

学位論文題名

ビオチン化フェニルジアジリンを利用する
光アフィニティーラベリング

ーラベル生成物の選択的な検出、精製への応用ー

学位論文内容の要旨

光アフィニティーラベル法は蛋白質の機能構造解析に有用な化学的手段であり、この手法を用いることで基質結合部位の一次構造解析が可能となる。この結果を部位指定突然変異導入法と組み合わせることは、蛋白質の機能構造解析に対する最も有望なアプローチの一つとして期待される。この目的を達成するには光アフィニティーラベルによるラベル領域の決定が不可欠となる。しかし、光照射により起こる特異的なラベルの収率は一般に低いため、ラベル蛋白質の選択的な分離は難しい。またラベル部位解析のための断片化を行うと、さらに複雑な混合系となり、ラベルペプチドの単離精製が困難なのが実状である。

この問題は、混合系からラベル生成物を選択的に単離する手法により解決できると考え、アビジン-ビオチンの特異的相互作用を利用する光アフィニティーラベル法の確立のため、以下の点について検討した。

1) 光反応性基アリールジアジリン合成の改良

光アフィニティーラベル試薬に必要な光反応性基部分の合成について検討した。光アフィニティーラベルに利用される反応活性種として、ニトレンとカルベンが利用されている。カルベンはその反応性およびラベル結合の安定性ともにニトレンに比べ優れている。カルベン前駆体の中でも3-フェニル-3-トリフルオロメチルジアジリンは、光アフィニティーラベルに最も適した光反応性基の一つとして利用されている。しかしジアジリン骨格の合成はアジドに比べて行程数が格段に長く、ラベル目的に応じた誘導体を合成するには、その誘導体ごとにジアジリン骨格を合成する必要であった。申請者は、この問題に対し、まず容易に大量合成できるジアジリン誘導体を構築後、種々の置換基を導入する合成法を検討した。基本となるジアジリンには、3-メトキシフェニル-3-トリフルオロメチルジアジリンを選択した。この化合物は、芳香環上への求電子反応を活性化するメトキシ基をもち、さらにこのメトキシ基の脱メチル化後、再アルキル化が可能である。修飾反応として、リガンド骨格と光反応性基をつなぐための置換基導入反応を

検討した。その結果ジアジリン部が安定な求電子反応としてタリウム化が利用できることを見いだした。このタリウム化後、メタノール中パラジウム触媒による一酸化炭素の挿入反応によりカルボン酸メチルエステルを導入した。これを加水分解でカルボン酸とし、活性エステルへと容易に誘導できた。再アルキル化反応は、 BBr_3 により脱メチル化し、得られたフェノールをプロモ酢酸メチルと反応させて対応するアルキル体を収率良く合成できた。さらに、この一連の反応を利用し、放射性標識ジアジリン合成についても検討し、ヨウ化メチルによる再アルキル化で ^{14}C 標識体を合成した。また、ヨード標識体を得るために一般的なクロラミンT法も利用できることを示した。これらのことから、3-メトキシフェニル-3-トリフルオロメチルジアジリンを利用することで、行程数の長いジアジリン部分合成を省略し、目的の光ラベルに必要な置換基導入が可能となり、光反応性基部分の合成を簡略化することができた。

2) ビオチン一体型ジアジリンの合成

光ラベルと同時にビオチンを導入し、アビジンとの相互作用を利用するには、リガンド骨格内に光反応性基とビオチンを導入しなくてはならない。しかし現在まで報告されたビオチン化光アフィニティーラベル試薬は、合成するうえでビオチンと光反応性基を別々に導入しており合成上の手間がかかっていた。

申請者は、一段階の反応でビオチン化光アフィニティーラベルリガンドを合成するために、ビオチン一体型ジアジリンを合成を行った。1項で確立した合成法を利用し、ビオチン化ジアジリンを合成した。この際、ジアジリンとビオチン間にポリエーテルのスペーサーを入れることで試薬の水溶性を増し、カルボン酸誘導体の溶解度をビオチンと同程度にすることができた。活性エステル体も合成し、リガンドアミノ基との一段階の反応でビオチン化光アフィニティーラベル試薬を調製できるようにした。また、2価性架橋試薬として活性エステルと光反応性基を利用できる構造とした。

3) ビオチン一体型ジアジリンを用いた光クロスリンクとアビジン-ビオチン系を利用した検出

光ラベル生成物に導入されるビオチンを利用した検出を確立するために、ビオチン化ジアジリンの活性エステルを2価性架橋試薬として利用し、アビジンサブユニット間クロスリンクを検討した。ビオチン化ジアジリン活性エステルにより蛋白質アミノ基の化学修飾をした後、光照射することで、サブユニット間にクロスリンクを起こした。クロスリンクの検出には、ビオチンを利用した化学発光法を用いた。その結果、光クロスリンクによりサブユニットのダイマーに相当する分子量に化学発光が感度良く検出され、光ラベル生成物の高感度検出に化学発光法が利用できることを初めて示した。

4) 光アフィニティーラベルへのアビジン-ビオチン系の利用 (ラベル蛋白質、ラベルペプチドの検出および単離精製)

つぎに、近年機能構造解析が急がれている糖転移酵素の一つである β -1, 4-ガラクトース転移酵素 (β -1, 4-GalT) を対象蛋白質として選択し、アビジン-ビオチン系の利用した光アフィニティーラベルを検討した。合成した光ラベル試薬は、 β -1, 4-GalTの2つの基質である糖受容体 (N-アセチルグルコサミン、GlcNAc) と糖供与体 (UDP-Gal) のうち、GlcNAcをリガンド骨格に選択し、2項で合成した、ビオチン化ジアジリンを利用することで、容易にビオチン化光ラベル試薬を調製できた。光ラベル試薬は、 β -1, 4-GalTの良好な基質となることおよび、光照射によりジアジリン部の光分解が速やかに起こることを確認した。

この光ラベル試薬を用い、ウシ β -1, 4-GalTの光アフィニティーラベルを行い、 β -1, 4-GalTの分子量 (42 KDa) に化学発光が認められ、その発光強度は、競合阻害剤の共存により減少したことから特異的ラベルの進行を確認した。この際、ビオチン化BSAを標準物質に用い、デンストメーター解析することにより、 $10^{-12} \sim 10^{-14}$ molの間でラベル定量化の手法を確立した。更に、リコンビナントヒト β -1, 4-GalTに対しても光アフィニティーラベルが可能であった。ラベル蛋白質の混合系からの選択的な単離についても検討し、ラベル蛋白質のみを固定化ストレプトアビジンに吸着させ、2% SDS処理することでラベル蛋白質を回収することができた。(回収率約60%)。

また、酵素消化で生じるペプチド混合系についてもアビジン-ビオチン系を利用した検出単離を検討した。ラベルペプチドの化学発光検出では感度の低下に対し、PVDF膜を修飾しペプチドを膜上に固定化する新しい手法を開発することで問題を解決した。ラベルペプチドの単離では、蛋白質の場合と同様、固定化ストレプトアビジンへの特異的吸着2% SDS処理による回収が利用できることを確認した。

簡便なラベルリガンド合成からその応用まで、アビジン-ビオチン相互作用の利用を検討した今回の研究成果により光アフィニティーラベルがさらに行いやすくなったと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	上 野 直 人
副 査	教 授	大 塚 栄 子
副 査	助教授	井 上 英 夫
副 査	助教授	澁 谷 浩 司

学 位 論 文 題 名

ビオチン化フェニルジアジリンを利用する 光アフィニティーラベリング

ーラベル生成物の選択的な検出、精製への応用ー

申請者はビオチン化フェニルジアジリンを利用した光アフィニティーラベルに関する研究を行ってきたが、今回以下のような結果を得た。

光アフィニティーラベル法は蛋白質の機能構造解析に有用な化学的手段であり、この手法を用いることで基質結合部位の一次構造解析が可能となる。この結果を部位指定突然変異導入法と組み合わせることは、蛋白質の機能構造解析に対する最も有望なアプローチの一つとして期待される。この目的を達成するには光アフィニティーラベルによるラベル領域の決定が不可欠となる。しかし、光照射により起こる特異的なラベルの収率は一般に低いため、ラベル蛋白質の選択的な分離は難しい。またラベル部位解析のための断片化を行うと、さらに複雑な混合系となり、ラベルペプチドの単離精製が困難なのが実状である。申請者は、混合系からラベル生成物を選択的に単離する手法によりこの問題を解決できると考え、アビジン-ビオチンの特異的相互作用を利用する光アフィニティーラベル法の確立のため、以下のような検討を行った。

申請者はまず光アフィニティーラベル試薬に必要な光反応性基部分の合成について検討した。光アフィニティーラベルに利用される反応活性種として、ニトレンとカルベンが利用されている。カルベンはその反応性およびラベル結合の安定性ともにニトレンに比べ優れている。カルベン前駆体の中でも3-フェニル-3-トリフルオロメチルジアジリンは、光アフィニティーラベルに最も適した光反応性基の一つとして利用されている。しかしジアジリン骨格の合成はアジドに比べて行程数が格段に長く、ラベル

目的に応じた誘導体を合成するには、その誘導体ごとにジアジリン骨格を合成する必要であった。申請者は、この問題に対し、まず容易に大量合成できるジアジリン誘導体を構築後、種々の置換基を導入する合成法を検討した。基本となるジアジリンには、3-メトキシフェニル-3-トリフルオロメチルジアジリンを選択した。この化合物は、芳香環上への求電子反応を活性化するメトキシ基をもち、さらにこのメトキシ基の脱メチル化後、再アルキル化が可能である。修飾反応として、リガンド骨格と光反応性基をつなぐための置換基導入反応を検討した。その結果ジアジリン部が安定な求電子反応としてタリウム化が利用できることを見いだした。このタリウム化後、メタノール中パラジウム触媒による一酸化炭素の挿入反応によりカルボン酸メチルエステルを導入した。これを加水分解でカルボン酸とし、活性エステルへと容易に誘導できた。再アルキル化反応は、 BBr_3 により脱メチル化し、得られたフェノールをプロモ酢酸メチルと反応させて対応するアルキル体を収率良く合成できた。さらに、この一連の反応を利用し、放射性標識ジアジリン合成についても検討し、ヨウ化メチルによる再アルキル化で ^{14}C 標識体を合成した。また、ヨード標識体を得るために一般的なクロラミンT法も利用できることを示した。これらのことから、3-メトキシフェニル-3-トリフルオロメチルジアジリンを利用することで、行程数の長いジアジリン部分合成を省略し、目的の光ラベルに必要な置換基導入が可能となり、光反応性基部分の合成を簡略化することができた。

次に申請者は、一段階の反応でビオチン化光アフィニティーラベルリガンドを合成するために、ビオチン一体型ジアジリンを合成を行った。1項で確立した合成法を利用し、ビオチン化ジアジリンを合成した。この際、ジアジリンとビオチン間にポリエーテルのスペーサーを入れることで試薬の水溶性を増し、カルボン酸誘導体の溶解度をビオチンと同程度にすることができた。活性エステル体も合成し、リガンドアミノ基との一段階の反応でビオチン化光アフィニティーラベル試薬を調製できるようにした。また、2価性架橋試薬として活性エステルと光反応性基を利用できる構造とした。さらに、ビオチン一体型ジアジリンを用いた光クロスリンクとアビジン-ビオチン系を利用し、光ラベル生成物に導入されるビオチンを利用した検出を確立するために、ビオチン化ジアジリンの活性エステルを2価性架橋試薬として利用した。その結果、光クロスリンクにより標的蛋白質サブユニットのダイマーに相当する分子量に化学発光が感度良く検出され、光ラベル生成物の高感度検出に化学発光法が利用できることを初めて示した。最後に申請者は実際に光アフィニティーラベルへのアビジン-ビオチン系を利用したアフィニティーラベルによって、近年機能構造解析が急がれている糖転移酵素の一つである β -1, 4-ガラクトース転移酵素(β -1, 4-GalT)の検出を試みた。合成した光ラベル試薬は、 β -1, 4-GalTの2つの基質である糖受容体(N-アセチルグルコサミン、GlcN

Ac) と糖供与体 (UDP-Gal) のうち、GlcNAc をリガンド骨格に選択し、2 項で合成した、ビオチン化ジアジリンを利用することで、容易にビオチン化光ラベル試薬を調製できた。光ラベル試薬は、 β -1, 4-GalT の良好な基質となることおよび、光照射によりジアジリン部の光分解が速やかに起こることを確認した。

この光ラベル試薬を用い、ウシ β -1, 4-GalT の光アフィニティーラベルを行い、 β -1, 4-GalT の分子量 (42 KDa) に化学発光が認められ、その発光強度は、競合阻害剤の共存により減少したことから特異的ラベルの進行を確認した。さらに、ラベル蛋白質の混合系からの選択的な単離についても検討し、ラベル蛋白質のみを固定化ストレプトアビジンに吸着させ、2 % SDS 処理することでラベル蛋白質を回収することができた。(回収率約 60 %)。また、酵素消化で生じるペプチド混合系についてもアビジン-ビオチン系を利用した検出単離を検討し、ラベルペプチドの化学発光検出では感度の低下に対し PVDF 膜を修飾し、ペプチドを膜上に固定化する新しい手法を開発することで問題を解決した。またラベルペプチドの単離では、蛋白質の場合と同様、固定化ストレプトアビジンへの特異的吸着 2 % SDS 処理による回収が利用できることを確認した。本研究におけるアビジン-ビオチン相互作用を利用した光アフィニティーラベル法の確立は光アフィニティーラベル法の簡便化に大きく寄与した。

よって以上の研究は博士 (薬学) の学位を受けるに充分値するものと認めた。