

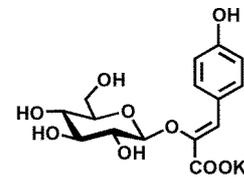
# Click chemistry を利用したイソレスペデジン酸カリウム標的タンパク質の探索

○真鍋良幸・上田 実 (東北大院理)

イソレスペデジン酸カリウム (1) はカワラケツメイの就眠運動をコントロールする生理活性物質である。我々は分子プローブを用いて、1 の標的タンパク質を抗原性ペプチド (FLAG) で標識し、免疫沈降法を用いて精製しようと考えた。FLAG は特異性の高い優れた標識であるが、分子サイズが大きく、これを導入することにより、分子プローブと標的タンパク質との結合能の低下が予想された。そこで、アジドを導入したサイズの小さな分子プローブを用いて標的タンパク質をアジド標識化し、Click chemistry を用いて段階的に FLAG を導入することとした。この方法を用いることで、標的タンパク質との結合能が高いプローブを用いた FLAG 標識化が可能となると考えた。

分子プローブとして化合物 2 を設計し、合成した。プローブ 2 にはタンパク質中のチオール基と反応するヨードアセトアミド基を導入した。合成した 2 は、 $3 \times 10^{-6}$  M でカワラケツメイの葉を開かせる活性を示した。これは天然物の活性値の 3 倍の値であり、活性をほぼ保持したままのプローブ化に成功した。

続いて、化合物 1 の標的細胞である運動細胞をプロトプラスト化し、合成したプローブを用いた標的タンパク質の標識化実験を行った。運動細胞プロトプラストをプローブ 2 とインキュベートすることにより標的タンパク質をアジド標識化し、続いて Click chemistry を用いて FLAG を導入した。得られた反応物を細胞質画分と膜画分に分画したあと、各々を SDS-PAGE で分析した。その結果、細胞質画分に 1 の標的として、分子量 83 kDa の FLAG 標識化タンパク質が検出された (図 1)。続いて、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法によって、このタンパク質を精製することに成功した。このように、Click chemistry を用いる標的タンパク質の FLAG 標識化は、生理活性天然物の標的検出と精製に利用できる強力な手法であることが示された。水溶性の 1 は、細胞膜を透過することはできないと考えられることから、膜上に存在するトランスポーター<sup>1)</sup> を介して運動細胞内に取り込まれ、細胞質内の標的タンパク質に結合することで葉を開かせる活性を発現するという機構が示唆された。



イソレスペデジン酸カリウム (1)

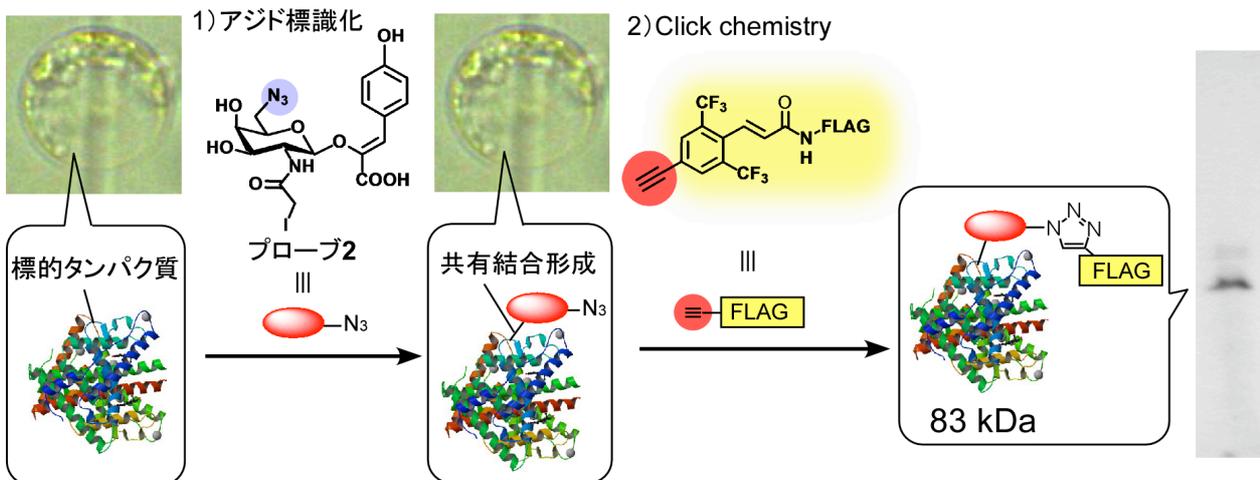


Fig.1 Click chemistry を利用した標的タンパク質の FLAG 標識化

1) T. Fujii, Y. Manabe, T. Sugimoto, M. Ueda, **61**, 7874-7893 (2005).