

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560439

研究課題名（和文）反応性アフィニティータグを用いた蛋白質標識・精製・検出法の開発

研究課題名（英文）Development of labeling/purifying/detecting methods using a reactive affinity tag

研究代表者

どど 孝介（DODO, KOSUKE）

国立研究開発法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・専任研究員

研究者番号：20415243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では生物活性化合物の標的蛋白質とその結合部位同定を目指して、標識官能基・アフィニティー精製タグ・検出官能基の3つの機能を併せ持つ「反応性アフィニティータグ」の開発を目指した。その結果、 α -ケトアミドおよび0-ニトロベンゾキサジアゾール（NBD）ユニットに関して、新たに1つの機能を付与させることに成功した。最終的に反応性アフィニティータグを開発し、生物活性化合物の結合蛋白質の蛍光標識化および標識化されたペプチド断片を精製・同定することを達成した。

研究成果の概要（英文）：To identify the target proteins and binding sites of bioactive compounds, we planned to develop “reactive affinity tag”, which can label/purify/detect binding proteins of bioactive compounds. As a result, we successfully installed another function into α -ketoamide or 0-nitrobenzoxadiazole (NBD) unit. Finally, we developed a reactive affinity tag, which enabled us to label/detect the binding proteins of bioactive compounds and purify/identify the labeled peptides.

研究分野：化学反応を利用した生物活性化合物の結合分子同定法の開発

キーワード：有機化学 タンパク質 ペプチド アフィニティー精製 アフィニティーラベリング

1. 研究開始当初の背景

ケミカルバイオロジー分野において、生物活性化合物の結合タンパク質の同定、さらにその結合部位の同定は、その作用機序解明のためには非常に重要な情報を与える。そのためには、生物活性化合物の活性を損なうことなくプローブ化することが必要である。

生物活性化合物をプローブ化するには、結合タンパク質と共有結合を形成できる「標識官能基」、標識されたタンパク質を精製するための「アフィニティー精製タグ」、標識されたタンパク質を検出するための「検出官能基」の3つの官能基を導入することが一般的である。しかしながら3つの官能基を導入することは、しばしば元の化合物の生物活性を損なうため、より小さな官能基の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では「標識官能基」、「アフィニティー精製タグ」、「検出官能基」の3つの機能を併せ持つコンパクトな「反応性アフィニティータグ」を開発することを目指す。これにより、活性を損なうことなく生物活性化合物をプローブ化し、その結合タンパク質ないしは結合部位の同定を可能とすることを目指す。

3. 研究の方法

本研究ではまず目的とする3つの機能のうち2つを併せ持つ官能基を検討し、その上で見出された官能基に対して3つ目の機能を付与することで最終的に目的とする「反応性アフィニティータグ」の開発を目指す。

2つの機能を併せ持つ官能基としては、
-ケトカルボニル化合物

0-NBD ユニット

に着目し、それぞれの検討を進めながら最終的に3つ目の機能を付与することを目指して研究を行った。

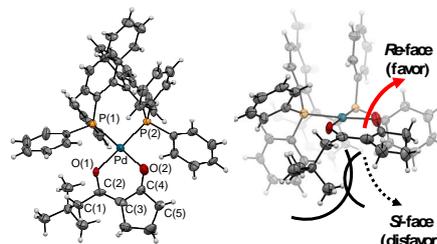
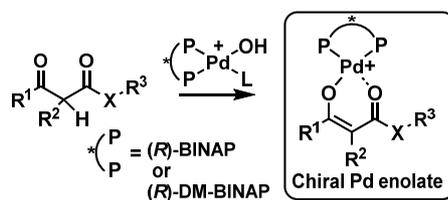
4. 研究成果

以下2つに分けて研究成果を記載する。

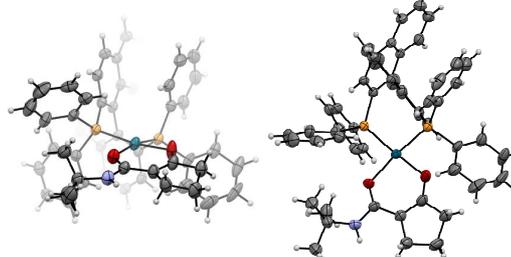
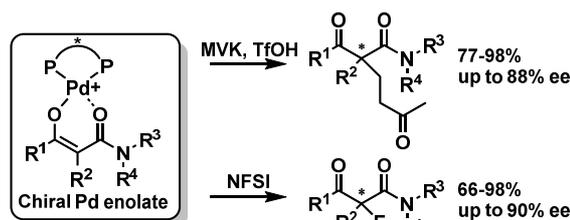
-ケトカルボニル化合物

「アフィニティー精製タグ」と「検出官能基」を併せ持つタグとして、-ケトカルボニル構造に着目して研究を行った。-ケトカルボニル化合物はパラジウム錯体と反応することで、パラジウムエノラートを生成し、これが様々な求電子剤と反応することが知られている。研究代表者が所属する研究室ではこれまでにキラルなパラジウム錯体を触媒として、様々な不斉触媒反応が開発されてきた。一方でこれらの反応は水や酸素が存在する中でも、良好に進行することが知られていた。そこで研究代表者は、反応系中で生成するパラジウムエノラートが単離可能なほど安定ではないかと推定し、その単離・精製を試みた。その結果、-ジケトンおよび-ケトアミドを基質とした時に、生成するパラジ

ウムエノラートが単離可能であることを見出した。さらにそのX線結晶構造解析にも成功し、これまで推定されていた不斉誘起メカニズムを実証することにも成功した(下図)。



またこの過程で、-ケトアミド化合物も不斉触媒反応の基質として適すること、さらにこれまで不斉触媒反応で検討されてきた-ケトカルボニル化合物に比べて高い反応性を有することを見出した。その詳細を明らかにすべく、-ケトアミドから生成するパラジウムエノラートを単離し、同様にX線結晶構造解析を行った結果、パラジウムエノラートの平面四配位構造に歪みがあり、これが反応性の高さに寄与する可能性を見出した(下図)。



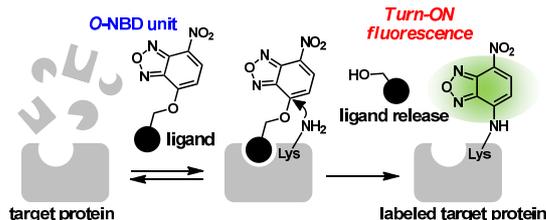
一方、以上の結果を受けて申請者は-ケトアミド化合物をタグとして用いることを計画した。すなわち、パラジウム錯体を担体に固定化し、パラジウムエノラートとして-ケトアミドを捕捉し、さらに検出官能基を持つ求電子剤と反応させることで検出官能基を導入しながら溶出させることを計画した。そこで、その実現に向けて種々条件検討を行った。まずパラジウム錯体を固相上に固定化し、これに対して-ケトアミド化合物を処理し、金属エノラートが生成するかどうか

かを調べた。その結果、 β -ケトアミドがパラジウムエノラートとして速やかに捕捉されることが明らかとなった。そこで、 β -ケトアミドのアフィニティー精製タグとしての可能性を検証すべく、ペプチドに β -ケトアミド構造を導入したモデルペプチドを用いて検討を行った。その結果非常に複雑なペプチド混合物中からでもモデルペプチドを効率よく精製することに成功した。

さらに、捕捉したのちに適する求電子剤と反応させることで検出官能基へと変換する検討を行った。その結果、効率はまだ低いものの β -ケトアミド化合物の精製と蛍光標識化を同時に行うことに成功した。これにより、本タグは2つの機能を併せ持つことになった。3つ目の機能付与に関しては、本研究課題の間には行えなかったが、今後検討したいと考えている。

0-NBD ユニット

0-ニトロベンゾキサジアゾール (NBD) はアミノ基と反応性を有し、それ自体は蛍光を持たず、アミノ基と反応した *N*-NBD は蛍光を持つことが報告されている。そこで我々は 0-NBD がリシンの持つアミノ基と反応したときだけ蛍光を示す Turn-ON 型の蛍光標識官能基として機能できるのではないかと考えた。そこで、我々は様々な生物活性化合物に 0-NBD を導入し、その結合タンパク質の標識化を検討したところ、いくつかの化合物に関してタンパク質の蛍光標識化に成功している (下図)。



このことは、0-NBD が標識官能基と検出官能基二つの機能を兼ね備えていることを示唆している。そこでさらに、本官能基に3つ目の「アフィニティー精製タグ」としての機能を付与することを計画した。種々条件検討を行った結果、*N*-NBD 化ペプチドを精製する手法を開発することに成功した。そこでこの手法を用いて、蛍光標識された結合タンパク質を酵素処理して得られるペプチド混合物から *N*-NBD 化ペプチドを精製し、同定する手法へと展開した。種々条件検討を行った結果、通常の LC-MS/MS 解析では同定できなかった *N*-NBD 化ペプチドを同定することに成功した。以上の結果から最終的に 0-NBD ユニートを「標識官能基」「検出官能基」「アフィニティー精製タグ」、3つの機能を持つ官能基として機能させることを達成した。

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 1 件)

- Kenji Hayamizu, Naoki Terayama, Daisuke Hashizume, Kosuke Dodo, and Mikiko Sodeoka
Unique features of chiral palladium enolates derived from β -ketoamide: Structure and catalytic asymmetric Michael and fluorination reactions
Tetrahedron 2015, 71, 6594-6601.
doi:10.1016/j.tet.2015.07.002

〔学会発表〕(計 10 件)

- 早水健二、圃圃孝介、江上寛通、浅沼三和子、袖岡幹子
Pd enolate 錯体を用いたアフィニティー精製法の開発
日本薬学会第 137 年会
2017 年 3 月 24-27 日
仙台国際センター (宮城県・仙台)
- 寺山直樹、早水健二、橋爪大輔、圃圃孝介、袖岡幹子
 β -ケトアミドの Pd エノラートを用いた触媒的不斉付加反応の開発
日本薬学会第 137 年会
2017 年 3 月 24-27 日
仙台国際センター (宮城県・仙台)
- 浅沼三和子、圃圃孝介、大金賢司、袖岡幹子
Turn-ON 蛍光アフィニティー標識法を用いた生物活性化合物の標的タンパク質解析
日本薬学会第 137 年会
2017 年 3 月 24-27 日
仙台国際センター (宮城県・仙台)
- Kosuke Dodo
Turn-ON fluorescent affinity labeling using small bifunctional 0-NBD unit
2016 Queenstown Molecular Biology Meetings
17-18 March 2016
Shanghai, China
- 浅沼三和子、圃圃孝介、藤本直子、袖岡幹子
蛍光 turn-ON 型ラベル化法と質量分析法を用いた生物活性化合物の標的タンパク質解析
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015 年 12 月 1-4 日
神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸)
- Kenji Hayamizu, Naoki Terayama, Daisuke Hashizume, Kosuke Dodo, and Mikiko Sodeoka

Unique features of chiral palladium enolates derived from α -ketoamide: Structure and catalytic asymmetric Michael and fluorination reactions
16th Tetrahedron Symposium Asia edition
10-13 November 2015
Shanghai, China

7. Kosuke Dodo, Takao Yamaguchi, Miwako Asanuma, Shuichi Nakanishi, Yohei Saito, Masateru Okazaki, Mikiko Sodeoka
Turn-ON fluorescent affinity labeling using small bifunctional O-NBD unit
European Chemical Biology Society (ECBS) & International Chemical Biology Society (ICBS) Joint Meeting
7-9 October 2015
Berlin Germany

8. 園園孝介
ネクロシス制御機構解明を目指したケミカルバイオロジー研究：蛍光 turn-ON 型アフィニティーラベル化法の開発
第 15 回日本蛋白質科学会年会
2015 年 6 月 24 日
あわぎんホール（徳島・徳島市）

9. 浅沼三和子、園園孝介、山口卓男、中西修一、斎藤洋平、岡崎正晃、袖岡幹子
蛍光 turn-ON 型ラベル化法を用いた生物活性化合物の標的タンパク質の解析
第 87 回日本生化学会大会
2014 年 10 月 15-18 日
国立京都国際会館（京都）

10. 山口卓男、浅沼三和子、中西修一、斎藤洋平、岡崎正晃、園園孝介、袖岡幹子
ニトロベンゾオキサジアゾールを用いる蛍光 turn-ON 型アフィニティーラベル化法の開発
第 12 回 次世代を担う有機化学シンポジウム
2014 年 5 月 23-24 日
日本薬学会長井記念ホール（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

どど 孝介 (DODO Kosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・専任研究員

研究者番号：20415243