

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05726

研究課題名（和文）ボロキサゾリドン形成を鍵とする新規タンパク質修飾法の開発

研究課題名（英文）Boroxazolidone formation as a key reaction for the protein modification

研究代表者

齋藤 洋平（Saito, Yohei）

金沢大学・先進予防医学研究センター・助教

研究者番号：90723825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質を始めとする生体高分子の構造・機能維持には水溶液中での取り扱い、及びその温度管理が極めて重要である。本研究では温度感受性の高い生体高分子の化学修飾へ適用することを念頭に、ホウ素原子とアミノ酸から構成される5員環状のキレート化合物（ボロキサゾリドン）に着目し、本構造を水溶液中で効率的に形成するための条件をアミノ酸側鎖、及びホウ素原子上の置換基を精査することで見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウ素原子を含む有機化合物はフェニルボロン酸などの一部を除き水溶液中では不安定であり、その多くは水を含まない有機溶媒中での使用に限られていた。本研究では適切な置換基構造を有する分子設計により水溶液中でも利用可能な様々な有機ホウ素化合物を創出し、本構造が生体高分子への化学修飾にも有用であることを明らかにした。今後は本成果を利用して、生命現象の解明や医薬品開発への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：The handling and temperature control of biomacromolecules such as proteins in an aqueous solution are extremely important to maintain their structure and function. In this study, we developed the conditions for effective formation of boroxazolidone, five membered ring chelate compound constructed from boron and amino acids, in aqueous solution by examining the amino acid side chain and the substituents on boron atom, which could be applied for the chemical modification of biomacromolecules.

研究分野：生物分子化学

キーワード：タンパク質化学修飾 化学プローブ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物活性化合物の標的タンパク質同定は、その活性が細胞内、あるいは生体内でどのように発揮されるか明らかにするために重要な研究段階である。その手法として生物活性化合物の誘導体化(標識化)は、未知の標的を同定する手法として多用されるものの、それに起因する活性低下により機能しない場合も多く、画期的で有効な手法の開発が望まれている。

申請者はアルキルボリン酸エステルとアミノ酸とが 5 員環状のボロキサゾリドン形成する水中有機反応に着目し、新たな標的タンパク質同定法に応用できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究ではボリン酸を基にして、低分子化合物とその結合タンパク質を同定するための新たな手法を開発することを目的とする。アルキルボリン酸エステル ( $R_2BOR'$ ) は  $\alpha$ -アミノ酸と反応し、高収率にボロキサゾリドン形成する (*J. Organomet. Chem.* **1988**, *341*, 73–81.)。我々も独自の研究においてジアリールボリン酸が  $\alpha$ -アミノ酸と反応し、ボロキサゾリドンが沈殿として得られることを見出した(図1)。本反応は水存在下でも進行可能な水中有機反応であることから、オリゴペプチド、タンパク質を含めた生体高分子化合物の化学修飾にも有用であると考えられた。開発に成功すれば、未知の標的タンパク質同定に有効な選択肢の一つとして生理活性化合物の作用機序解明研究に貢献することが期待される。

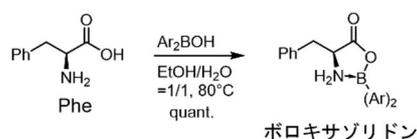


図1. ボリン酸とアミノ酸との反応

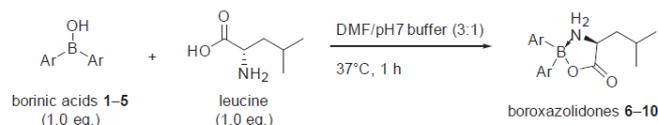
### 3. 研究の方法

アミノ酸とボリン酸を基にした生体分子の化学修飾の実現には、効率的なボロキサゾリドン形成が必要である。しかしながら、これまでに報告されている形成条件は 80°C以上の高温を要するため、生体分子が構造的、機能的にも耐えうる生理的条件下での形成が最低限求められる。そこでボロキサゾリドンの形成温度、及び時間を 37°C、1 時間と固定して、芳香環上の置換基効果、アミノ酸側鎖の影響、基質適用範囲を検証することにした。

### 4. 研究成果

#### 芳香環上の置換基効果

芳香環上の置換基には無置換のジフェニルボリン酸 **1** を基準に電子供与性のメトキシ基 (OMe) 及び電子求引性のフルオロ基 (F)、クロロ基 (Cl)、トリフルオロメチル基 (CF<sub>3</sub>) を導入したジアリールボリン酸 **2-5** を合成した。続いてアミノ酸にロイシン (Leu) を選択し、DMF 存在下りん酸緩衝液中ボロキサゾリドン形成を試みた。その結果、無置換の **1** では単離収率 43% で所望のボロキサゾリドン **6** が得られた。OMe 基を導入した **2** では複雑な混合物を与えるのみで、**7** は得られなかった。一方、電子求引性基を導入した **3-5** では 77–88% と良好な収率で **8-10** を与えた(図2)。本結果は芳香環上の電子求引性基がボロキサゾリドン形成に有利であることを示す。

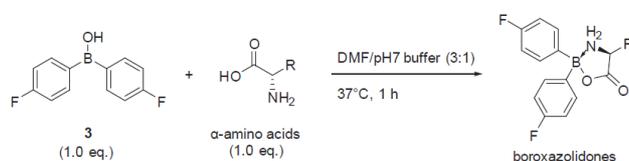


Borinic acids	Products (yield)
<b>1</b> Ar =	<b>6</b> (43%)
<b>2</b> Ar =	<b>7</b> (-) complex mixture
<b>3</b> Ar =	<b>8</b> (87%)
<b>4</b> Ar =	<b>9</b> (88%)
<b>5</b> Ar =	<b>10</b> (77%)

図2. 各種ジアリールボリン酸とロイシンとの反応

## アミノ酸側鎖の影響

アミノ酸は側鎖の違いにより水溶性、等電点が大きく異なることから、同一条件におけるボロキサゾリドン形成の可否に側鎖が影響を与える可能性が考えられた。そこで 20 種類の天然アミノ酸について、その影響を評価することにした。収率の算出には  $^{19}\text{F}$ -NMR の利用を考案した。まず、ビス(4-フルオロフェニル)ボリン酸 **3** とロイシンと反応させたボロキサゾリドン **8** の化学シフトを比較した結果、それぞれ  $-111.6$  ppm と  $-118.2$  ppm にピークが検出されたことから同一チャート上で識別可能であることが予想された。続いて、両化合物と化学シフトが重複しない 4,4'-ジフルオロベンゾフェノン ( $-107.5$  ppm) を内部標準に選抜した。反応混合液に適用したところ、**3**、**8**、内部標準の 3 つはすべて異なる位置に出現し、チャート上で識別可能であること、更に積分比が生成比を反映可能であることが判明した。内部標準の積分値が 1.00 に対し、出発原料 **3** の積分値が 0.93、反応 1 時間後の生成物の積分値が 0.82 であることから、収率 88% ( $0.82/0.93=0.88$ ) と算出した。本手法をその他のアミノ酸との反応にも適用し収率を計算したところ、多くのアミノ酸で 80% 以上の収率でボロキサゾリドンが形成されることが判明した (図 3)。本結果は、生理的温度で様々なアミノ酸がボロキサゾリドン形成可能であること示した初めての例である。一方、アルギニンやリシンといった遊離アミノ基の存在はボロキサゾリドン形成に不利であることも明らかとなった。



Entry	Amino acids	R	Yield <sup>a</sup> (%)	Entry	Amino acids	R	Yield <sup>a</sup> (%)
1	Ala	CH <sub>3</sub>	85	11	Leu		88
2	Arg		32	12	Lys		30
3	Asn		77	13	Met		91
4	Asp		85	14	Phe		83
5	Cys		80	15	Pro		87
6	Gln		89	16	Ser		72
7	Glu		89	17	Thr		48
8	Gly	H	84	18	Trp		88
9	His		89	19	Tyr		88
10	Ile		95	20	Val		95

図 3.  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルより算出した各種アミノ酸とのボロキサゾリドン形成収率

## 基質適用範囲

$\alpha$ -アミノ酸由来の 5 員環ボロキサゾリドンが効率的に得られることが判明したため、6 員環化合物の形成が可能か検証することにした。 $\beta$ -アミノ酸として  $\beta$ -アラニン、 $\beta$ -フェニルアラニン、3-アミノ酪酸をボリン酸 **3** と反応させたところ、最高 95% の収率で所望の化合物を与えた。本結果は  $\beta$ -アミノ酸構造も生体分子化学修飾に有用である可能性を示唆する。

続いて生物活性化合物のモデル基質としてピオシチンを選択し、**3** との反応に適用した。単離収率 82% でボロキサゾリドンを与えたことから、本反応はタンパク質を標的とする生物活性分子においても機能することが示された。

以上の結果から、ボロキサゾリドンの形成が生物活性分子中に存在する様々な官能基の影響を受けずに生理的温度で短時間に進行可能であることが示され、今後は本反応を利用した生体分子化学修飾の実現が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Saito Yohei, Yoshida Nanami, Nakagawa-Goto Kyoko	4. 巻 50
2. 論文標題 Boroxazolidone Formation under Physiological Conditions as a Tool for the Chemical Modification of Biomolecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1695 ~ 1698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.210352	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田部井 透矢、後藤（中川）享子、斎藤 洋平
2. 発表標題 ジアリールポリリン酸を利用した標的タンパク質同定法の開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斎藤洋平、吉田菜々美、後藤（中川）享子
2. 発表標題 生体分子の化学修飾を志向した温和な条件におけるポロキサゾリドン形成
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021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
---------	---------