

# イソレスペデジン酸カリウムを基盤とした機能性分子プローブの開発

著者	藤井 智彦
号	51
学位授与番号	2432
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/39500">http://hdl.handle.net/10097/39500</a>

氏名・(本籍)	ふじ い とも ひこ 藤 井 智 彦
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理博第2432号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)化学専攻
学位論文題目	イソレスペデジン酸カリウムを基盤とした機能性分子プローブの開発
論文審査委員	(主査) 教授 上田 実 教授 寺田 眞浩 教授 磯部 寛之

## 論文目次

- § 1. 序論 マメ科植物の就眠運動
- § 2. ビオチン型光親和性プローブの開発と受容体タンパク質の化学発光検出
- § 3. Staudinger プローブの開発及び Staudinger ligation を利用した精製法の研究
- § 4. MACS システムを用いた受容体タンパク質の精製法の研究
- § 5. 結語
- § 6. 実験項
- 参考文献
- 謝辞

## 論文内容要旨

マメ科植物は日中に葉を開き、夜になると葉を閉じる一日周期の葉の開閉運動、即ち就眠運動を行う。この運動は葉枕部に存在する運動細胞が概日リズムで膨潤・収縮することで引き起こされる。即ち、生物時計によって濃度バランスを制御された就眠物質と覚醒物質という二種の生理活性物質が、運動細胞上のイオンチャネルの開閉を制御することで細胞の膨潤・収縮をコントロールしていると考えられる。これまでの研究によって就眠・覚醒の二種の活性物質は運動細胞に直接作用することが明らかとなっており、運動細胞膜表面に活性物質受容体が存在していると考えられた。そこで、就眠運動の機構解明を目的とし、覚醒物質イソレスペデジン酸カリウムを基盤とした各種機能性プローブ分子の開発及びこれらを用いた受容体の探索・同定を行った。

まず、受容体タンパク質の検出を目的とし、ビオチン型光親和性プローブを設計した。本プローブにより、受容体タンパク質を特異的にビオチン標識化し、化学発光による検出を行うこととした。イソレスペデジン酸カリウムは配糖体型化合物であり、糖部分を修飾しても活性に影響しないことが構造活性相関研

究により明らかとなっている。そこで糖部分へ光親和性基ベンゾフェノン基と検出のためのビオチンをそれぞれ導入し、ビオチン型光親和性プローブの設計・合成を行った。ビオチン型光親和性プローブは $1 \times 10^{-4}$  M と、天然物（活性値  $1 \times 10^{-6}$  M）の100倍の濃度で葉を開かせる活性を示した。続いてビオチン型光親和性プローブを用いて受容体タンパク質の光ラベル化実験を行った。カワラケツメイ葉枕より調整した運動細胞膜画分にビオチン型光親和性プローブを加え、光照射、SDS-PAGE 電気泳動及び化学発光検出を行った結果、210, 180 kDa 付近に、過剰量の天然物共存下で特異的に消失するバンドが検出された。これらのタンパク質は葉肉細胞から調製した膜画分中からは検出されず、ビオチン型光親和性プローブの活性部位を修飾した非活性型プローブでは検出されなかった。運動細胞への局在性と、プローブの活性に基づいて検出されていることから、検出された210, 180 kDaのタンパク質は覚醒物質受容体としての性質を示しており、真の覚醒物質受容体としての可能性が大きいと判断した。そこで、次に本タンパク質の一次配列解析のための精製法の開発を行った。

化学発光検出の結果、低分子量側に多数の夾雑ビオチン化タンパク質が検出された。これらの夾雑物には非特異的にビオチン型光親和性プローブにより非特異的にラベル化されたものの他に内生のStreptavidine 結合タンパク質が含まれていると考えられるため、ビオチン-アビジン結合は受容体タンパク質の精製法として適さないと考えられた。そこで新規精製法として、天然に存在しない標識分子であるアジド基を用い、Staudinger ligation を利用した精製法を考案した。Staudinger ligation とはアジド基とトリフェニルホスフィン間の反応を利用した ligation 法であり、生体環境下においても特異的に反応が進行することが特徴とされる。そこで、アジド基を標識分子として有する Staudinger プローブを設計・合成し、これを用いて受容体をアジド標識化後、表面にトリフェニルホスフィン基を有するマトリクスに Staudinger ligation により結合して夾雑物を洗浄除去・溶出する Catch and Release 精製法を行うこととした。また、Staudinger プローブの設計時、種々のアジド化合物を用いたモデル実験を行い、Staudinger ligation に適したアジド基周辺構造を検討した。この結果、アジド基の隣接部位にアミド結合を有した $\alpha$ -アジドアセトアミドが素早い Staudinger ligation に適した構造であることが分かった。この構造ではアジド基付け根の窒素とアミド結合の水素とが水素結合により五員環を形成し、遷移状態を安定化させることで反応性が向上していることが DFT 軌道計算の結果より推定された。また、Staudinger プローブとマトリクスを用いたコントロール実験を行い、Catch and Release 精製法が意図通りに進行していることを確認した。

コントロール実験の成功を受け、実際に植物材料として調製膜画分を用いて Staudinger プローブを用いて受容体の光ラベル化及び精製を行った。しかし、非特異的光ラベル化による夾雑タンパク質が多く、銀染色バックグラウンドが高く、また210, 180 kDaの受容体タンパク質のバンドも検出されなかった。これは調製膜画分に含まれる原形質以外の膜画分に対して非特異的ラベル化が多く、非特異的ラベル化タンパク質が検出されているためと考え、受容体への特異的光ラベル化収率の向上を狙い、細胞壁を除去した単細胞系である運動細胞プロトプラストを用いることとした。この結果、調製膜画分を用いた際に検出された高バックグラウンドは消失した一方、210, 180 kDaの受容体タンパク質のバンドも精製画分から検出されなかった。蛍光プローブを用いた調査の結果、運動細胞プロトプラスト上において受容体タンパク質が失活していると考えられた。そこで、受容体を失活させずにプロトプラスト化する調製法を検討したが、確立が困難であったため、植物材料を調製膜画分に戻し、新規光親和性プローブを用いた新規精製法を開発することとした。また、用いる光親和性プローブの標識分子として蛍光色素を用い、葉枕部薄切片を用いた運動細胞の蛍光染色実験により、受容体の光ラベル化を確認することとした。これらの条件を満たす精製法として、磁性体標識分子の分離法である MACS システム精製法を検討することとした。

MACS システム (Magnetic Cell Sorting and Separation of Biomolecules System) は目的分子を磁性体標識化し、磁場カラム中に保持させることで分離を行う精製法である。蛍光色素 FITC を有する FITC 型光親和性プローブにより切片レベルにおいて光ラベル化進行を確認した後、膜画分中の受容体を FITC によって光ラベル化、更に抗 FITC マイクロビーズにより磁性体標識化を行い、MACS システムによる精製を検討した。MACS システムにより分離した磁性体標識化分子を含む保持画分を銀染色によって検出した結果、180 kDa の受容体タンパク質バンドが検出された。また、非保持画分中にはこのバンドが確認されず、高収率で光ラベル化されていると考えられた。一方で、210 kDa のバンドは今回検出されず、また低分子領域に非特異的ラベル化タンパク質と考えられるバンドが検出されており、受容体の完全な単一精製には至らなかった。以上のように、覚醒物質イソレスペデジン酸カリウムを基盤とした各種機能性プローブ分子の開発と、これらを用いて覚醒物質受容体の検出を達成した。

## 論文審査の結果の要旨

藤井智彦の論文は、マメ科植物の就眠運動という生命現象の機構解明を、生理活性を有する低分子化合物をツールとして用いる生物有機化学的見地によって解明を目指すものである。生命現象を引き起こす内因性の低分子生理活性物質、イソレスペデジン酸カリウムを基盤として合理的にデザインした各種プローブ化合物を合成し、マメ科植物カワラケツメイの葉枕部運動細胞上に存在する、覚醒物質受容体タンパク質を検出することに成功した。

ビオチンを標識分子とした光親和性プローブを用い、210, 180 kD の受容体候補タンパク質を化学発光により検出した。また、本タンパク質の機構解明のための精製を目指し、Staudinger ligation を利用した精製法を開発した。この過程において、Staudinger ligation に適したアジド基周辺構造についての知見を得、また、自ら立案した精製法スキームのモデル実験に成功した。

更に、MACS システムを利用した精製法開発研究において、受容体タンパク質を蛍光色素 FITC で標識化した後、磁性体粒子による二次標識を行い、180 Da の受容体タンパク質を検出した。

以上、本論文は、生物現象の有機化学的解明を目指す生物有機化学分野におけるひとつの方向性を示す成果であり、著者が自立した研究者として研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有していることを示している。従って、藤井智彦提出の論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。