

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651244

研究課題名(和文) 金属エノラートを鍵とする新規アフィニティー精製法の開発

研究課題名(英文) Development of novel affinity purification method using metal enolate

研究代表者

どど 孝介 (DODO, Kosuke)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・研究員

研究者番号：20415243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生物活性化合物の結合蛋白質・結合部位同定を目指して、カルボニル化合物と金属錯体より生成する「金属エノラート」を利用した新規アフィニティー精製法の開発を目指した。その結果、固相に担持したパラジウム錯体を用いることで、カルボニル化合物をタグ分子として持つアミノ酸誘導体を水系溶媒中でも捕捉・精製することに成功した。さらにこれに蛍光団を持つ求電子剤を反応させることで、固相担体からの溶出と蛍光標識化を同時に行うことにも成功した。

研究成果の概要(英文)：To identify the binding proteins and binding sites of bioactive compounds, we planned to develop novel affinity purification method using "metal enolate", which is derived from carbonyl compound and metal complex. As a result, by using solid-supported palladium complex, we successfully captured amino acid derivatives having carbonyl group as a palladium enolate in aqueous media. Moreover, we also succeeded in the reaction between electrophile having a fluorescent group and palladium enolate leading to fluorescent labeling.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：有機化学 有機金属化学 金属エノラート 固相反応 タンパク質 アフィニティー精製

### 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、低分子化合物の結合タンパク質・結合部位の同定は非常に重要な命題の一つである。

その一般的な方法としては、低分子化合物に特定の分子に親和性を持つ官能基「アフィニティータグ」を導入し、このタグを用いて精製を行うというものである。しかしながら、アフィニティータグにはその結合親和性が不十分であったり、精製後に溶出させることが困難であったり、タグそのものが大きく元の化合物の活性を損なってしまったりすることなど、様々な問題点があった。

そのため、よりコンパクトで活性に影響を及ぼさないアフィニティータグとその効率的な精製方法が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、金属エノラートを基盤とした新規アフィニティー精製法の開発を目指す。具体的には、アフィニティータグ分子としてはエノール化可能なカルボニル化合物を選び、これに対して金属エノラートを発生させる金属錯体を固相担体上に固定化し、タグを金属エノラートとして捕捉・精製する。さらに金属エノラートの持つ反応性を利用することで、精製した後に特定の検出官能基を持つ分子と反応させた上で、固相担体から溶出させる手法へと展開することも目指す。

これにより、比較的小さなタグ分子を利用してアフィニティー精製を行いつつ、その溶出過程に結合生成反応を用いることで、不可逆的な溶出を行えると考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、研究を次の3段階に分けて進めることにした。

#### 水中でも安定な金属エノラートの探索

本研究の基盤となるものとして、低分子化合物に導入可能なカルボニル化合物と金属エノラートを形成できる金属錯体の組み合わせを探索する。この際、対象となる分子が生体成分であることを考え、水中でも安定にエノラートを形成する金属錯体とカルボニル化合物の探索を行った。

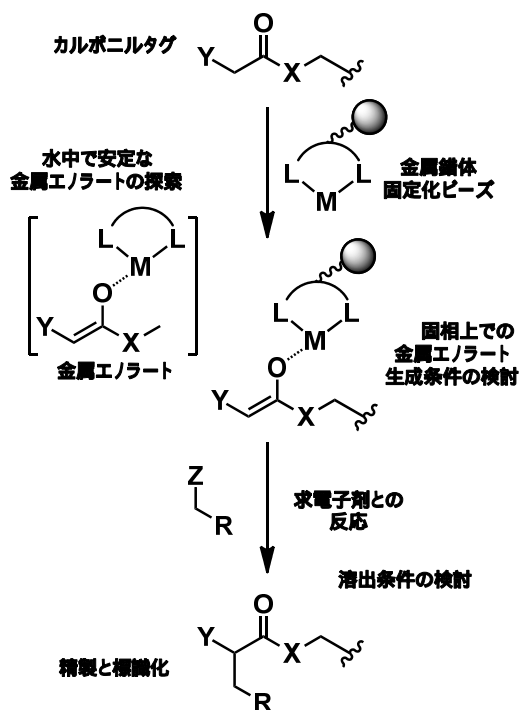
#### 金属錯体の固相担体への固定化とそのエノラート形成能の検討

で見出された金属錯体-カルボニル化合物の組み合わせに対して、金属錯体の固相への固定化を行う。この際、固相担体には水系溶媒でも使用可能なものを選び、水中でのエノラート形成ができるかどうかを検討する。固相上で形成された金属エノラートに関しては、NMR や IR など構造解析を行い、その

生成を確認する。

#### 固相担持金属エノラートの溶出条件検討

で固相上での金属エノラート生成が確認できたら、次に固相から金属エノラートを反応させて溶出させる条件を検討する。得られる金属エノラートに特有の反応を利用することで、カルボニル化合物への官能基(蛍光団など)導入と固相担体からの溶出を行う。

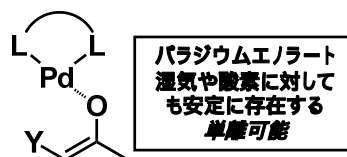


また、最終的な対象がペプチドとなることから、これに組み込むことのできるアミノ酸誘導体をモデル化合物として、これらの検討を行うことにした。

### 4. 研究成果

研究の方法で示した3つのステップ各段階において以下のような成果を得た。

#### 水中でも安定な金属エノラートの探索



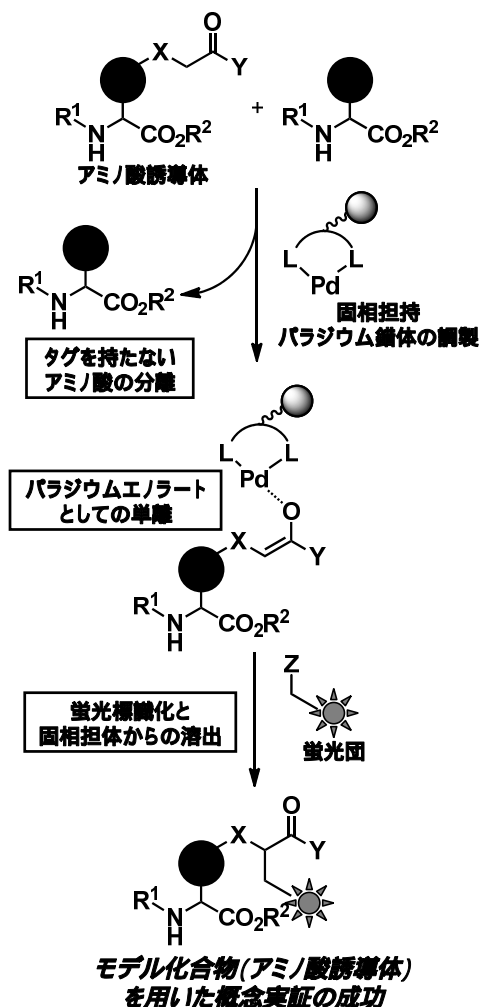
種々検討の結果、特定のパラジウム錯体がある種のカルボニル化合物と水中でも安定に存在できる金属エノラートを生成することがわかった。この金属エノラートは単離可能であり、空気中(酸素存在下)でも安定に存在することがわかった。

金属錯体の固相担体への固定化とそのエノラート形成能の検討

の結果を受け、パラジウム錯体を固定化した担体の調製を検討した。固相担体として、水系溶媒でも使用可能な担体を選び、これに錯体の配位子をアミド結合を介して固定化した。配位子が固定化された担体に対してパラジウムを作用させ、パラジウム錯体が固定化された担体を調製することに成功した。なお、錯体形成はNMRで確認した。

得られた固相担持パラジウム錯体に対して、カルボニル化合物を処理し、そのエノラート形成を検討した。その結果、水系溶媒中でも金属エノラートが生成することをNMRにより確認することができた。

以上の結果を受け、アミノ酸にカルボニル化合物をタグとして導入した誘導体をモデル化合物として設計・合成した。その上で、モデル化合物とタグを持たないアミノ酸混合物からモデル化合物だけを捕捉することに成功した。



固相担持金属エノラートの溶出条件検討で固相上に捕捉することに成功したアミノ酸誘導体に対して各種求電子剤を反応

させて、固相担体からの溶出条件を検討した。その結果、求電子剤との反応の進行と共にモデル化合物を溶出させることに成功した。

また、求電子剤に対して検出官能基を導入したのも設計・合成し、固相担体からの溶出と同時に標識化も可能な系への展開を検討した。その結果、蛍光団を導入しながら溶出可能な反応系を開発することに成功した。

以上、アミノ酸誘導体をモデル化合物としてアフィニティー精製および標識化まで本研究の概念実証に成功したところで、アミノ酸誘導体を組み入れたペプチドをモデルペプチドとして調製した。その上でこれを用いて、最終目標であるペプチド混合物からタグを有するペプチドを精製・標識化する実験系を検討した。その結果、ペプチド混合物から金属エノラートを用いてモデルペプチドを捕捉することには成功したが、その後の溶出過程においては標識化効率が低く、更なる検討が必要であることが明らかとなった。

## 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)

[学会発表](計 4 件)

1. 早水健二、園園孝介、江上寛通、袖岡幹子 Pd エノラートを用いたアフィニティー精製・標識法の開発 日本薬学会第134年会(熊本 2014年3月28日)
2. 早水健二、園園孝介、江上寛通、袖岡幹子 固相担持Pd錯体を用いた新規アフィニティー精製法の開発 天然物ケミカルバイオロジー 第4回若手研究者ワークショップ(横浜 2013年10月29日)
3. 早水健二、園園孝介、江上寛通、袖岡幹子 固相担持Pd錯体を用いた新規アフィニティー精製法の開発 第3回CSJ化学フェスタ2013(船堀 2013年10月21日)
4. 早水健二、園園孝介、江上寛通、袖岡幹子 固相担持Pd錯体を用いた新規アフィニティー精製法の開発 日本薬学会第133年会(横浜 2013年3月28日)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

どど 孝介 (DODO Kosuke)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成  
化学研究室・研究員  
研究者番号：20415243

(2)研究分担者

江上 寛通 (EGAMI Hiromichi)  
独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成  
化学研究室・客員研究員  
研究者番号：50553848