

Title	オートファジー活性をリアルタイムにモニターする蛍光プローブの開発
Sub Title	Development of fluorescent probes for real-time monitoring of autophagy
Author	大江, 知之(Ohe, Tomoyuki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>オートファジーは、損傷したオルガネラなどを細胞内で選択的に分解する機能であるが、不明なところも多く、オートファジー活性をリアルタイムにモニターできる手法の開発が強く求められている。一方、Keap1は生体防御遺伝子の発現に関わるNrf2を抑制するタンパク質である。我々の共同研究者である順天堂大学の小松らは、Keap1はオートファジーにより分解され、オートファジーが減弱するとKeap1が細胞内に蓄積することを明らかにしてきた。すなわち、オートファジー活性とKeap1量は逆相関すると言える。そこで、Keap1に結合する化合物に蛍光団を導入すれば、オートファジー検出の蛍光プローブになり得ると考えた。我々は、以前15万を超えるライブラリー化合物のスクリーニングの結果、Keap1-Nrf2を阻害する化合物K67を得ている。そして、K67のさらなる構造展開により、K67よりも阻害活性が強い化合物Aを見出している。本研究では、このKeap1と強力に結合する化合物Aを基盤に蛍光団を導入した化合物1-3をデザイン・合成を行い、それらの評価を行った。</p> <p>まず、4-nitro-1-naphthylamineから化合物Aやその類縁体を合成し、別途合成したBODIPY骨格を有する蛍光団を縮合させ、化合物1, 2を得た。水溶性を向上させる目的でリンカーとしてPEGを導入した化合物3の合成では、まずPEGユニットの原料となるAmino-PEG2-acidと化合物Aを縮合し、その後BODIPY骨格を有する蛍光団を縮合した。</p> <p>化合物1-3の蛍光スペクトルを測定したところ、細胞内蛍光プローブとして適切な蛍光特性(励起、蛍光波長 500-700 nm)を持つことが示された。また、化合物1-3の細胞内移行検討では、Huh-1細胞内あるいは細胞膜上への移行を確認した。一部顆粒状の蛍光が見られたため、Keap1へ局在をしている可能性がある。今後詳細を検討していく必要がある。</p> <p>Autophagy is intracellular degradation process for dysfunctional organelles, however, there are lots of unclear points at the moment and it is highly needed to develop efficient methods for real-time monitoring autophagy. Keap1 is a negative regulator of Nrf2, a transcription factor essential for expression of cell defense genes. Our group found that Keap1 is degraded through the autophagy pathway and accumulated when autophagy is impaired. In this research, we designed and synthesized fluorescent probes (compounds 1-3) for real-time monitoring of autophagy on the basis of compound A, a potent Keap1-Nrf2 inhibitor which we have previously discovered. Compound A and its analogue were synthesized from 4-nitro-1-naphthylamine, followed by the introduction of BODIPY, a fluorescent unit, to form compounds 1 and 2, respectively. To improve the aqueous solubility, compound 3 containing PEG as a linker was designed. After the condensation of amino-PEG2-acid and compound A, BODIPY was introduced to obtain compound 3.</p> <p>Fluorescent spectra of compounds 1-3 demonstrated that they have appropriate features for intracellular imaging in living cells (excitation and emission wavelength: 500-700 nm). Fluorescence microscopy imaging showed that compounds 1-3 are distributed to membranes or the inside of cells, when they were added to Huh-1 cells. Moreover, bright and granular fluorescence was observed, suggesting that the probes might be localized to Keap1 proteins. Further studies are now in progress.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190166

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	准教授	補助額	500（特B）千円
	氏名	大江 知之	氏名（英語）	Tomoyuki Ohe		
研究課題（日本語）						
オートファジー活性をリアルタイムにモニターする蛍光プローブの開発						
研究課題（英訳）						
Development of fluorescent probes for real-time monitoring of autophagy						
1. 研究成果実績の概要						
<p>オートファジーは、損傷したオルガネラなどを細胞内で選択的に分解する機能であるが、不明なところも多く、オートファジー活性をリアルタイムにモニターできる手法の開発が強く求められている。一方、Keap1 は生体防御遺伝子の発現に関わる Nrf2 を抑制するタンパク質である。我々の共同研究者である順天堂大学の小松らは、Keap1 はオートファジーにより分解され、オートファジーが減弱すると Keap1 が細胞内に蓄積することを明らかにしてきた。すなわち、オートファジー活性と Keap1 量は逆相関すると言える。そこで、Keap1 に結合する化合物に蛍光団を導入すれば、オートファジー検出の蛍光プローブになり得ると考えた。我々は、以前 15 万を超えるライブラリー化合物のスクリーニングの結果、Keap1-Nrf2 を阻害する化合物 K67 を得ている。そして、K67 のさらなる構造展開により、K67 よりも阻害活性が強い化合物 A を見出している。本研究では、この Keap1 と強力に結合する化合物 A を基盤に蛍光団を導入した化合物 1-3 をデザイン・合成を行い、それらの評価を行った。</p> <p>まず、4-nitro-1-naphthylamine から化合物 A やその類縁体を合成し、別途合成した BODIPY 骨格を有する蛍光団を縮合させ、化合物 1, 2 を得た。水溶性を向上させる目的でリンカーとして PEG を導入した化合物 3 の合成では、まず PEG ユニットの原料となる Amino-PEG2-acid と化合物 A を縮合し、その後 BODIPY 骨格を有する蛍光団を縮合した。</p> <p>化合物 1-3 の蛍光スペクトルを測定したところ、細胞内蛍光プローブとして適切な蛍光特性（励起、蛍光波長 500-700 nm）を持つことが示された。また、化合物 1-3 の細胞内移行検討では、Huh-1 細胞内あるいは細胞膜上への移行を確認した。一部顆粒状の蛍光が見られたため、Keap1 へ局在をしている可能性がある。今後詳細を検討していく必要がある。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>Autophagy is intracellular degradation process for dysfunctional organelles, however, there are lots of unclear points at the moment and it is highly needed to develop efficient methods for real-time monitoring autophagy. Keap1 is a negative regulator of Nrf2, a transcription factor essential for expression of cell defense genes. Our group found that Keap1 is degraded through the autophagy pathway and accumulated when autophagy is impaired. In this research, we designed and synthesized fluorescent probes (compounds 1-3) for real-time monitoring of autophagy on the basis of compound A, a potent Keap1-Nrf2 inhibitor which we have previously discovered.</p> <p>Compound A and its analogue were synthesized from 4-nitro-1-naphthylamine, followed by the introduction of BODIPY, a fluorescent unit, to form compounds 1 and 2, respectively. To improve the aqueous solubility, compound 3 containing PEG as a linker was designed. After the condensation of amino-PEG2-acid and compound A, BODIPY was introduced to obtain compound 3.</p> <p>Fluorescent spectra of compounds 1-3 demonstrated that they have appropriate features for intracellular imaging in living cells (excitation and emission wavelength: 500-700 nm). Fluorescence microscopy imaging showed that compounds 1-3 are distributed to membranes or the inside of cells, when they were added to Huh-1 cells. Moreover, bright and granular fluorescence was observed, suggesting that the probes might be localized to Keap1 proteins. Further studies are now in progress.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			