として非常に有用であることを見いだした。

さらに、より高機能なプロープ分子を効率的に見出すために、システインを母核とするプロープ分子の合成法を開発するとともに、さらなる親和性の向上のため、ボロン酸部分の構造最適化についても検討した。Boc基で保護したシスチン誘導体から、数工程を経て、システインを母核としたボロン酸基を有するグルタチオンのアフィニティープロープ分子の合成に成功した。ボロン酸基を有する側鎖の種類とタンパク質捕捉能との相関をみるため、構造の異なるボロン酸側鎖を有する計8種のプロープ分子を合成することにも成功した。その中でベンゼン環上に二個のボロン酸基を導入したプロープでは、GSTの捕捉能が最も強くなって、コントロールと比べて2.9倍になった。

このように、システインを母核として、種々のボロン酸基側鎖を有するプロープ分子を合成し、標的タンパク質の捕捉能の評価を通して、ボロン酸基をタンパク質捕捉補助基とするプロープ分子の有用性を証明することができた。

論文審査の結果の要旨

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プ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が、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。また現在も活性物質の標的分子を明らかにするための簡便な手法がないために、多くの研究者が標的分子の解析に多大な時間とエネルギーを費やしているのが現状である。申請者は、活性物質由来のプロープ分子を用いた標的分子同定のための簡便かつ一般性の高い手法が確立できれば、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。

一般的に、標的タンパク質の同定に用いるプロープ分子は、活性物質に対してある程度の長さのリンカーを介してピオチンなどのタグを導入したアフィニティープロープが合成されて利用されている

が、リンカーを含めたタグの導入により分子サイズが大きくなり、標的タンパク質との親和性が大きく低下することがある。一方、ジアジリンやベンゾフェノンなどの光反応性基を導入したフォトアフィニティープロープが利用される場合は、これら光反応性基の嵩高さが標的タンパク質との結合に障害となったり、溶媒などタンパク質以外の様々な分子とも反応してしまうため、望みのタンパク質との結合率はそれほど高くはないと言われている。

申請者はこのような問題点を解決するために、標的タンパク質との親和性を向上させるような官能基を組み込むことで機能が向上したプロープ分子を合成できるのではないかと考え、捕捉補助基となりうる官能基としてボロン酸基に着目した。ボロン酸基のホウ素原子は、求核性のヘテロ原子と可逆的な共有結合を形成することから、各種アミノ酸残基と結合することが期待できる。そこで、プロープ分子の適当な位置にボロン酸基を導入すれば、プロープ分子のタンパク質捕捉能を向上させることができ、また、ボロン酸基とタンパク質との結合が可逆的であるため、標的タンパク質の質量分析による解析には支障とならないと考えた。

そこで申請者は、捕捉補助基としてボロン酸基を導入したプロープ分子を設計・化学合成し、標的タンパク質の親和性が向上するかどうかを検討した。捕捉補助基としてのボロン酸の機能を検証するためのモデル実験として、グルタチオンをリガンドとし、標的分子のGST捕捉能が上がるかどうかを検討した。その結果、ボロン酸基を分子の適切な位置に導入することでプロープ分子とGSTとの親和性が向上することを見出した。さらに、より高機能なプロープ分子を効率的に見出すために、システインを母核とするプロープ分子の合成法を開発するとともに、さらなる親和性の向上のためにボロン酸部分の構造最適化についても検討し、構造の異なるボロン酸側鎖を有する計8種のプロープ分子を合成することにも成功した。その中でベンゼン環上に2個のボロン酸基を導入したプロープでは、GSTの捕捉能が最も強い捕捉能を示すことを見出した。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。