

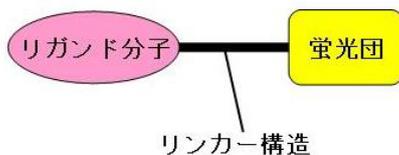
# エストロジールの non-genomic な生理機能の解析を志向した機能性分子の創製

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 分子設計分野  
平野 智也

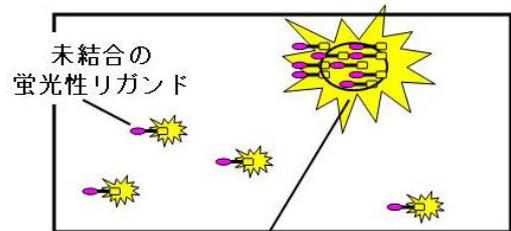
## 1. はじめに

特定の受容体蛋白質に選択的に結合し、その機能を制御するリガンド分子は、受容体蛋白質の生理的機能解析や、関与する疾患の治療薬開発において有用である。こうしたリガンド分子に蛍光団を結合させた蛍光性リガンドは、蛍光顕微鏡下で、リガンド分子が細胞内のどの受容体に結合し、どのような生理作用を引き起こしたかの、リアルタイムな解析を可能とする有用な機能性分子である(図1a, 1b)。しかし、こうした蛍光性リガンドの多くは、受容体蛋白質との結合で蛍光特性が変化しない。そのため、リガンド分子の生体内における結合部位を解析するためには、蛍光の集積のみに頼らざるえず、未結合の蛍光性リガンドに由来するバックグラウンド蛍光のため、感度および解像度が低下する問題点があった(図1c)。

(a) 蛍光性リガンドの一般的な構造

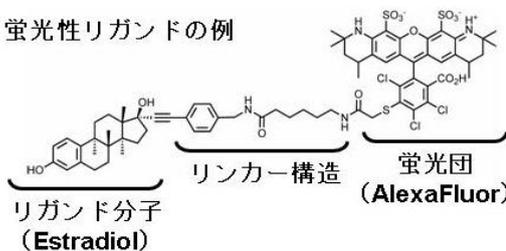


(c) リガンド分子の生体内における結合部位の蛍光イメージング



蛍光の集積からリガンド分子の生体内における結合部位を特定

(b) 蛍光性リガンドの例



### 問題点

未結合の蛍光性リガンド由来のバックグラウンド蛍光による解像度、測定感度の低下

(d) 本研究で開発を目指した蛍光性リガンドの一般的な構造



図1 蛍光性リガンドとその応用

本研究ではこうした問題点を解決するため、「受容体蛋白質との結合前後で蛍光特性が変化する蛍光性リガンドの開発」を行った。その作業仮説を図1dに示す。リガンド分子と蛍光団の間に、蛍光団と会合し、蛍光を消光する機能を持った消光団を適当な長さのリンカー構造を介して導入する。受容体蛋白質へ結合する前は、消光団と蛍光団が会合し蛍光が消光しているが、結合後は消光団、蛍光団周辺の環境変化等により会合が解消され、蛍光強度が増大することを期待した。こうした蛍光性リガンドを用いると、集積と蛍光

変化の2つにより、バックグラウンドが低減し、高感度かつ高解像度の検出が可能になると考えられる。

## 2. 方法、研究成果

図1dに示した分子において、最適の蛍光団、消光団のペアを探索すべく、蛍光団にTricarbocyanine類、Bodipy類、消光団に置換ベンゼン、naphthalene, anthracene, Dabcyl等を導入した化合物を種々合成し、その蛍光特性を検討した。その結果、図2に構造を示す蛍光物質にTricarbocyanine、消光団にDabcylを用いた化合物1が、「会合→会合解消」の前後で最も大きな蛍光強度の変化を示した。また化合物1は、表面の疎水性が一定値以上の蛋白質に結合して蛍光強度が変化しうることも見出した。こうした性質は特定の蛋白質に対する蛍光センサー開発へと繋がる知見となりえる(発表論文 1)。

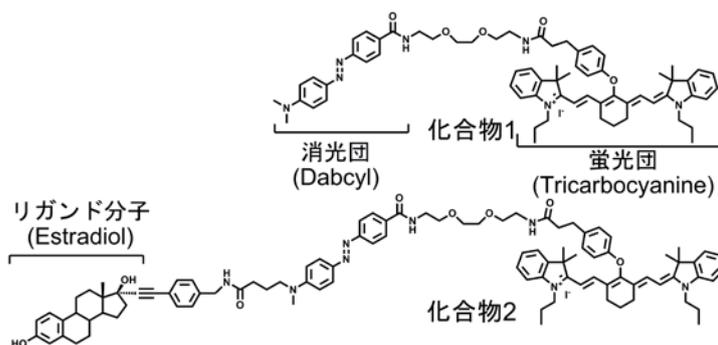


図2

続いて消光団の先に、核内受容体の一つであるエストロゲン受容体に対する内因性リガンドEstradiolを結合させた、蛍光性リガンドである化合物2も開発した。しかし予想に反して、化合物2は、エストロゲン受容体との結合による蛍光強度の変化は小さかった。これは、消光団とEstradiol間の構造が長すぎたため、受容体との結合が会合を解消させるに至らなかったと考え、現在、さらなる構造の最適化を進めている。

また、「受容体との結合前後で蛍光特性が変化する蛍光性リガンド」を、我々がこれまでに構築してきた「蛍光物質ライブラリー」を利用して、開発することを試みた。蛍光物質ライブラリーとは、多種類の蛍光物質からなる化合物群であり、各化合物により多彩な蛍光特性と構造を有する。図3aに示すように、我々がこれまでに構築してきた蛍光物質クマリンを母核とするライブラリー(参考論文 1)、2)、3))から、エストロゲン受容体と同じく核内受容体の一つである、プロゲステロン受容体に結合し、蛍光強度が増大する化合物3を見出すことに成功した(図3b、発表論文 3)。

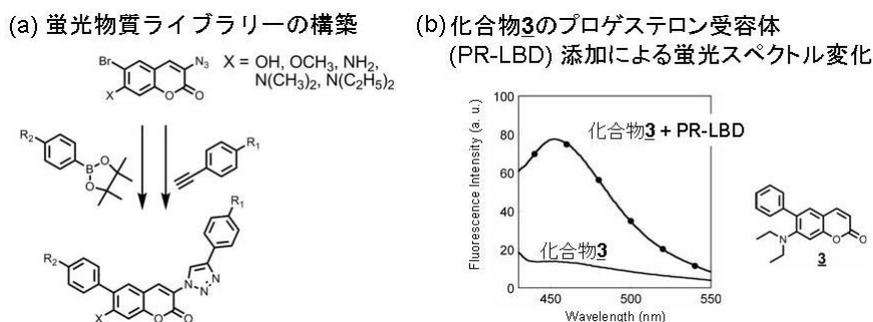


図3 プロゲステロン受容体に対する蛍光性リガンドの開発

今後、同様の手法を核内受容体ファミリーの他の受容体である、アンドロゲン受容体、ビタミンD受容体へと拡張し、様々な蛍光性リガンド分子開発および、それらを用いた生理機能解析を行う予定である。

### 3. まとめ

今回、受容体蛋白質として標的とした核内受容体は、ステロイドホルモンやビタミン等を内因性リガンド分子とする、リガンド依存性転写因子である。核内受容体の生理機能発現機構としてはリガンド分子の結合による、特定の遺伝子の転写活性化、翻訳を経る、“genomic”な作用機序が提唱されてきた。さらに、これに加えて、転写制御を介さない”non-genomic”な作用機序も提唱されている。こうした作用機序を明らかにすることは、細胞生物学のみならず、創薬化学の面でも急務となっている。本研究で開発を行った、蛍光性リガンド分子は、こうした分野において大きな進展をもたらす分子ツールとなりえる、と考えている。特に、図3に示した蛍光物質ライブラリーを用いる手法は、核内受容体にとどまらず、他の受容体蛋白質ファミリー、酵素群の局在を明らかにする機能性蛍光物質開発にも有用である。我々が既に阻害剤開発を進めているヒストンメチル化酵素(発表論文 2))等の分野にも応用し、様々な機能性分子開発の一般的な方法論とすることを目指していきたい。

### 4. 発表論文、参考文献

<発表論文>

・原著論文

- 1) **Hirano, T.**, Akiyama, J., Mori, S., Kageshika, H. “Modulation of Intramolecular Heterodimer-induced Fluorescence Quenching of Tricarbocyanine Dye for the Development of Fluorescent Sensor” *Org. Biomol. Chem.* **8**, 5568-5575 (2010).
- 2) Mori, S., Iwase, K, Iwanami, N., Tanaka, Y., Kagechika, H., **Hirano, T.** “Development of Novel Bisubstrate-type Inhibitors of Histone Methyltransferase SET7/9” *Bioorg. Med. Chem.***18**, 8158-8166 (2010).

・特許

- 3) 「PRアンタゴニスト活性を有するクマリン誘導体」、特願2010-43034、発明者: 棚谷綾、酒井悠、影近弘之、**平野智也**

・総説

- 4) **Hirano, T.** and Kagechika, H. “Thyromimetics: a Review of Recent Reports and Patents (2004 - 2009)” *Exp. Op. Ther.Patents*, **20**, 213-228 (2010).

<参考論文、特許>

- 1) **Hirano, T.** and Kagechika, H. “Construction of Coumarin Library for Development of Fluorescent Sensors.” In *Combinatorial Methods for Chemical and Biological Sensors*, Chapter 18, 441-451. Edited by Radislav A. Potyrailo and Vladimir M. Mirsky, Springer/Kluwer. (2009).
- 2) **Hirano, T.**, Hiromoto, K. and Kagechika, H. “Development of a Library of 6-Arylcoumarins as Candidate Fluorescent Sensors.” *Org. Lett.* **9**, 1315-1318 (2007).
- 3) 「クマリン誘導体及びその用途」、特願 2007-043878、発明者: 影近弘之、**平野智也**