

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510219

研究課題名（和文） 固層担体を利用した効率的な光アフィニティーラベル法の開発

研究課題名（英文） Applications of solid phase for photoaffinity labeling

研究代表者

橋本 誠 (HASHIMOTO MAKOTO)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90292094

研究成果の概要（和文）：

「光反応性 trifluoromethylphenyldiazirine 含有ビオチン導入化合物と単量体アビジン担体を利用した固層上での光アフィニティーラベルによる生体高分子・生理活性物質機能解析法の確立」を目的に以下の研究を行い、それぞれに対応する成果を上げた。

(1) 光反応性基含有ビオチン化合物の合成

光反応性トリフルオロメチルジアジリン含有ビオチン化合物の合成について検討しその固層担体への吸着・解離、固層上での光反応による効率的な反応活性種の発生を確認した。

(2) 単量体アビジン固層上における光反応性ビオチン化リガンドを用いた光アフィニティーラベルの検討

前項での知見を元にトリフルオロメチルフェニルジアジリン含有光反応性ならびにビオチンを持つアミノ酸誘導体を不斉合成により調整し、L-アミノ酸酸化酵素(LAAO)の光アフィニティーラベルを検討した。固層上での光アフィニティーラベルを検討した所、液層における実験よりも標識効率が低いことが明らかとなった。

(3) 新規ビオチン誘導体の合成とアビジンへの親和性測定の検討

前項での標識効率の低下を対象蛋白質と固定化リガンドの物理的距離による可能性を検証するために、ビオチンの溶解性に優れ触媒を持つトリフルオロメタンスルホン酸を利用してフリーデル・クラフト反応を達成した。合成化合物群とアビジンとの親和性測定ではビオチンよりも強い活性を持っている事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Novel functional analysis of pinteractions between biomolecules and bioactive compounds with photoreactive trifluoromethylphenyldiazirine containing biotin derivative and immobilized monomeric avidin were examined. New findings are listed below.

(1) Synthesis of photoreactive biotinylated compounds

(2) Photoaffinity labeling with photoreactive biotinylated ligands on immobilized monomeric avidin.

(3) Novel synthesis of biotinylated compounds, which was prepared by Friedel-Crafts reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

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、アビジン-ビオチン、固層担体、有機化学反応

1. 研究開始当初の背景

これまでの詳細な光アフィニティーラベルの検討により、目的達成のために必要な条件設定も明らかとなってきた。

- (1) 光反応性リガンドと生体高分子が化学量論的に等しい状況にあること。
- (2) 効率的なジアジリンから反応活性種カルベン発生のために、光反応性リガンドの濃度を数 mM に設定すること。
- (3) 光ラベル後のラベルされた生体高分子の検出、単離に利用するアビジン-ビオチン特異的相互作用を利用する部分では、アビジン（4量体）はビオチンとの親和性が異常に高く、吸着したビオチン化合物を損傷なく回収するのは非常に難しい等の点が問題となることが明らかとなっていた。

これを解決するために4量体よりも親和性が低い、解離が簡便である固定化単量体アビジンを用いた、固層上での光アフィニティーラベルの確立を目的とし、実験を開始した。

2. 研究の目的

- (1) 新規ビオチン化ジアジリン化合物の合成とその単量体アビジン固層上での光分解の検討

光アフィニティーラベルに頻繁に使用される光反応性基のうち、種々の有機化学反応に最も安定性が高く、さらに生体高分子に影響の少ない 350nm 付近の光により反応活性種を生成するトリフルオロメチルフェニルジアジリンを選択するが、その大量合成を確立し研究推進に支障のないように配慮する。このジアジリン化合物のビオチン化に関して、これまでのビオチン化はビオチン分子内のカルボキシル基を利用したアミド化反応

を用いられてきたが、ごく最近申請者が確立した強酸性物質であるトリフルオロメタンスルホン酸により有機溶媒に溶解性の低いビオチン分子の溶解を容易にし、さらにフリーデルクラフツ反応を触媒することを受け、アミド結合を持たない新規ビオチン化ジアジリン化合物を合成し、そのアビジン-ビオチン相互作用に対する影響を調べる。

合成した様々なビオチン化ジアジリンを単量体アビジン固層に吸着後、時間ごとに350nm付近の光照射を行いビオチンで溶出後、溶出液のUV吸収、¹⁹F-NMRなどにより固層上でも光反応が進行することを確認する。ここで固層にすることにより異性化などの副反応が起きる場合には300nm付近の光照射を行うことにより光分解の効率化を検討する。

- (2) 単量体アビジン固層上における光反応性ビオチン化リガンドを用いた光アフィニティーラベルの検討

合成、性質検討を行った光反応性ビオチン化リガンドの中で光アフィニティーラベル試薬としての条件を満たす化合物に関し実際の蛋白質レベルにおける以下の挙動を検討する。

- (2)-① 通常行われる液層での一連の実験を行うことで、蛋白質レベルでの固層における利点、欠点等を明らかとする。
- (2)-② 光ラベルされたペプチド同定手法の検討を行う。固定化された蛋白質の固層上での酵素消化を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 新規ビオチン化ジアジリン化合物の合成とその単量体アビジン固層上での光分解の

検討

ジアジリン化合物のビオチン化に関して、合成した様々なビオチン化ジアジリンを単量体アビジン固層に吸着後、時間ごとに350 nm付近の照射を行いビオチンで溶出後、溶出液のUV吸収、 $^{19}\text{F-NMR}$ などにより固層上でも光反応が進行することを確認する。ここで固層にすることにより異性化などの副反応が起きる場合には300 nm付近の照射を行うことにより光分解の効率化を検討する。

(2) 単量体アビジン固層上における光反応性ビオチン化リガンドを用いた光アフィニティーラベルの検討

(1)項で合成、固層上での性質検討を行った物の中で、光反応性ならびにビオチンを持つアミノ酸誘導体を不斉合成により調製し、L-アミノ酸酸化酵素(LAAO)による酵素反応に供した所、天然基質であるフェニルアラニンと同程度の親和性を持つことが明らかとなった。この化合物を単量体アビジン担体に吸着させ、LAAOに対するアフィニティークロマトグラフィーを行い目的の性質を持つ事を確認した後、固層上での光アフィニティーラベルを検討する。

4. 研究成果

(1) 光反応性基含有ビオチン化合物の合成

現時点で最も利用される光反応性基である、アリルアジド、ベンゾフェノン、トリフルオロメチルフェニルジアジリンの3種について、実際の生体系適用時の濃度における光反応性を検討し、トリフルオロメチルジアジリンが最も副反応が少なく、短時間の照射により反応活性種を発生できる事が明らかとした。

そこで光反応性トリフルオロメチルジアジリン含有ビオチン化合物の合成について検討した。ビオチンの溶解性を上げる溶媒N,N-ジメチルホルムアミド、トリフルオロメタンスルホン酸を用いることで効率的な合成可能であることを明らかとした。また通常の有機化合物では溶解性の高いアセトニトリルがビオチンを結晶化にする性質を持つことから、生成物の単離精製に有用であることも明らかとした。合成した光反応性ビオチン誘導体を固定化単量体アビジンと結合させたところ、効率的にビオチン誘導体を吸着し、通常の緩衝液などの処理では解離せず、ビオチン誘導体を流すことにより解離することを確認した。光反応性

ビオチン誘導体が吸着した状態で固層ごと照射し、ビオチン誘導体で解離させることで固層上でのジアジリン基の光分解効率をUVならびにNMRを用いて検討した。その結果通常の液層状態での照射と大きく変わることのない効率(分解時間等)で光分解されることを明らかにすることができた。

(2) 単量体アビジン固層上における光反応性ビオチン化リガンドを用いた光アフィニティーラベルの検討

(1)項で合成に成功した化合物のうち最も光反応性の高かったトリフルオロメチルフェニルジアジリンを利用し、光反応性ならびにビオチンを持つアミノ酸誘導体を不斉合成により調製した。この化合物のL-アミノ酸酸化酵素(LAAO)による酵素反応に供した所、天然基質であるフェニルアラニンと同程度の親和性を持つことが明らかとなった。この化合物を単量体アビジン担体に吸着させ、LAAOに対するアフィニティークロマトグラフィーを行った所、目的蛋白質の保持、ならびに過剰のビオチンによる溶出が確認された。この担体を用い、固層上での光アフィニティーラベルを検討した所、液層における実験よりも標識効率が低いことが明らかとなった。これはリガンドの配向性が固定されたことにより、①非特異的な標識が減少したものによるものか、もしくは②光反応性基と対象蛋白質距離が離れてしまった等が理由として考えられる。今後はこの標識率の低下の原因を明らかにすることを検討していく。

また、溶出後の検出法としての安定同位体標識光反応性化合物の合成もあわせて検討した。アミノ酸の重水素標識法である、酢酸中におけるサリチルアルデヒドとの反応をトリフルオロメチルフェニルジアジリン含有アミノ酸に適用した。この反応には加熱条件が必要であるが、ジアジリン基は酸性条件の加熱に比較的不安定であることが知られている。種々条件を検討した所、通常アミノ酸の反応よりも短時間にする事でジアジリンが分解することなく重水素導入が可能であることが明らかとなった。

3) 新規ビオチン誘導体の合成と(ストレプト)アビジンへの親和性測定の検討

(2)項で行った光アフィニティーラベル化後にビオチンとアビジンの親和性があまりにも強いために引き起こされる、吸着ラベル分子の難脱離性を克服するために、新規ビオチン誘導体の合成に着手した。ビオチン分子はその難容性のため種々の有機反応による誘導体化法が制限されていた。ビ

オチン分子中のカルボン酸を利用した反応では、容易なアミド化が最も良く使われており、それ以外の有機反応はほとんど検討されていなかった。そこでブレンステッド酸であるトリフルオロメタンスルホン酸がビオチンの溶解性に優れ、その強酸性性質による芳香族化合物とのフリーデル・クラフト反応触媒もあわせて持つ事を発見した。種々の芳香族との反応において通常の配向性に従い高収率でフリーデル・クラフト生成物を短時間で与えることを明らかとした。合成した化合物群に対し HABA (4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid) とアビジン複合体に対する合成化合物群の displacement 実験を行った。その結果これまでこの評価系ではビオチンよりも親和性が強くなる誘導体はほとんど報告されていなかったが、カルボン酸部分を aryl ketone に置き換えた化合物群のほとんどがビオチンと同程度か、それより高い親和性を示した。現在この強親和性が、導入した aryl 部分の HABA 類似構造による物なのかどうかの確認を検討中である。

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 8 件)

1) Yuka Tsunekawa, Katsuyoshi Masuda, Miho Muto, Yasuyuki Muto, Yuta Murai, Yasuyuki Hashidoko, Yoshitake Orikasa, Yuji Oda, Yasumaru Hatanaka, Makoto Hashimoto, Chemo-enzymatic synthesis of 1'-photoreactive sucrose derivatives via ether linkage, *Heterocycles*, 84, 283-290 (2012).

(査読有)

2) Yuta Murai, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto, Novel synthesis of optically active bishomotyrosine derivatives using the Friedel-Crafts reaction in triflic acid, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 352-354 (2011).

(査読有)

3) Ryo Murashige, Yuka Hayashi, Syo Ohmori, Ayuko Torii, Yoko Aizu, Yasuyuki Muto, Yuta Murai, Yuji Oda, Makoto Hashimoto, Comparisons of O-acylation and Friedel-Crafts acylation of phenols and acyl chlorides and Fries rearrangement of phenyl esters in trifluoromethanesulfonic acid: Effective synthesis of optically active homotyrosines, *Tetrahedron*, 67, 641-649 (2011)

(査読有)

4) Yuta Murai, Miho Takahashi, Yasuyuki Muto, Yasumaru Hatanaka, Makoto Hashimoto Simple deuterium introduction at α -position of carbonyl in diazirinyl derivatives for photoaffinity labeling, *Heterocycles*, 82, 909-915 (2010).

(査読有)

5) Makoto Hashimoto, Keitaro Furukawa, Takenori Tomohiro, Yasumaru Hatanaka, Synthesis and properties of diazirinyl organo-platinum compounds for manipulations of photoaffinity labeled components, *Chem. Pharm. Bull.*, 58, 405-407 (2010)

(査読有)

6) Katsuyoshi Masuda, Ayako Koizumi, Takumi Misaka, Yasumaru Hatanaka, Keiko Abe, Takaharu Tanaka, Masaji Ishiguro, Makoto Hashimoto, Photoactive ligands probing the sweet taste receptor. Design and synthesis of highly potent diazirinyl D-phenylalanine derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 1081-1083 (2010).

(査読有)

7) Yuta Murai, Yasumaru Hatanaka, Yuichi Kanaoka, Makoto Hashimoto, Effective synthesis of optically active 3-phenyl-3-(3-trifluoromethyl) diazirinyl bishomophenylalanine derivatives, *Heterocycles* 79. 359-364 (2009)

(査読有)

8) Ryo Murashige, Yuta Murai, Yasumaru Hatanaka, Makoto Hashimoto, Effective synthesis of optically active trifluoromethyldiazirinyl homophenylalanine and aroylalanine derivatives with Friedel-Crafts reactions in triflic acid, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73. 1377-1380 (2009).

(査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1) 橋本 誠、畑中保丸、味覚関連アミノ酸およびペプチド用光アフィニティーラベル試薬合成、日本薬学会第 129 年会、岡山、平成 22 年 3 月 (ハイライトポスター選定)

2) 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合成、日本薬学会第 129 年会、京都、平成 21 年 3 月

3) 橋本 誠、機能性解析を指向した光アフィニティーラベル法の開発
日本農芸化学会北海道支部奨励賞受賞講演.
札幌、平成21年8月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 誠 (HASHIMOTO MAKOTO)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：90292094