

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14350

研究課題名（和文）光ラベル後のマルチタグ交換可能な新規ノシル型光アフィニティープローブの創製

研究課題名（英文）Design of ligand-tag exchangeable new photoaffinity probe utilizing nosyl chemistry

研究代表者

村井 勇太（Murai, Yuta）

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：20707038

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：既存の光アフィニティーラベル法では、それに使用するプローブの高さによるリガンドの親和性低下や解析時の煩雑作業等の問題を抱えており、より簡便な解析ツールとしての改善が望まれている。本研究ではノシル基の特徴を活用した、マルチタグ交換可能な光反応基とリガンドのみからなる新規光アフィニティープローブの開発を実施した。開発した光アフィニティープローブはモデル分子を使用することで対象となる分子への光ラベル効率の向上、芳香族求核置換反応によるリガンド部位の検出基（蛍光基やイオン増感剤）への交換可能を確認し、これまでの問題点を克服することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで解析が困難であった光アフィニティーラベル対象物（極微量なタンパク質）にも適用が可能であり、従来では数ヶ月以上要した解析期間を数週間程度に減らすことも可能であると期待される。これによってx線結晶構造解析やSTD-NMRで困難となっている対象の構造基盤創薬の代替法として活用でき、特に膜タンパク質などの創薬ターゲットとなる生体分子への応用が広がれば、その開発速度により一層拍車がかかると期待される。

研究成果の概要（英文）：In existing photoaffinity labeling methods, there are some problems such as decreasing the original affinity of a ligand due to their bulkiness of the photoaffinity probe and complicated work within an analysis time. Therefore, innovative improvement of the photoaffinity labeling methodology as a simpler analysis tool for all researchers is required. In this study, I developed a novel photoaffinity probe possessing multi-tag exchangeable ability utilizing the characteristics of the nosyl chemistry. The developed photoaffinity probe improved the photolabeling efficiency to the target molecule, and can be exchanged for detection groups (fluorescent group or ion sensitizer) of the ligand by nucleophilic aromatic substituted reaction (SNAr). These advantages was able to overcome the previous problems and may contribute a large number of chemical biology research field.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：光アフィニティーラベル ジアジリン 芳香族求核置換反応 マイゼンハイマー錯体 ノシル基

1. 研究開始当初の背景

脂質メディエーターの標的分子はその多くが膜タンパク質であることから、それらが創薬のターゲットになる可能性が十分にある。今まさに、『脂質の時代』を迎え、脂質機能の解明を目指したプロジェクトが各国で立ち上がっている。セラミドからスフィンゴミエリンへと代謝を行うスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS:膜タンパク質)は SMS1、SMS2、SMSr の3種のアイソフォームが同定されており、中でも SMS2 の阻害はガン免疫亢進(Okazaki,T. *FASEB* 2017)やオートファジー制御(Wenhui,J. *Autophagy* 2013)、抗脂肪肝(Mitsutake,S. *JBC* 2011)、あるいはアミロイドβの除去作用を持つエクソソーム増産(Yuyama,K. *JBC* 2014)など生体内で重要な役割を果たすことが確認されている。申請者はこれまでにナノモラーレベル (*in vitro*)での SMS2 選択的阻害剤の開発に成功しており、さらなる強力な阻害剤開発を目指している。しかし SMS は膜タンパク質ゆえ、結晶化及び精製が非常に困難であり、その結合モデルを解析する手法がない。特に SMS1,2 のアミノ酸アライメントは酷似しており、SMS1 阻害は不妊症やホメオスタシス異常に至る可能性から SMS2 選択性を見出すことが非常に重要なテーマとなる。

光アフィニティーラベル法は化学プローブを利用し、標的分子を光反応によって捕獲し釣り上げる手法である。またリガンド結合ドメイン近傍に強固な共有結合を形成するため、比較的アフィニティーが弱いタンパク質やリガンド結合モデル解析にも適用できる。しかし本手法も膜タンパク質など極微量分子になると、下記の問題点から解析が困難になり、実際、独自阻害剤をリガンドとしラベル実験を実施したが目的の SMS2 を釣り上げることができなかった。

2. 研究の目的

本研究ではプローブの親和性保持および解析の容易性を兼ね備え、極微量タンパク質(一桁ナノg ~ ピコg)の検出を指向した、新規ノシル型ジアジリン(Ns ジアジリン)による次世代光アフィニティープローブを開発し、さらに脂質代謝関連酵素(膜タンパク質)の釣り上げ実験を行うことで、その実用性を立証する。今回開発するオリジナルの Ns ジアジリンは福山・菅らによって開発されたノシル基にジアジリンを導入することで以下の優位性が生み出され、本研究題目を達成可能にすると期待した。

3. 研究の方法

新規 Ns ジアジリンの合成、光反応基としての光分解条件検討

4-クロロベンズアルデヒドを原料とし、*m*-位へのニトロ基および *p*-位へのベンジルチオール導入を検討後、アルデヒドをジアジリン基へ、続くベンジルチオール部位はヒダントインまたは Cl₂ を使用し、スルホン酸クロライドへと酸化を検討することで、目的とする Ns ジアジリンの合成を行なった。また前途による Ns ジアジリン合成が達成できなかった場合には、ステップ数は多くなるものの、4-フルオロプロモベンゼンよりジアジリン基、ニトロ基の順に導入検討を考慮しジアジリン基の分解に注意し、フッ素をスルホン酸に置換、クロライド化について検討することで Ns ジアジリンの合成も視野にいった。また Ns ジアジリンは光分解によってカルベンを発生することが可能であるか、またそれに必要な時間、温度等を MeOH 中で予備実験を行い、光分解の最適化も実施した。

SNAr 反応に用いる蛍光基、イオン増感基の創成

SNAr 反応によるタグ導入のため、蛍光基およびイオン増感基にチオール分子の導入を実施する。蛍光基には SNAr 反応の条件に問題なく、バイオイメージングに実績のある bodipy を選択した。ピロール-2-カルバアルデヒドを原料とし、ベンジル(ジメトキシホスホリル)アセテートと Horner-Wadsworth-Emmons 反応により *E*-3-ピロールアクリレートを合成後、オレフィンの還元を経て、3,5-ジメチルピロール-2-カルバアルデヒドと BF₃・Et₂O 存在下で反応させることで bodipy 構築を検討した。最後にカルボン酸を活性化させ、アミノエタンチオールと縮合させることで目的とする bodipy チオール分子の創成を検討した。いっぽうイオン増感基についてはアセチルコリン=ヨージドを酸性条件下で加水分解することで 2-メルカプトトリメチルアンモニウム塩を得ることとした。

Ns ジアジリンプローブへの SNAr 反応による高感度タグ導入検討

合成したチオール分子導入型高感度タグを用いて Ns ジアジリンへの最適 SNAr 反応条件を検討した。はじめ有機溶媒および塩基の種類を用いて、SNAr 反応が進行するかどうか確認し、確認後はより生体分子を取り扱う条件に適するようバッファー中での検討も実施した。

モデル分子による Ns ジアジリン基の光ラベル化と SNAr 反応による高感度タグ導入検討

モデル分子として牛血清アルブミン (BSA)を用いて、Ns ジアジリン基の光ラベル化効率の検討、および SNAr による蛍光基導入効率を検討した。

4. 研究成果

新規Ns ジアジリンの合成

4-クロロベンズアルデヒド (S1)を硝酸カリウムと反応させ、S2 を 86%の収率で得た。次に TMS-CF₃を KF 存在下、THF 中で反応させ、アルデヒドに CF₃基を導入し、その後、塩酸でシリル基を落とすことでS3 を 98%で得た。アルコール S3 は IBX によってケトン基 (S4)に誘導後、既存のジアジリン基合成法に従って、S8 までトータル収率 27%で合成することに成功した。S4 から S8 へのステップはその後、分液操作のみで精製を行うことでトータル収率 51%まで改善することに成功した。続いて S8 を芳香族求核置換反応によってベンゼンチオールを導入し収率 90%で S9 を得た。ベンゼンチオールのスルホン酸クロライドへの変換は CH₃CN/AcOH/H₂O 中、1,3-ジクロロ-5,5-ジメチルヒダントインを用いることで達成できたが、スルホン酸クロライド(S10)は不安定であり、単離することができなかった。従って、*in situ* でアミノ化合物と反応させ、目的に合ったスルホンアミド(S11)を得ることとした。(図 1)

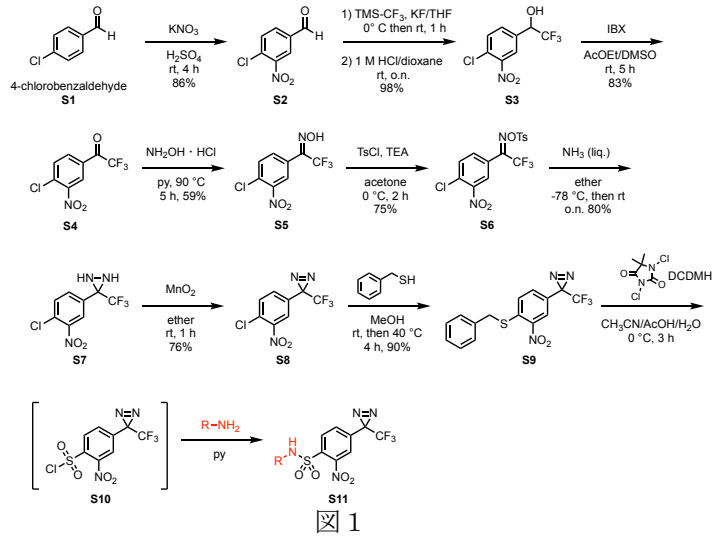


図 1

Ns ジアジリンの光反応基としての光分解条件検討

Ns ジアジリンの光分解実験を行うため、化合物 S12 を誘導し、メタノールで 1 mM に調製した。調製したサンプルを石英セルにいれ、0°C 下で経時的にバンドパスフィルターを介した 365 nm (250 W)の波長を照射することでジアジリン基の分解を測定した。(図 2-A)

その結果、Ns ジアジリン基の半減期はおおよそ 3 分であることが確認された。10 分後には完全にジアジリン基は分解し、カルベンを発生させメタノールと反応し S13 を生成することが質量分析および ¹⁹F-NMR によって確認された。(図 2-B)

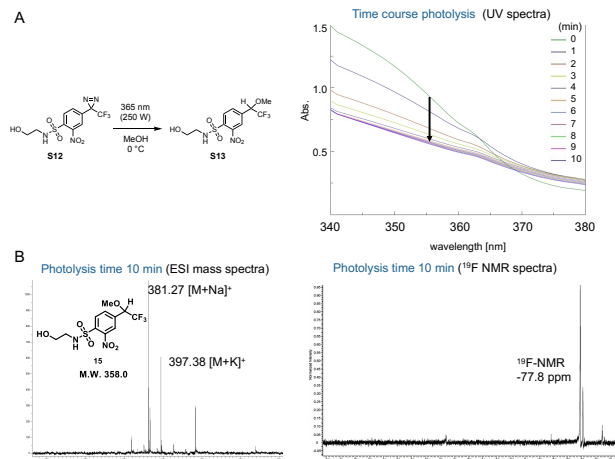


図 2

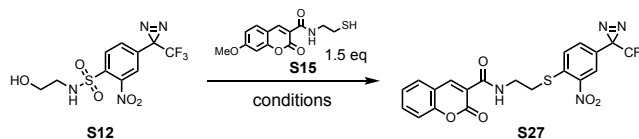
クマリンチオール (蛍光基)、bodipy チオール(蛍光基)、2-メルカプトトリメチルアンモニウム塩(イオン増感基)の創成

S_NAr 反応に利用するクマリンチオールは 7-OMe クマリンスクシンイミドエステルとアミノエタンチオールをジチオトレイトール (DTT)存在下で縮合させることで得ることに成功した。また bodipy チオールは、はじめピロール-2-カルバアルデヒドを原料とし、ベンジル(ジメトキシホスホリル)アセテートと Horner-Wadsworth-Emmons 反応により収率 68%にて E-3-ピロールアクリレートと合成した。オレフィンの還元を経て、3,5-ジメチルピロール-2-カルバアルデヒドと BF₃·Et₂O 存在下で反応させ収率 57%でベンジルエステル体 bodipy の合成に成功した。ベンジルエステルを還元後、カルボン酸をスクシンイミドにて活性化させ、アミノエタンチオールと DTT 存在下で縮合させることで目的とする bodipy チオール分子をトータル収率 12%で創成することに成功した。

いっぽうイオン増感基についてはアセチルコリン=ヨージドを 6 M 塩酸水溶液で加熱反応させることで定量的に 2-メルカプトトリメチルアンモニウム塩を得ることに成功した。

Ns ジアジリンプローブへの S_NAr 反応による高感度タグ導入

合成した高感度タグチオール分子と Ns ジアジリン基による S_NAr 反応の最適条件を見出すため、化合物 S12 とクマリンチオール (S15) を用いて検討した。はじめ有機溶媒である THF を用いて実施したところ、中性条件では S_NAr 反応が進行せず (Entry1)、炭酸セシウムを加えることで 1 時間以内に完結することを確認した (Entry2)。また水溶液中においても炭酸セシウムを塩基として用いることで、反応速度は遅いながらも 24 時間以内に完結することが判明した (Entry6)。さらに生体分子を取り扱う際の条件に適するよう、0.1 M の炭酸・重炭酸バッファー (pH 9.2) 中で反応を実施したところ 6 時間以内でほぼ完結することが確認された (Entry9)。



Entry	Solvent	Base (3eq)	Time (h)	^a Yield (%)
1	THF	—	24	0
2	THF	Cs ₂ CO ₃	1	90
3	EtOH	Cs ₂ CO ₃	2	73
4	CH ₃ CN	Cs ₂ CO ₃	2	78
5	5% DMSO in H ₂ O	Cs ₂ CO ₃	24	82
6	H ₂ O	Cs ₂ CO ₃	24	92
7	H ₂ O	NaHCO ₃	24	47
8	H ₂ O	TEA	24	35
9	0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.2)	—	6	>90

他の高感度タグ導入検討

合成した bodipy チオール、2-メルカプトトリメチルアンモニウム塩についても S_NAr の検討を行なった。bodipy チオールにおいては THF 溶媒中、炭酸セシウムを塩基として反応させることで 2 時間以内に収率 80%程度で目的化合物 (S28) が得られた。また 2-メルカプトトリメチルアンモニウム塩は水中で反応させ、一切の精製過程を行わず、直接、質量分析にて解析したところ 24 時間以内に反応が完結し、期待通りの目的物のみの強いイオンピークが確認された (S29)。実際に 2-メルカプトジエチルアンモニウムと反応させたものは、質量分析解析では強いイオンピークは確認されなかった。(図 3)

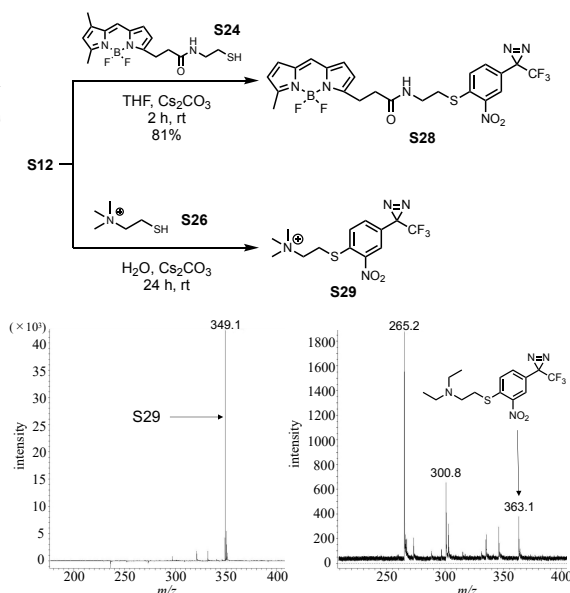
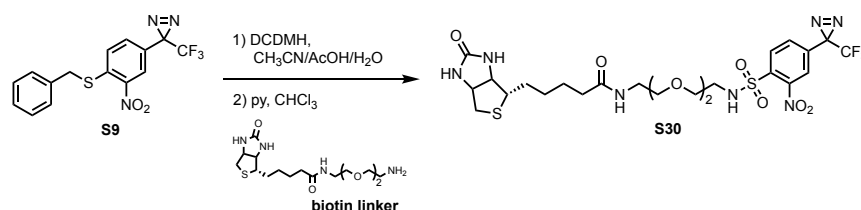


図 3

牛血清アルブミン (BSA) による Ns ジアジリン基の光ラベル化と S_NAr 反応による高感度タグ導入検討

Ns ジアジリンによる *in vitro* 中での生体分子への光ラベル効率を検討するためビオチンを搭載した S30 を調製した。S30、BSA 共に 5 μM に PBS で調製し、室温で 10 分間相互作用させた後、365 nm の波長で 0,1,5,15,30 分間光照射した。各サンプルは SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写後、HRP 結合型アビジンによって化学発光を行い、BSA への光ラベル化効率を検討した。(図 4) 定量にはビオチン結合型 BSA を予め用いて検量線を作成し、それに照らし合わせることで光ラベル化された BSA を定量した。その結果、おおよそ 20% の収率で光ラベル化されていることが確認できた。通常、従来の光プローブのラベル収率は 1-10% 程度であることから Ns ジアジリンによるラベル化効率の改善が期待できる結果になった。



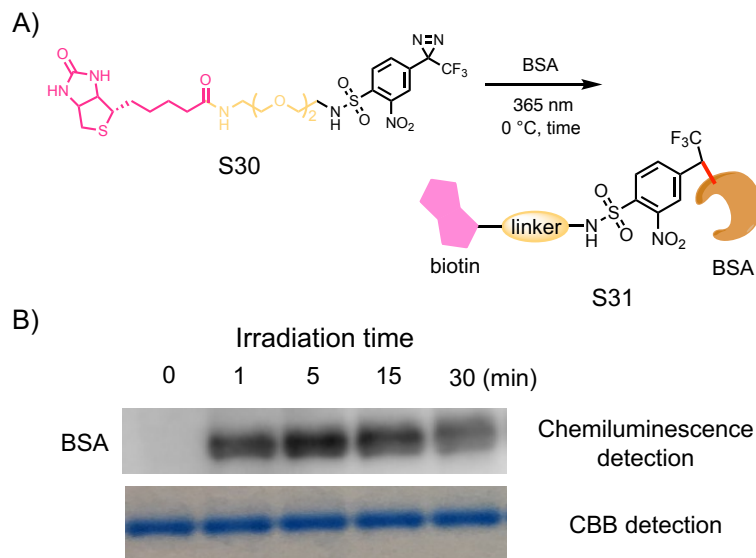


図 4

次に光ラベル化した BSA に対し S_NAr 実験を実施した。定量時と同条件で照射時間を 10 分実施後、限外濾過によって BSA を濃縮し、 $500\mu\text{M}$ の炭酸セシウム、 $500\mu\text{M}$ の bodipy チオールと室温で経時的に S_NAr を検討した。その結果、 S_NAr 時間が長くなるに連れて、BSA の蛍光強度が強くなることが確認された。24 時間実施した際、最大収率は 78% であることが確認された。(図 5) このことから生体分子にも開発した Ns ジアジリンは“光ラベル”と“ S_NAr による高感度タグ導入”が可能な次世代光プローブであることが証明できた。

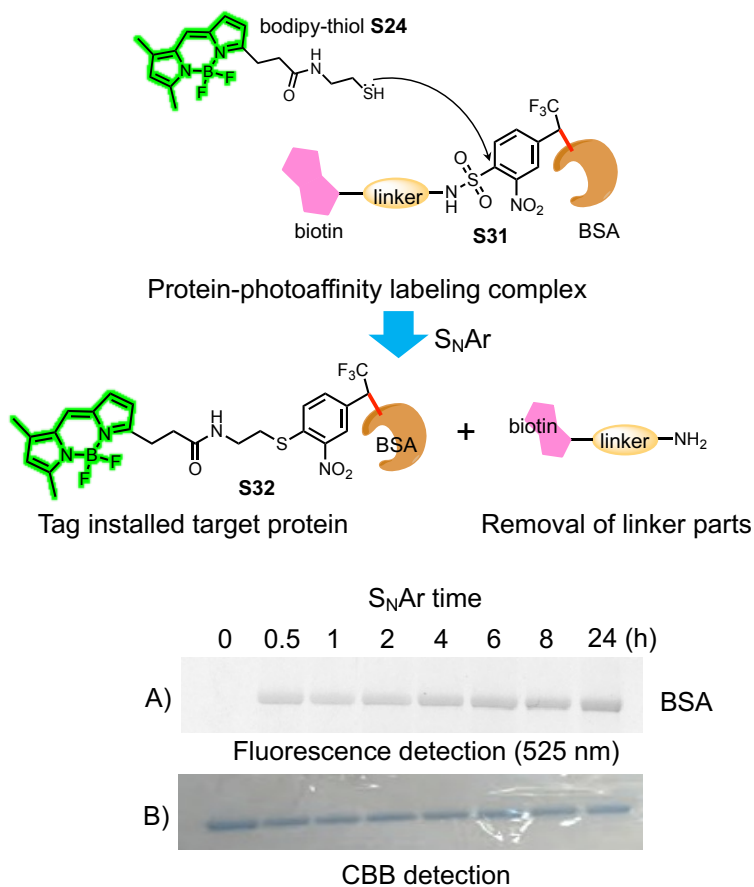


図 5

本研究成果については Aimi Suhaily Saaidin, Yuta Murai, Takuya Ishikawa, and Kenji Monde “Design and Synthesis of Ligand-Tag Exchangeable Photoaffinity Probe Utilizing Nosyl Chemistry” *Eur. J. Org. Chem.* 2019, 7563-7567. DOI: 10.1002/ejoc.201901348.にて報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saaidin Aimi Suhaily, Murai Yuta, Ishikawa Takuya, Monde Kenji	4. 巻 2019
2. 論文標題 Design and Synthesis of Ligand-Tag Exchangeable Photoaffinity Probe Utilizing Nosyl Chemistry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 7563 ~ 7567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.201901348	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 Koolath Sajeer, Murai Yuta, Suga Yoshiko, Monde Kenji	4. 巻 32
2. 論文標題 Chiral combinatorial preparation and biological evaluation of unique ceramides for inhibition of sphingomyelin synthase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chirality	6. 最初と最後の頁 308 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chir.23179	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 1. Swamy, Mahadeva M. M., Murai, Y., Ohno, Y., Jojima, K., Kihara, A., Mitsutake, S., Igarashi Y., Yu, J., Yao, M., Suga, Y., Anetai, M., Monde	4. 巻 54
2. 論文標題 Structure-inspired design of a sphingolipid mimic sphingosine-1-phosphate receptor agonist from a naturally occurring sphingomyelin synthase inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12758-12761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8cc05595e	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 磯部 利仁、村井勇太、門出健次
2. 発表標題 皮膚障害治療への応用を指向した不飽和超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの合成
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2019年夏季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Muhamad Aqmal Othman, Kohei Yuyama, Yuta Murai, Yasuyuki Igarashi, Daisuke Mikami, Yasodha Sivasothy, Khalijah Awang, Kenji Monde
2. 発表標題 Malabaricone C as Natural Sphingomyelin Synthase Inhibitor against Diet-Induced Obesity and Its Lipid Metabolism in Mice
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Murai, Mahadeva M. M. Swamy, Yusuke Ohno, Keisuke Jojima, Akio Kihara, Yasuyuki Igarashi, Kenji Monde
2. 発表標題 Creation of a sphingosine-1-phosphate mimic by chemical modification of a naturally occurring sphingomyelin synthase inhibitor
3. 学会等名 Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村井勇太, Othman Aqmal, 湯山耕平, 五十嵐靖之, 三上大輔, Sivasothy Yasodha, Awang Khalijah, 門出健次
2. 発表標題 マラバリコーンCによるスフィンゴミエリン合成酵素阻害とin vivoへの応用
3. 学会等名 第14回スフィンゴセラピー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関口晃弘, 村井勇太, 門出健次
2. 発表標題 キラルHPLCを利用したOPA化スフィンゴシンの迅速立体解析法の確立
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2020年冬季研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村井 勇太、スハイリー サエーディン アイミ、石川 卓弥、門出 健次
2. 発表標題 マルチタグ交換可能なノシル型ジアジリン光ラベル試薬の創製
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村井勇太、小林悠真、ハンマン・モスタファ、須賀好子、五十嵐靖之、門出健次
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素 2 阻害を標的としたセラミドアナログの創製
3. 学会等名 第13回ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田将平、村井勇太、五十嵐靖之、門出健次
2. 発表標題 バイオマーカー及び脂質代謝酵素の制御を指向したアミノ酸置換スフィンゴミミックの合成
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2018年夏季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aimi Suhaily Saaidin, Ishikawa Takuya, Murai Yuta, Monde Kenji
2. 発表標題 Design and Synthesis of Nosyl-type Diazirines in Photoaffinity Labelling towards the Elucidation of Ligand-Protein Binding Mode
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2018年夏季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sajeer Koolath, Murai Yuta, Suzuki Tomoya, Kanoh Hirota, Inokuchi Jin-ichi, Monde Kenji
2. 発表標題 Synthesis of stereoisomers of GM3 towards discovery of their role in obesity related insulin resistance
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2018年夏季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sajeer Koolath, Murai Yuta, Suzuki Tomoya, Kanoh Hirota, Inokuchi Jin-ichi, Monde Kenji
2. 発表標題 Synthesis of GM3 stereoisomers and investigating their effects on obesity induced insulin resistance
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村井勇太、小川 連、端野翔太、門出健次
2. 発表標題 皮膚バリアの重要因子超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの合成研究
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村井勇太、小川 連、端野翔太、磯部利仁、門出健次
2. 発表標題 -9位不飽和超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの効率的な合成研究
3. 学会等名 第11回セラミド研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木智矢、Sajeer Koolath、村井勇太、門出健次
2. 発表標題 肥満、慢性炎症に対する相互作用の解明を目指した3種の非天然型キラルGM3の合成
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2019年冬季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aimi Suhaily Saaidin, Murai Yuta, Monde Kenji
2. 発表標題 Design and Synthesis of Novel Nosyl-type Diazirines in Photoaffinity Labelling Towards the Elucidation of Ligand-Protein Binding Mode
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------