

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510210
 研究課題名(和文) 核酸—生体高分子相互作用解析を目指した光アフィニティーラベル法の開発
 研究課題名(英文) Investigations of photoaffinity labeling for analysis of nucleotide-biomolecular interactions
 研究代表者
 橋本 誠 (HASHIMOTO MAKOTO)
 国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・准教授
 研究者番号：90292094

研究成果の概要：

プラチナ含有エチレンジアミン化合物骨格が核酸親和性を持つことを利用し、核酸—生体高分子相互作用解析を行うための新規光アフィニティーラベル用 trifluoromethylphenyldiazirine 誘導体の合成反応を検討した。プラチナ含有エチレンジアミン化合物骨格に、最終段階で trifluoromethylphenyldiazirine を導入する方法を選択し、効率よく光反応性基を持つ2価プラチナ化合物の合成に成功し、その性質を検討した。光分解性については、350nm 付近の照射によりカルベンが発生し標的分子との間にクロスリンク反応が半減期は約3分で進行することを確認した。また核酸との相互作用のモデル系として GMP (グアノシン-1-リン酸) と trifluoromethylphenyldiazirine 含有プラチナ含有エチレンジアミン化合物の複合体形成を ¹H-NMR 解析により検討し、期待した通り GMP との相互作用が起きている事を確認した。この事から合成した化合物が、目的とした核酸親和性を持つことが明らかとなり、有機プラチナ化合物に光反応性 trifluoromethylphenyldiazirine を修飾してもその親和性に大きな変化が見られない事が明らかとなり、マイクロアレイ解析へ適用するための基礎を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

生物有機化学

科研費の分科・細目：

生物分子科学

キーワード：

光アフィニティーラベル、ジアジリン、核酸—蛋白質相互作用、構造活性相関、機能部位解析

1. 研究開始当初の背景

光アフィニティーラベルを利用した核酸同士および核酸と蛋白質や糖質との相互作用解析

核酸同士および核酸と蛋白質や糖質との相互作用が生理活性発現に重要な役割を果たしていることが徐々に明らかにされるにつれ、多数の生体高分子相互作用の解析法が重要視されてきている。

現在、複合体構成成分の集合様式、成分間の接点の同定などを解明する上で利用されている手法として国内外を通じて「フットプリント法」が広く利用されているが、それぞれの蛋白質が核酸のどの部分に結合しているかを定めること、また、蛋白質のどの部分が直接 DNA と接触しているかを解析することは、大変困難な作業であった。(総説例 Mueller F. et. al. J. Mol. Bio., 298, 35-59 (2000))

この問題点は、これらの相互作用において

- 1) 相互作用における親和性が、レセプター-薬物相互作用ほど強くない
 - 2) 結合することにより活性が発現した後、解離してしまうため形成された複合体状態を保持したまま解析する手法が確立していない
- ために起きたものと考えられる。

申請者は長年光アフィニティーラベル法を生理活性プローブの化学合成の改良から基質結合部位解析を含む生体高分子への応用までを手がける中で、光アフィニティーラベル法が

- 1) 作用発現のための複合体形成のための molecular dynamics を反映した結果を与える
- 2) 複合体解離条件下でも照射によって形成されたラベル (共有結合) は消失しない
- 3) 親和性を解析の基礎とすることから、生体高分子複合系においても目的とする生体高分子や生理活性物質の機能解析が可能であることを実際の実験レベルで明らかにしてきた。(M. Hashimoto, et. al, ChemBioChem, 2, 52-59 (2001)他 27 報).

その結果を受け、核酸特異的に化学修飾可能な光アフィニティーラベル試薬を合成することにより、核酸と相互作用を持つ生体高分子群との複合体形成を反映した状態で解析できると考え、今回の申請を行った。

今までの核酸関連の光アフィニティーラベルにおいては、構成成分単位であるヌクレオチドを光反応性化合物に変換することは行われていたが、そのポリマーに相当する核酸を一段階で光反応性誘導体化する方法はほとんど行われていなかったため、核酸と生体高分子の相互作用に光アフィニティーラベルを利用する試みはほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

光反応性 trifluoromethylphenyldiazirine 含有核酸親和性プラチナ化合物の合成とその性質検討ならびにマイクロアレー法を用いた網羅的相互作用解析法の確立

プラチナ含有エチレンジアミン化合物骨格が核酸親和性を持つことを利用し、種々の光反応性誘導体へと変換反応を検討し、その親和性などのパラメーターを測定により構造活性相関を網羅的に探索することで、この目的に利用可能な化合物選定を行う。ここで活性のも認められた化合物に関し、すでに親和性がある核酸-蛋白質 (糖質) をモデルケースにして相互作用している複合体特異的への共有結合の形成 (光ラベルの導入) 反応を検討する。その結果を基に核酸粗抽出物への適用を検討し、最終的には既存の核酸マイクロアレー法を利用した網羅的相互作用解析を目指していく。

3. 研究の方法

光 反 応 性 基 trifluoromethylphenyldiazirine を持つ 2 価プラチナ化合物の合成

修飾可能な DNA に親和性をもつ 2 価プラチナ化合物骨格は文献 (Heetebrij R. J., et. al., ChemBioChem, 4, 573-583 (2003)) に従い調製し、申請者が保有する異なる長さのスペーサーをもつ trifluoromethylphenyldiazirine 誘導体群 (M. Hashimoto, et. al, ChemBioChem, 2, 52-59 (2001)) と反応させ、プラチナ配位中心から光反応性基までの距離の相関を検討しうるライブラリーを構築する。構造の決定に関しては通常の ^1H , ^{13}C -NMR のみならず ^{195}Pt , ^{19}F も測定し、質量分析、赤外、紫外分光と合わせて決定する。

その後、合成した化合物群の光分解能を確認するが、一般的な有機光反応で用いられる濃度 (10 mM 以上) と実際の生体分子複合体への光アフィニティーラベル時の濃度 (0.1 mM 以下) において、光分解の挙動が異なる場合がある (M. Hashimoto, et. al., Anal. Biochem., 348, 154-156 (2006)) ので、詳細な検討を行う。

また、trifluoromethylphenyldiazirine 中にビオチンを導入した化合物 (M. Hashimoto, et. al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 2447-2450 (2004)) を利用し、高感度検出および簡便なラベル部位単離が可能な化合物群も合成も検討する。

4. 研究成果

プラチナ含有エチレンジアミン化合物骨格が核酸親和性を持つことを利用し、種々の光反応性誘導体へと変換反応を検討した。文献に従い、プラチナ含有エチレンジアミン化合物骨格を合成し、最終段階で trifluoromethylphenyldiazirine を導入する事で、効率よく期待する光反応性基を持つ2価プラチナ化合物の合成に成功し、機器分析データにより、その構造を確認した。各種 trifluoromethylphenyldiazirine 誘導体を合成し、導入に適した官能基を精査するとともに、その性質を種々検討した。光分解性については、0.1 mM以下において、350nm 付近の照射によりカルベンが発生し標的生体分子との間にクロスリンク反応が進行することを UV および ^{19}F -NMR を測定することで、半減期は約3分であることを確認した。また核酸との相互作用のモデル系として GMP (グアノシン-1-リン酸) の塩基部分7位とプラチナが相互作用する事を受け、37°C で ^1H -NMR 解析による8位水素のグアニジン塩基のケミカルシフトの変化を追跡し、炭化水素や芳香環をもつプラチナ化合物のケミカルシフトが低磁場シフトする事を確認した。次に trifluoromethylphenyldiazirine をもつプラチナ化合物と GMP と相互作用を検討した所、溶解性を上げるために5%程度 DMF のを用いる事でプラチナ化合物と GMP との相互作用が起きている事を確認した。この事から合成した化合物が、目的とした核酸親和性を持つことが明らかとなり、有機プラチナ化合物に光反応性 trifluoromethylphenyldiazirine を修飾してもその親和性に大きな変化が見られない事が明らかとなり、マイクロアレイによる解析法の基礎を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

- ① R. Murashige, Y. Murai, Y. Hatanaka, M. Hashimoto, Effective synthesis of optically active trifluoromethyldiazirinyll homophenylalanine and aroylalanine derivatives with Friedel-Crafts reactions in triflic acid, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, in press (2009) 査読有
- ② Y. Murai, Y. Hatanaka, Y. Kanaoka, M. Hashimoto, Effective synthesis of optically active 3-phenyl-3-(3-trifluoromethyl) diazirinyl bishomophenylalanine derivatives, Heterocycles, 79, 359-364 (2009) 査読有
- ③ M. Hashimoto, M. Takahashi,

Effective Friedel-Crafts acylations of O- and C- aryl glycosides with triflic acid, Heterocycles, 77, 227-231 (2009) 査読有

④ M. Hashimoto, Y. Hatanaka, Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling, Eur. J. Org. Chem., 2513-2523 (2008) 査読有

⑤ R. Murashige, Y. Hayashi, M. Hashimoto, Asymmetric and efficient synthesis of homophenyl- alanine derivatives via Friedel-Crafts reaction with trifluoromethanesulfonic acid, Tetrahedron Letters, 49, 6566-6568 (2008) 査読有

⑥ M. Hashimoto, Y. Hatanaka, A novel biotinyl and diazirinyl ceramide analogue for photo- affinity labeling, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18, 650-652 (2008) 査読有

⑦ M. Hashimoto, Y. Kato, Y. Hatanaka, Selective hydrogenation of alkene in (3-trifluoromethyl) phenyldiazirine photophor with Wilkinson's catalyst for photoaffinity labeling, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 55, 1540-1543 (2007) 査読有

〔学会発表〕(計18件)

①村井勇太、橋本 誠、Triflic acid を利用した Friedel-Crafts 反応による光反応性ビスホモフェニルアラニンの効率的な立体選択的の合成の検討、日本農芸化学会2009年度大会、福岡、平成21年3月29日

②武藤 靖幸、中居 久人、益田 勝吉、橋本 誠、光アフィニティーラベル用ジアジリン含有サッカリンの合成、日本農芸化学会2009年度大会、福岡、平成21年3月29日

③恒川裕佳、益田勝吉、橋本 誠、光延反応を利用した光反応性ジアジリン含有スクロース誘導体の合成、日本農芸化学会2009年度大会、福岡、平成21年3月29日

④橋本 誠、村重 諒、村井勇太、畑中保丸、芳香族アミノ酸側鎖構造活性相関解析用光アフィニティーラベル試薬の立体選択的の合成、日本薬学会第129年会、京都、平成21年3月27日

⑤村重 諒、橋本 誠、Triflic acid を用いたフェニルジアジリン誘導体とアスパラギン酸骨格の効率的な Friedel-Crafts 反応による光反応性ホモフェニルアラニンの合成

化学系学協会北海道支部 2009 年冬季研究発表会、札幌、

平成 21 年 2 月 4 日

⑥ 笹川 斐子、橋本 誠、

単量体 Avidin 固相上での光アフィニティラベルの検討、

平成 20 年度日本農芸化学会北海道支部第二回合同学術講演会、帯広、

平成 20 年 11 月 9 日

⑦ 古川 慶太郎、橋本 誠、

光アフィニティラベルを目指したジアジリン含有有機白金誘導体の合成、

平成 20 年度日本農芸化学会北海道支部第二回合同学術講演会、帯広、

平成 20 年 11 月 9 日

⑧ 遠山 直紀、橋本 誠、

Triflic acid を用いた Friedel-Crafts ベンゾイル化反応による光反応性基導入アミノ酸の効率的合成、

平成 20 年度日本農芸化学会北海道支部第二回合同学術講演会、帯広、

平成 20 年 11 月 9 日

⑨ 村重 諒、橋本 誠、

Triflic acid (TfOH) を用いたカルボン酸誘導体の Friedel-Crafts 反応の検討、

平成 20 年度日本農芸化学会北海道支部第二回合同学術講演会、帯広、

平成 20 年 11 月 9 日

⑩ M. Hashimoto, Y. Hatanaka

Convenient synthesis of deuterium labelled diazirinyl alpha-amino acids for photoaffinity labeling,

The Twentieth French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry, 9th Sep 2008, Bordeaux, France

⑪ 村井勇太、橋本 誠、

Triflic acid を利用した Friedel-Crafts 反応によるビスホモフェニルアラニンの効率的な不斉合成の検討、

平成 20 年度日本農芸化学会北海道支部第一回合同学術講演会、札幌、

平成 20 年 8 月 9 日

⑫ 村重 諒、橋本 誠、

Triflic acid を用いたフェノールのアシル化、Friedel-Crafts 反応の制御、フェニルエステルの Fries 転位の検討、

平成 20 年度日本農芸化学会北海道支部第一回合同学術講演会、札幌、

平成 20 年 8 月 9 日

⑬ 村重 諒、橋本 誠、

アミノ酸骨格を利用した効率的 Friedel-Crafts 反応によるホモフェニルアラニン類の合成、

日本化学会北海道支部 2008 年度夏期研究発表会、北見、

平成 20 年 7 月 19 日

⑭ 橋本 誠、畑中保丸、

光アフィニティラベルを指向した効率的安定同位体標識ジアジリンの合成、

日本薬学会第 128 年会、横浜、

平成 20 年 3 月 26 日

⑮ 高橋美帆、橋本 誠

TfOH を用いた C-または O-グリコシドの効率的な誘導体化法の検討、

日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋、平成 20 年 3 月 28 日

⑯ 村重 諒、橋本 誠

アミノ酸骨格を利用した効率的 Friedel-Crafts 反応の検討、

日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋、平成 20 年 3 月 28 日

⑰ M. Hashimoto, Y. Kato, Y. Hatanaka, Selective hydrogenation of carbon-carbon double bond in (3-trifluoromethyl)phenyldiazirine derivatives for photoaffinity labeling, EIGHTH TETRAHEDRON SYMPOSIUM, 26th June 2007, Berlin

⑱ M. Hashimoto, Y. Hayashi, R. Murashige, Y. Hatanaka

Friedel-Crafts reaction with Trifluoromethanesulfonic acid for (Trifluoromethyl)phenyldiazirine Photophor

The Nineteenth French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry, 15th May 2007, Toyama

[その他]

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~bioorg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 誠 (HASHIMOTO MAKOTO)

国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90292094