

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510213
 研究課題名（和文） 標的タンパク質探索のための新しい光クロスリンク官能基の開発
 研究課題名（英文） Development of novel photo-cross-linkable groups for explorative study of target protein
 研究代表者
 細谷 孝充（HOSOYA TAKAMITSU）
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授
 研究者番号：60273124

研究成果の概要：以前独自に開発した、bioorthogonal な官能基であるアジド基やエチニル基の特性を活用した非放射性光親和性標識法のさらなる有効化を目指し、光反応性官能基であるジアジリニル基とアジド基またはエチニル基とを融合させた新規検出基導入用タグ一体型の光クロスリンク官能基の開発を試みた。その結果、アジドジフルオロメチルジアジリニル基およびエチニルジフルオロメチルジアジリニル基を有する化合物の合成に成功するとともに、光反応および修飾反応のモデル実験からこれら官能基の実用性を示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：化学修飾、タンパク質、光反応、光親和性標識、ジアジリン、アジド、アセチレン、非放射性

1. 研究開始当初の背景

光親和性標識法 (photoaffinity labeling) は、薬剤や天然有機化合物の生物活性機能発現に関与する標的タンパク質の捕獲・同定に有効な手法である。本手法では、プローブ構造内へ標的タンパク質-プローブ間に共有結合を形成するための光反応性官能基、およびラベル化されたタンパク質を検出するための検出用官能基を導入する必要がある。これらをプローブ構造内に導入する際に大事なことは、オリジナルの化合物が有する生物活性

および選択性の失活を最小限に抑えることである。

以前、本研究グループでは、bioorthogonal な官能基であるアジド基やエチニル基の特性を活用した非放射性光親和性標識法を開発した (T. Hosoya, et al., *Org. Biol. Chem.*, **2**, 637 (2004))。本法では、芳香族アジドまたはトリフルオロメチルジアジリニル基などの光反応性官能基とともに脂肪族アジド基（特に最小のアジドメチル基）を検出基導入用タグとして有する二官能性プローブを用いる。

本プローブを用いることにより、まず、光反応により標的タンパク質-プローブ間に共有結合を形成した後、残存する脂肪族アジドをタグ官能基として活用し、蛍光基などの任意の検出用ユニットを導入することができる。

本手法の有効性は、HMG-CoA還元酵素阻害能を有し、高脂血症治療薬として使用されていた cerivastatin をプローブ化して photovastatin CAA1 を設計・合成し、その標的タンパク質である HMG-CoA還元酵素(分子量約 51 kDa) が光ラベル化と引き続く Staudinger-Bertozzi ligation による fluorescein 蛍光団の導入により蛍光検出できることにより実証された (T. Hosoya, et al., *Org. Biol. Chem.*, **2**, 637 (2004))。さらに、より複雑な系でも本法が有効であることを確かめるために、骨格筋の興奮収縮連関過程におけるリアノジン受容体 (RyR1) を介する細胞質内への Ca^{2+} 放出機構の解明研究の一環として、筋弛緩薬であるダントロレンのプローブ化により GIF-0430 を開発し、その標的タンパク質の同定を試みた。その結果、多くのタンパク質が混在する骨格筋標本の中から単一とみられるタンパク質 (分子量<約 29 kDa) が光ラベル化され、蛍光検出できることが明らかとなった (T. Hosoya, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 1289 (2005))。

このように本手法は、従来の放射性プローブを用いた光親和性標識法では困難であった光ラベル化タンパク質の直接解析を可能にするとともに、ビオチン修飾プローブを用いた非放射性光親和性標識法における問題点の一つであった、プローブの生物活性の低減を抑えられることが最大の特徴である。

2. 研究の目的

本研究では、上述した非放射性光親和性標識法のさらなる有効化を目的に、光反応性官能基と検出基導入用タグ官能基を一つに融合した新たな官能基を設計し、その合成を試みた。具体的には、光反応性官能基の中で最もラベル化能が優れているとされるトリフルオロメチルジアジリニル基の一つのフルオロ基を検出基導入用タグ官能基である脂肪族アジド基またはエチニル基へと変換した官能基、すなわち、アジドジフルオロメチルジアジリニル基およびエチニルジフルオロメチルジアジリニル基の開発を目指した。このような官能基を有するユニットは、互いにメタ位に配置された従来のユニットに比べ構造的によりコンパクトであり、プローブ化に伴う生物活性の低下を最小限に抑えられると期待される。

3. 研究の方法

上述した検出用タグ-一体型光反応性官能基を開発するために、以下の実験計画に従って研究を実施した。

(1) 既知のトリフルオロメチルジアジリニル基の合成法を参考にした効率的合成経路の確立。

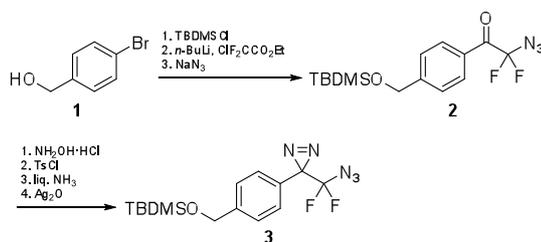
(2) 近傍に検出基導入用タグ官能基であるアジド基またはエチニル基が存在するジアジリニル基の光反応性の検証、および、その光反応条件下でこれらの官能基が残存するかどうかを検討するためのモデル光実験の実施。

(3) 光反応後に残存したアジド基やエチニル基が期待どおりに検出基導入用タグ官能基として活用できるかどうかを検証するための上記実験で得られた光反応生成物の修飾モデル実験。

4. 研究成果

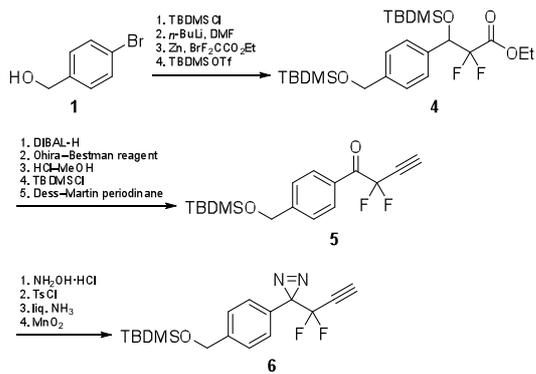
(1) 検出基導入用タグ-一体型光親和性標識用ユニットの合成

まず、ジアジリニル基と脂肪族アジド基を一つに融合した官能基を有するユニットの合成を試みた。市販の 4-ブロモベンジルアルコール (**1**) から 3 段階の反応を経由してアジドケトン **2** を得た。つづいて、**2** のカルボニル基のジアジリニル基への変換は、常法に従い 4 段階の反応条件を適用したところ、期待どおり目的とするアジドジフルオロメチルジアジリニル化合物 **3** を得ることができた (Scheme 1)。



Scheme 1

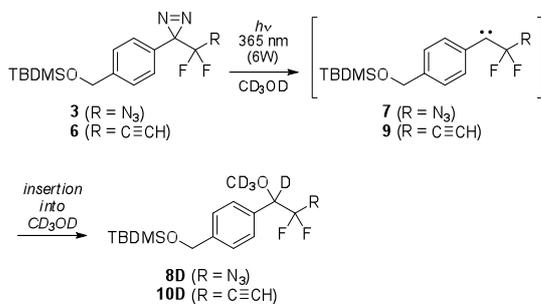
一方、ジアジリニル基とエチニル基を一つに融合した官能基を有するユニットの合成も試みた。これも **1** から出発し、4 段階の反応を経由して、ジシリル化合物 **4** を得た。さらに 5 段階を経由して、エチニルケトン **5** を得た。つづいて、常法に従い 4 段階の反応を行い、目的とするエチニルジフルオロメチルジアジリニル化合物 **6** を合成することに成功した (Scheme 2)。



Scheme 2

(2) モデル光反応実験

合成したアジドジフルオロメチルジアジリン化合物 **3** を用いて、ジアジリル基の光反応条件下において検出基導入用タグ官能基である脂肪族アジド基が残存するかどうかを検証した。すなわち、化合物 **3** の重メタノール溶液中、365 nm (6W) の波長の UV を照射して、その反応経過を ^{19}F NMR 測定により観察した。その結果、隣接部位にアジド基が存在しても光反応により問題なくカルベン **7** が発生し、速やかに重メタノール付加体 **8D** を与え、アジド基が未反応のまま残存することが判った。エチニルジフルオロメチルジアジリン化合物 **6** についても、同様に光反応を行ったところ、この場合にも問題なく重メタノール付加体 **10D** を与え、エチニル基がこの発生したカルベンの影響を受けず未反応のまま残存することが判った (Scheme 3)。



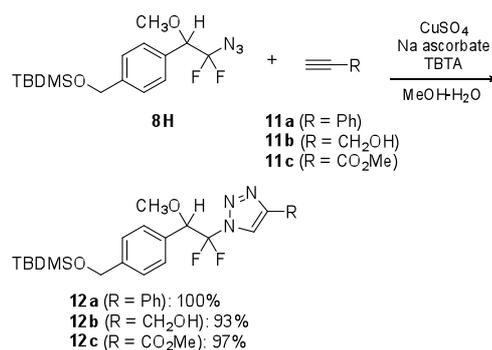
Scheme 3

(3) 光反応生成物の修飾モデル実験

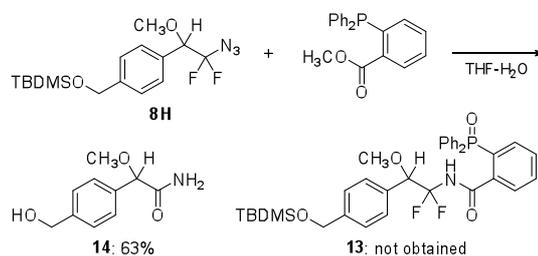
つづいて、光反応生成物中のアジド基およびエチニル基が検出用官能基の導入に用いることができるかどうかを検討した。具体的には、別経路により合成したメタノール付加体 **8H** および **10H** を用いて、それぞれの官能基修飾を試みた。まず、アジド化合物 **8H** に対して各種エチニル化合物 **11a-c** との Huisgen 1,3-双極子環化付加反応を検討した結果、環化生成物 **12a-c** を高収率で得ることができた (Scheme 4)。一方、**8H** とトリアリールホス

フィン誘導体との Staudinger-Bertozzi ligation も試みたが、期待した生成物 **13** は得られず、通常の Staudinger 反応が進行しアジド基が還元され加水分解が進行するとともに、TBDMOS 基が脱落したと考えられるアミド化合物 **14** が得られた (Scheme 5)。これはおそらく 2 つのフルオロ基の影響により、アザ-イリド中間体における窒素の求核性が低下したためだと考えられる。

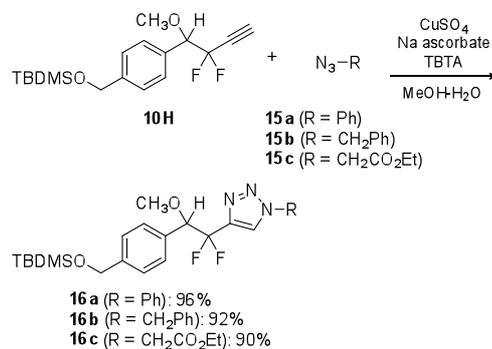
一方、エチニル化合物 **10H** に対して各種アジド化合物 **15a-c** との Huisgen 1,3-双極子環化付加反応を検討した結果、環化生成物 **16a-c** を高収率で得ることができた (Scheme 6)。



Scheme 4



Scheme 5



Scheme 6

以上の結果から、アジドジフルオロメチルジアジリン化合物 **3** とエチニルジフルオロメチルジアジリン化合物 **6** は、non-RI 光親和性

標識プローブ用のユニットとして十分活用できることが示唆された。

今後は、実際にこれら二つのユニットを活用した non-RI 光親和性標識用プローブを製作し、標的タンパク質の探索研究を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① T. Hosoya, A. Inoue, T. Hiramatsu, H. Aoyama, T. Ikemoto, and M. Suzuki, Facile synthesis of diazido-functionalized biaryl compounds as radioisotope-free photoaffinity probes by Suzuki-Miyaura coupling. *Bioorg. Med. Chem.*, **17** (6), 2490–2496 (2009). 査読有り

② T. Hiramatsu, Y. Guo, and T. Hosoya, 3-Azidodifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl group as an all-in-one functional group for radioisotope-free photoaffinity labeling. *Org. Biomol. Chem.*, **5** (18), 2916–2919 (2007). 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

① 平松俊行、郭 穎、細谷孝充、検出用エチニル基一体型光親和性標識用官能基の開発、日本化学会第 89 春季年会、2009 年 3 月 28 日、日本大学理工学部船橋キャンパス

② Takamitsu Hosoya, Toshiyuki Hiramatsu, Atsushi Inoue, Ying Guo, Isao Kii, Akira Kudo, Novel method of radioisotope-free photoaffinity labeling using bioorthogonal group as a detectable tag function, The 3rd International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia under Asian Core Program (ICCEOCA-3), 2008 年 10 月 21 日、杭州 (中国)

③ 井上 敦、平松俊行、鈴木正昭、細谷孝充、ジアジド型 non-RI 光親和性標識プローブの簡便合成法の開発、日本化学会第 88 春季年会、2008 年 3 月 29 日、立教大学 (池袋)

④ 平松俊行、郭 穎、細谷孝充、non-RI 光親和性標識のための検出用タグ一体型官能基の開発、Sorst ジョイントシンポジウム (8) 「有機合成力」-そのダイナミズム、2008 年 1 月 30 日、コクヨホール (品川)

⑤ 平松俊行、郭 穎、細谷孝充、検出用タグ一体型の光親和性標識用官能基の開発、第 91 回有機合成シンポジウム、2007 年 6 月 12 日、東京工業大学・大岡山西地区 (西 9 号館) デジタル多目的ホール

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細谷 孝充 (HOSOYA TAKAMITSU)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：60273124

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし