

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 6月12日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21550160

研究課題名（和文） 生命鎖プローブの構築と機能

研究課題名（英文） Probe for bio-oligomers and elucidation of their function

研究代表者

真木 俊英 (MAKI TOSHIHIDE)

長崎大学・産学官連携戦略本部・准教授

研究者番号：10291535

研究成果の概要（和文）：

複雑な生命鎖分子の検出を容易にする一般的前処理法の確立、および光開裂性分子の機能性向上を目指して研究を行い、以下の成果を得た。プローブの核となる光開裂性骨格の Fries 反応を用いる効率的な合成法を確立した。本法は、シリカゲルカラムクロマトグラフ法による精製過程を必要とせず、沈澱と再結晶のみで最終生成物まで導くことができる合成法である。次いで、弱塩基条件下での水酸基のエーテル化を達成する方法を開発し、生命鎖分子の疎水性を増大させるための誘導化法の基礎条件を確立した。糖鎖を標的とするジケトン型分子捕捉部位を有する光開裂性分子の簡便な合成法を確立した。糖鎖を標的とするジケトン型分子捕捉部位を有する光開裂性分子の簡便な合成法を確立した。分子捕捉部位となるホルミル基を活性階するという着想に基づいたデザインである。質量分析用標識剤は、分子量が小さくなるほど検出感度が向上する。先の分子デザインにより、標識剤全体の分子量を低く抑えることにより感度低下を防ぐことに成功した。

研究成果の概要（英文）：

General procedures for derivatization of multi functionalized bio-oligomers and exploitation of new function to capture a target molecules connecting photocleavable molecular tag were achieved in this research.

Along with the experiment, a new synthetic route for the photocleavable molecular tag for laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS) was achieved using Fries reaction of 2,6-dimethylphenyl ester as its key reaction. Zirconium chloride was found as uniquely efficient adjuvant to promote the reaction. The molecular tag was obtained in 5 steps without chromatographic purification.

And, the Benzylation of hydroxyl groups in the presence of tertiary amines is established. A mixture of an alcohol and a benzyl halide afforded the corresponding benzyl ether in good to excellent yields in the presence of diisopropylethylamine. The importance of solventless conditions was observed. The reaction showed high tolerance to many functional groups including benzoate, even at a reaction temperature of 150 °C. Sodium iodide was found to be an efficient catalyst to accelerate the reaction. The simple operation was successfully applied for pre-treatment of LDI-MS analysis.

Then, new trapping agent for sugars targeting 1,2-diol motif by mean of ketal formation reaction. Photocleavable molecular tag bearing alpha diketone functionality was designed and synthesized. Since the compound does not have redundant tether substructure, high sensitivity is comparable with compounds previously prepared.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：質量分析用分子標識剤，光開裂性分子，エーテル結合形成，ベンジル化

1. 研究開始当初の背景

現在利用されている生命反応を追跡するプローブは、光吸収、発光を伴う様なレポーター分子を基質へ組み込むことで作成されている。しかし、このアプローチでは、研究する分子構造に大きな制限が生じるために分子構造に対する詳細な反応選択性に関する情報を得ることが難しかった。

我々は、これまでにレーザー脱離イオン化条件において選択的にイオン化され、質量分析計により高感度に検出される光開裂性物質を開発していた。質量分析による分子プローブ構築は、蛍光や吸光度の変化を利用する方法に比較して、分子プローブに対する構造的制約が小さい、容易に生命鎖の構造的特徴に基づく反応を解析・評価するための有用な生命鎖プローブを開発できるとの着想に至った。加えて、質量分析法による検出は、質量変化を伴うあらゆる構造変化を認識することが可能であることから、切断だけではなく、リン酸化、アセチル化などの、同一基質に対する複雑な化学修飾を漏らさずに検出することが可能であることが期待された。

この様な背景の下、光開裂性分子プローブを基盤として、生命鎖プローブを一般的に構築する技術、および新しい機能開発を視野に入れて本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究課題で、申請者らは、独自に開発した質量分析用光開裂性分子を1～20個程度のアミノ酸、または糖ユニットからなるペプチドやオリゴ糖に組み込んだ代表的な生命鎖分子プローブのモデルを合成する。次いで、このものを利用したレーザー脱離イオン化質量分析による定量評価における側鎖等官能基の応答特性への影響を明らかにすることにより、生命鎖の光開裂性分子標識化体の選択的かつ定量的な質量分析法を確立する。そして、これらの生命鎖分子プローブを構築するために必要な、官能基選択性を有す

る捕捉基、標的分子の高感度検出を可能にする分子誘導化法を確立する。

3. 研究の方法

本研究課題は、申請者らが独自に開発し、上市準備が進められている光開裂性分子標識剤を用いて実施に着手した。この光開裂性分子は、レーザー脱離イオン化質量分析の条件下において、ベンジルエーテル型の炭素-酸素結合が開裂し、負イオン検出モードではアシルフェノレートとして、正イオン検出モードではアシルフェノールのナトリウム付加体として検出される。また、スクシンイミドエステル基を導入することにより、求核性のアミンに対して容易にアミド結合を経て結合させることができる。そして、この光開裂性分子を標識剤として用いる質量分析は、マトリックスを共存させることなく、 m/z に依存した応答特性が得られることが既に判明していた。

まず、糖ユニットに光開裂性分子を導入したオリゴ糖プローブの合成を行った。まずは、市販されているオリゴ糖に対して2+3環化付加反応 (click chemistry) を利用して結合を形成させた。

この様にして得たオリゴ糖分子プローブのLDI-MSにおいて、側鎖官能基、光開裂性分子の導入位置とシグナル応答強度についての応答特性を研究した。

得られた結果に基づき、光開裂性分子の導入手法の多様化、高機能化、および生命鎖分の容易に疎水性を向上させて検出感度を上げる方法が必要であることが判明した。そのためには、まず、研究の基盤となる光開裂性分子を安価に充分な量を確保するための合成法の改良を試みた。次いで、新しい分子デザインを行い、基質選択性についての研究を行った。最終的に生命鎖分子の質量分析により高感度検出するためには、基質の疎水性向上を簡便に実現する必要があり、水酸基のマスキングを行うための一

般法の開発に着手した。

4. 研究成果

鶏卵から2分岐 N-型糖鎖を分離精製した。これらの生命鎖分子に、質量分析用分子標識剤を効率的に導入するための反応条件を確立した。即ち、エタノール溶媒を用いて、3級アミン存在下で加熱することにより、効果的にアシル基を導入できることを見いだした。しかし、生命鎖分子は、一般に水溶性であり、研究用いるオリゴ糖も、非常に強い親水性分子である。質量分析による高感度測定を達成するためには、疎水性基質への変換手順が必要であることが判明した。

一方、プローブの核となる光開裂性骨格の Fries 反応を用いる効率的な合成法を確立した (図1)。

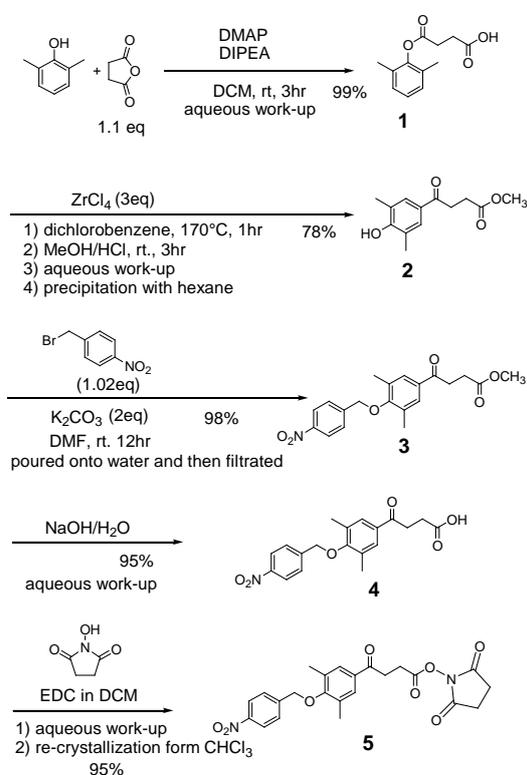


図1 カラムクロマトグラフ法による精製操作を要しない光開裂性分子 **5** の新規合成法

本法は、安価に入手容易な出発原料のみを用いて、Fries 反応により一挙に鍵となる化合物 **2** を構築する方法である。既存の反応条件では、カルボキシル基を有する **1** の Fries 反応は、低収率でしか反応が進行しないが、塩化ジルコニウムを用いる方法により、効率的に反応が進行することを見いだした。シリカゲルカラムクロマトグラフ法による精製過程を必要とせず、沈澱と再結晶のみで最終生成物まで導くことができる合成法である。安価かつ短時間で供給を可能とすること

により、標識剤としての利便性が高まったものと考えている。さらに、本合成ルートを用いることにより、カルボキシル基を標的とする新しい形式の標識剤の合成に成功した。すなわち、 α -ヨードケトン型の標識剤の開拓を行った。このものは、エステル、またはエーテル結合で標的に導入することが可能であるために、生命鎖分子の誘導化のために足場となりえる官能基を大幅に増やすことが可能である。

次いで、複雑な生命鎖分子に対する水酸基の選択的なエーテル化などによる生命鎖分子の疎水性を増大させるための誘導化法の基礎的な検討を進めた。

表1 ジイソプロピルアミン存在下での水酸基のベンジル化反応

entry	R ¹ -OH	R ² -X ^[c]	R ¹ -O-R ²	Yield(%) ^[a]
1	1	BnBr	11b	87
2		PMBCl	12a	98
3	2	BnBr ^[d]	12b	99
4	NC-CH ₂ -CH ₂ -OH	PMBCl	13a	85
5	3	BnBr	13b	89
6	BzO-CH ₂ -CH ₂ -OH	PMBCl	14a	91
7	4	BnBr	14b	86
8		PMBCl	15a	90
9	5	BnBr ^[c]	15b	94
10		PMBCl	16a	98
11	6	BnBr	16b	94
12		PMBCl ^[c]	17a	98
13	7	BnBr	17b	89
14	Ph-CH(OH)-Me	PMBCl	18b	92
15		BnBr	19b	95
16		PMBCl	20a	98
17	10	BnBr	20b	99

a) 単離収率, b) 特に記載がないものは 1.1 当量の R²-X と 1.2 当量のジイソプロピルアミンを用いて実施した結果である。c) 1.5 当量の R²-X と 1.6 当量のジイソプロピルアミンを用いた。

即ち、臭化ベンジルの反応性は、塩化パラメトキシベンジル比較して、やや反応性に劣る傾向が観察されたが、いずれを用いた場合でも良い収率でエーテル結合が形成された。

反応は、相対的に高い反応温度を必要とするが、3級アミンの塩基性で反応が進行するために、多くの官能基と共存可能であることが明らかになった。例えば、エステル、シアノ基、カルボニル、炭素不飽和結合である。この結果は、官能基を保全するための条件として、温度よりもむしろ pH 条件が遙かに重要であることを示す結果である。また、既存の塩基性条件では困難である2級ハロゲン化物によるアルキル化も可能であることを明らかにした。

実際、糖誘導体に対してもエステル等の官能基に影響を及ぼすことなくエーテル結合を形成させることに成功した (図2)。

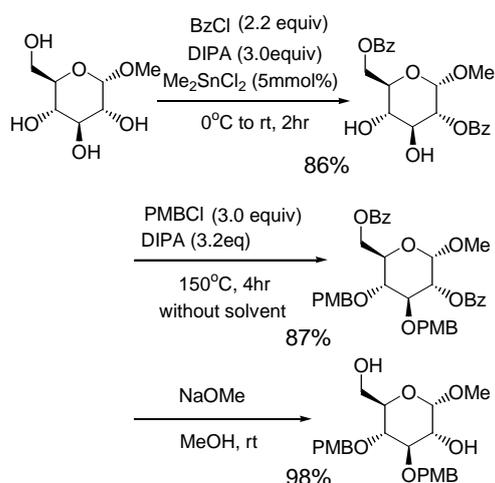


図2 エステルによる保護一脱保護反応

これらの反応は、いずれも既存の方法を用いては達成し得ない反応である。極めて単純な操作で、高収率で変換が達成でき、添加する反応剤は、3級アミンとアルキル化剤のみであり、減圧下、あるいは水による洗浄操作により容易に副生成物を除去できるという標的基質誘導化法として優れた特徴を備えている。無用媒系で瞬間的に強熱することにより誘導化を達成するプロセスは、新しい自動誘導化装置の開発にもつながると願が得られ、よりハイスループットな分析を可能にする鍵反応になるものと考えている。実際、誘導化を行った反応混合物を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 用の試料プレート上でオンスポット洗浄操作が可能であることを確認した。

一方、スクシンイミドエステル型分子捕捉基は、標的分子内に1級、もしくは2級アミノ基が存在することを要求する。そこで糖誘導体を捕捉するための新しい分子捕捉官能基の検討を進め、ジケトン型分子捕捉部位を有する光開裂性分子の簡便な合成法を確立した。この分子は、光開裂性を発現するために必要なカルボニル構造を利用して、分子捕

捉部位となるホルミル基を活性階するという着想に基づいたデザインである。質量分析用標識剤は、分子量が小さくなるほど検出感度が向上する。先の分子デザインにより、標識剤全体の分子量を低く抑えることに成功した。本分子は、期待通り1, 2-ジオール構造を効果的に捕捉し、レーザー脱離イオン化条件下において、LDI-MSによる高感度検出が可能であることを確認した。

以上、今日までの研究成果として、標的分子の疎水性を向上させる誘導化法、標的分析を捕捉する機能性を有する光開裂性分子の開発を達成し、基本的な部分を構成する要素技術は、確立されつつある。

本研究成果は、我々が開発した光開裂性分子を用いる質量分析のみならず、一般的な質量分析法による反応スクリーニングにも貢献できると考えている。一方、本反応から得られた知見に基づき、新たに、より強力な分子捕捉反応へ発展できる可能性が見いだされており、本分野の継続的な発展が期待できる。

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)

Jeremiah W. Gathirwa, Toshihide Maki, Benzylolation of hydroxy groups with tertiary amine as a base, *Tetrahedron*, 査読あり, 68巻, 2012, pp.370-375.

Jeremiah W. Gathirwa, Toshihide Maki, Concise Synthesis of Photocleavable Molecular Tag for Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry via Fries Reaction, *Synthetic Communications*, 査読あり, 印刷中, 2012.

[学会発表] (計4件)

- ① 1. 真木俊英: 質量分析のための光イオン化デバイスの探索: 有機合成化学協会九州山口支部 第21回若手研究者のためのセミナー 要旨集: , p. 1-4, 2009年 12月19日 (福岡)。
- ② Jeremiah Gathirwa, 真木俊英 Fries reaction を鍵反応とするレーザー脱離イオン化質量分析用光開裂性分子タグの効率的合成, 2010年日本化学会西日本大会講演要旨集 p. 170, 2010年 11月6, 7日、熊本大学 (熊本) .
- ③ Jeremiah Gathirwa, 真木俊英, 触媒的エーテル結合形成反応, 2011年 日本化

学会西日本大会要旨集 P.240, 2011年11月12,13日(徳島)。

- ④ Jeremiah Gathirwa, 真木俊英,
Bebzylolation of hydroxy groups under
weark basic conditions, The 2nd
International Symposium on Process
Chemistry要旨集pp.106-107, 2011年8
月12,13日(京都)。

[その他]

ホームページ等

[http://www.jrc.nagasaki-u.ac.jp/sentan/
kouzou/index.html](http://www.jrc.nagasaki-u.ac.jp/sentan/kouzou/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真木 俊英 (MAKI TOSHIHIDE)

長崎大学・産学官連携戦略本部・准教授

研究者番号：10291535