

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01940

研究課題名(和文) マルチタグ導入可能化合物を利用した光アフィニティーラベル法による迅速機能解析

研究課題名(英文) Rapid analysis of photoaffinity label components by probes with multiple tag

研究代表者

橋本 誠 (Hashimoto, Makoto)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90292094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性物質機能解析法の一つである光アフィニティーラベルにおいてラベル後の検出の為タグを導入する必要があるが、母核構造に大きな化学修飾を施した場合親和性等への影響が心配される。近年photoaffinity label後にタグを導入するポストファンクショナル法がよく利用されているが、1種類の検出タグの利用するにとどまっているため複数タグ導入可能な骨格が有用と考えた。光照射側鎖切断可能であることを明らかとした α -アミノフェニルケトン骨格中の選択的切断の達成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光アフィニティーラベルは「合成した生理活性物質誘導体は光照射まで標的生体高分子に対し元となる生理活性物質とほぼ同様な挙動を示し、通常の生化学的手法により取り扱いができる」事が利点であり幅広く利用されている。その一方「生理活性物質骨格に光反応性基ならびにラベル後解析の目印となるタグを導入する必要があり、生体高分子との親和性に影響を及ぼす可能性がある」事が問題として挙げられる。申請者をはじめ国内外の多くの研究者が、生理活性物質の誘導体化時の構造変化を最小限にとどめ、光照射後に解析用タグを有機化学的手法により導入する方法の確立に成功し、生理活性物質の機能解析の効率化に成功した。

研究成果の概要(英文)：The detection tags are essential for photoaffinity labeling, which is one of the most reliable methods to elucidate of ligand biological activities. Post-derivatization for the ligand structure of photoaffinity probes are one of the fashion to detect photo labeled components. But isolations of photo labeled components are not easy due to there is no effect methods to isolate the small amounts of labeled components. We found that α -aminoketone structure was utilized to cleave specifically by photo-irradiation with different wavelength from photoaffinity labeling. Irradiations with different wavelength is easy to handle to elucidate the ligand-biomolecules relationship.

研究分野：生体関連化学

キーワード：光アフィニティーラベル 機能解析 生理活性物質 生理活性発現 構造活性相関 機能分子解析
ジアジリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生理活性物質の機能解析法の一つとして光アフィニティーラベルが頻りに利用されている。これは生理活性物質中に、光照射により高反応性の分子種を発生させる前駆体(光反応性基)を導入する。その誘導体を蛋白質などの生体高分子との親和性により複合体を形成し、通常生理活性発現後解離してしまうところを、光照射により生体高分子の活性部位と生理活性物質との間に共有結合を形成しそれを解析することで生理活性発現に重要な基質家都合部位など、生理活性物質 生体高分子複合体の情報を得るものである。申請者は光アフィニティーラベルに必要な光反応性基の合成・生理活性物質への導入から、その誘導体を用いた対象生体高分子の機能解析まで一貫して行うことで、実際の解析時に直面した問題点を(有機)化学的な観点から改良を続け、光アフィニティーラベルに関し 60 報以上の国内外雑誌へ原著論文として報告し、その網羅的な検討を実施することで、海外雑誌から執筆依頼を受け 2 つの総説としてまとめ、それらは国内外で発表される光アフィニティーラベル関連論文に数多く引用されている。またシンポジウムや企業からの講演依頼も数多くこなしており、申請者の光アフィニティーラベルに関するその合成から応用にいたるまでの研究は国内外において高い評価を受けている。

2. 研究の目的

生理活性物質機能解析法の一つである光アフィニティーラベル(PAL)においてラベル後の検出の為タグを導入する必要があるが、母核構造に大きな化学修飾を施した場合親和性等への影響が心配される。近年 PAL 後にタグを導入するポストファンクショナル法が頻りに利用されているが、1 種類の検出タグの利用するにとどまっている。PAL のもう一つの利点とされている、光ラベルされた活性部位の単離・精製・同定への展開するためには、導入後切断可能な部位を持つ、複数タグ導入可能な骨格が有用と考えた。-アミノ酸から導かれる -アミノフェニルケトン骨格がここで求められる分解・切断の特徴を持つことを申請者はごく最近見出し、この骨格による新規複数タグ導入可能ポストファンクショナル法の開発並びに PAL 活性部位単離への利用を検討する。(図 1)

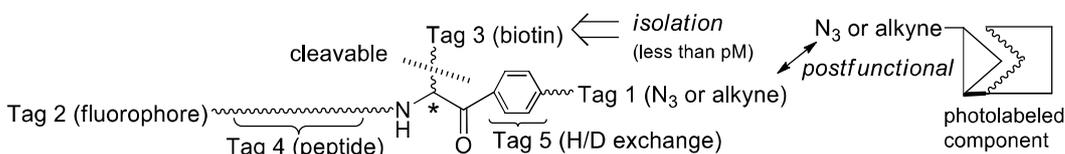


図 1 -アミノフェニルケトン骨格による切断可能型ポストファンクショナル化合物利用の概念図

3. 研究の方法

- 1) -アミノ酸から効率的な -アミノフェニルケトン骨格合成の確立およびその水溶液中での光分解反応による -アミノ酸側鎖構造による特異性の検討
- 2) -アミノフェニルケトン骨格への複数タグ導入法の確立と希薄濃度における切断効率検討
- 3) 固定化担体を利用した導入タグ特異的(アビジン - ビオチン系)相互作用による精製法の検討ならびに回収率 (= 切断効率) の検討

4. 研究成果

1) 効率的な -アミノフェニルケトン骨格、ならびに光反応性基の簡略合成法を検討した。その結果これまでペプチド合成に利用されていたスクシンイミドエステルが、そのよい脱離能を利用することで、フリーでルクラフト反応のアシルドナーとして利用可能であることを見出した、これを一般的に利用される酸クロライドとの比較検討を行ったところ、大きな反応性の違いは認められず、安定性・保存性を考慮した際にスクシンイミドエステルが優れた前駆体として利用可能であることを明らかとした(図 1)。

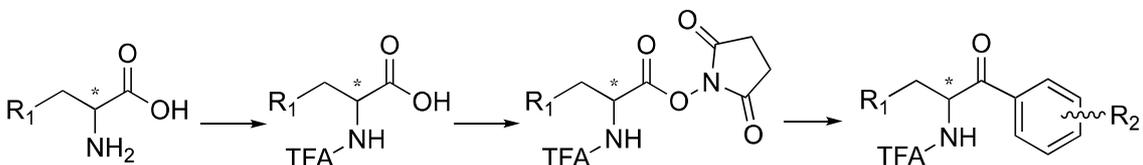


図 1 入手容易な -アミノ酸骨格を利用した新規 -アミノフェニルケトン骨格の立体選択的合成

2) 合成に成功した -アミノフェニルケトン骨格の光照射による側鎖切断反応を検討した。実際の生体分子の解析を視野に入れ、リジン由来の -アミノフェニルケトン誘導体を用い希薄水溶液中における光照射反応に供したところ、主鎖の切断よりもすばやく側鎖の切断が観察され、これまでに無い効率的な解離方法が可能であることを明らかとした。他のアミノ酸由来の -アミノフェニルケトンも同様な切断が可能であることもあわせて確認した。

3) 光照射側鎖切断可能であることを明らかとした -アミノフェニルケトン骨格中へのビオチン分子の導入を検討した。反応合成時の等量を詳細に検討する事で効率的反応を達成し、精製においてはビオチン分子の低い溶解性のため、大量合成した化合物の精製方法に問題が生じたが、各種有機溶媒を組み合わせることで効率的な精製法の確立に成功し、光照射によりビオチン分子が効率的に解離する事を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hashimoto Makoto, Puteri Tachrim Zetryana, Oida Kazuhiro, Ohashi Fumina, Wakasa Haruna, Ikemoto Haruka, Kurokawa Natsumi, Sakihama Yasuko, Hashidoko Yasuyuki, Suzuki Takeyuki	4. 巻 97
2. 論文標題 TFA-Protected α -Amino Acid N-Hydroxysuccinimide Ester: Application for Inter- and Intramolecular Acylation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 877 ~ 877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-18-S(T)65	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tachrim Zetryana Puteri, Nakamura Tadashi, Sakihama Yasuko, Hashidoko Yasuyuki, Hashimoto Makoto	4. 巻 2018
2. 論文標題 Application of Appel reaction to the primary alcohol groups of fructooligosaccharides: Synthesis of 6,6',6''-trihalogenated 1-kestose derivatives	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arkivoc	6. 最初と最後の頁 341 ~ 348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24820/ark.5550190.p010.706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang Lei, Tachrim Zetryana Puteri, Kurokawa Natsumi, Ohashi Fumina, Wakasa Haruna, Sakihama Yasuko, Hashidoko Yasuyuki, Suzuki Takeyuki, Hashimoto Makoto	4. 巻 2018
2. 論文標題 Optimization of sucrose 1?-position modification with 3-(trifluoromethyl)diazirinyI benzylbromide derivatives for photoaffinity labeling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arkivoc	6. 最初と最後の頁 58 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24820/ark.5550190.p010.668	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Shiori, Tachrim Zetryana, Kurokawa Natsumi, Ohashi Fumina, Sakihama Yasuko, Suzuki Takeyuki, Hashidoko Yasuyuki, Hashimoto Makoto	4. 巻 23
2. 論文標題 pH Stability and Antioxidant Power of CycloDOPA and Its Derivatives	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1943 ~ 1943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23081943	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Lei, Ishida Akiko, Hashidoko Yasuyuki, Hashimoto Makoto	4. 巻 56
2. 論文標題 Dehydrogenation of the NH ₂ NH Bond Triggered by Potassiumtert-Butoxide in Liquid Ammonia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 870 ~ 873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201610371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Akiko, Wang Lei, Tachrim Zetryana Puteri, Suzuki Takeyuki, Sakihama Yasuko, Hashidoko Yasuyuki, Hashimoto Makoto	4. 巻 2
2. 論文標題 Comprehensive Synthesis of Photoreactive Phenylthiourea Derivatives for the Photoaffinity Labeling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 160 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.201601675	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makoto Hashimoto, Takuma Yoshida, Zetryana Puteri Tachrim, YasukoSakihama, Yasuyuki Hashidoko, Yasumaru Hatanaka, Yuichi Kanaoka	4. 巻 95
2. 論文標題 Synthesis of Photophore and Fluorophore Modified O-Benzylserine Derivatives	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 462 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-16-S(S)37	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Lei, Tachrim Zetryana Puteri, Kurokawa Natsumi, Ohashi Fumina, Sakihama Yasuko, Hashidoko Yasuyuki, Hashimoto Makoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Base-Mediated One-Pot Synthesis of Aliphatic Diazirines for Photoaffinity Labeling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1389 ~ 1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules22081389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tachrim Zetryana, Oida Kazuhiro, Ikemoto Haruka, Ohashi Fumina, Kurokawa Natsumi, Hayashi Kento, Shikanai Mami, Sakihama Yasuko, Hashidoko Yasuyuki, Hashimoto Makoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Synthesis of Chiral TFA-Protected α -Amino Aryl-Ketone Derivatives with Friedel-Crafts Acylation of α -Amino Acid N-Hydroxysuccinimide Ester	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1748 ~ 1748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules22101748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tachrim Zetryana, Wang Lei, Murai Yuta, Yoshida Takuma, Kurokawa Natsumi, Ohashi Fumina, Hashidoko Yasuyuki, Hashimoto Makoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Trifluoromethanesulfonic Acid as Acylation Catalyst: Special Feature for C- and/or O-Acylation Reactions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Catalysts	6. 最初と最後の頁 40 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/catal7020040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Z. P. Tachrim, Y. Hashidoko, M. Hashimoto
2. 発表標題 Stereo-controlable α -amino aryl ketone formation: α -Amino N-hydroxysuccinimide ester derivatives as acyl donor for Friedel-Crafts acylation
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. HASHIMOTO, L. Wang, Y. Hashidoko
2. 発表標題 芳香族アミノ酸への光反応性基導入法の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川詩織、Zetryana Puteri Tachrim、崎浜靖子、橋床泰之、橋本 誠
2. 発表標題 cycloDOPA誘導体のpH安定性とその抗酸化能
3. 学会等名 日本農芸化学会東北・北海道合同支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋史奈、橋床泰之、橋本 誠
2. 発表標題 光学活性N-トリフルオロアセチルフェニルグリシンスクシンイミドエステルの合成とペプチド合成への応用
3. 学会等名 日本農芸化学会東北・北海道合同支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 種田 和洋, 橋床 泰之, 橋本 誠
2. 発表標題 Friedel-Crafts反応による α -アミノ芳香族ケトンの合成とその光分解反応の検討
3. 学会等名 平成29年度 公益社団法人 日本農芸化学会 北海道支部第2回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒川菜摘, 橋床泰之, 橋本 誠
2. 発表標題 メチオニンを利用したFriedel-Craftsアシル化反応の検討
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第7回学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大橋史奈, 橋床泰之, 橋本 誠
2. 発表標題 N-アシル-フェニルグリシン-スクシニミドエステルの立体選択的合成
3. 学会等名 平成29年度 日本農芸化学会 北海道支部第1回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ゼトリアナ プテリ タクリム、武藤美帆、中村 正、橋床 泰之、橋本 誠
2. 発表標題 スクロース1級水酸基のAppel試薬によるハロゲン化反応の検討
3. 学会等名 第36回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. HASHIMOTO, L. Wang, Y. Hashidoko
2. 発表標題 芳香族アミノ酸への光反応性基導入法の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hatanaka Yasumaru., Hashimoto Makoto 編集	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 265
3. 書名 Photoaffinity Labeling for Structural Probing Within Protein	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北大院農 生態化学生物学 化学生物学G ブログ
<http://lme2.blog.fc2.com/>
北大院農 生態化学生物学 化学生物学G ブログ
<http://lme2.blog.fc2.com/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----