

トリフルオロメチルフェニルジアジリンを用いた 光アフィニティーラベル法の進歩

光アフィニティーラベル法は、生体混合系中においても生理活性物質の作用機序解析が可能であることから、ポストゲノム手法の一つとして注目されています。この手法は、光反応性基の合成やリガンド骨格の修飾といった有機化学的手法から、その合成試薬によりラベルされた生体高分子の解析までが必要です。現在、光アフィニティーラベルに利用される光反応性基としては、ニトレンを発生するアリルアジド、カルベンを発生するトリフルオロメチルフェニルジアジリン、励起カルボニルを利用するベンゾフェノンなどが主に利用されています。これらの特徴、比較は成書^(1,2)を参照していただくこととして、ここではトリフルオロメチルフェニルジアジリン (TPD) を用いた光アフィニティーラベルについて、合成、その応用の2つの観点から最近の進歩を紹介します。

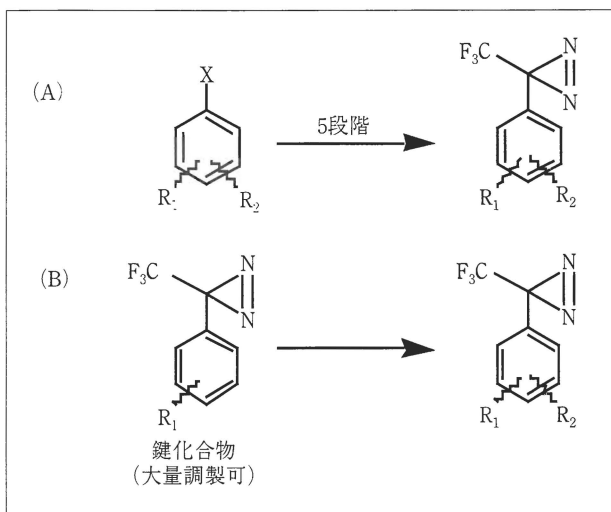


図1 ■ トリフルオロメチルフェニルジアジリンの調製法
(A) 必要な官能基ごとにトリフルオロメチルジアジリン合成。
(B) 大量調製可能な鍵トリフルオロメチルフェニルジアジリンに必要官能基を導入。

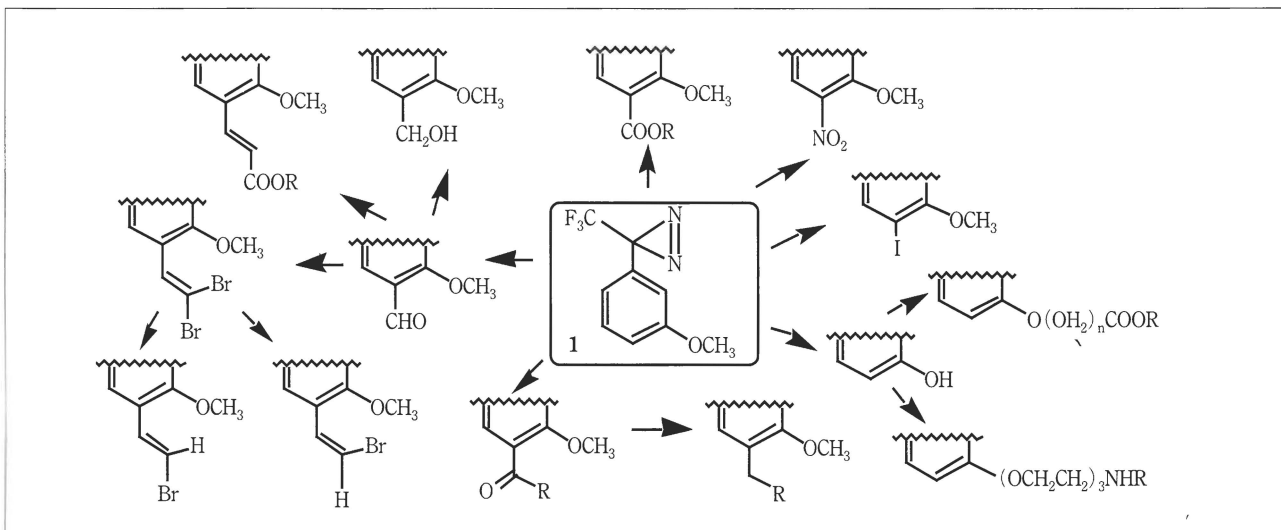


図2 ■ *m*-methoxyTPD (1) を鍵化合物とした TPD 誘導体の合成



光反応性基 TPD 誘導体合成法の進歩

1980年に Brunner らによって TPD が報告⁽³⁾されて以来、リガンド骨格への導入のためなどに必要な置換基をもつ TPD 誘導体の調製には、それぞれの置換基ごとにジアジリン骨格構築の多段階反応を繰り返さなければなりません(図 1-A)。このことは TPD を用いた光アフィニティーラベルが他のアジド、ベンゾフェノンを用いた場合よりも、生体高分子への利用数が少ない状態の一因となっていました。この問題を解消するため、大量調製可能な親ジアジリン化合物を利用し、必要な官能基を導入する手法が検討されてきています(図 1-B)。その結果、*m*-位をメトキシ置換した TPD (1) は、比較的多くの一般的な有機反応条件に安定であることがわかり、ジアジリン骨格形成後、種々の置換基導入反応が適用可能となり、TPD を利用した光アフィニティーラベルのリガンド合成にかかる手間を大幅に短縮することが可能になっています(図 2)^(2,4)。

また最近、管、福山らにより固相合成による光反応性リガンド合成法も報告され⁽⁵⁾、簡便な光反応性リガンド合成への道が着実に開かれつつあります。



光ラベルした生体高分子解析法の進歩

従来、光アフィニティーラベルされた生体高分子の解析には放射性同位元素を用いた検出法が使われてきまし

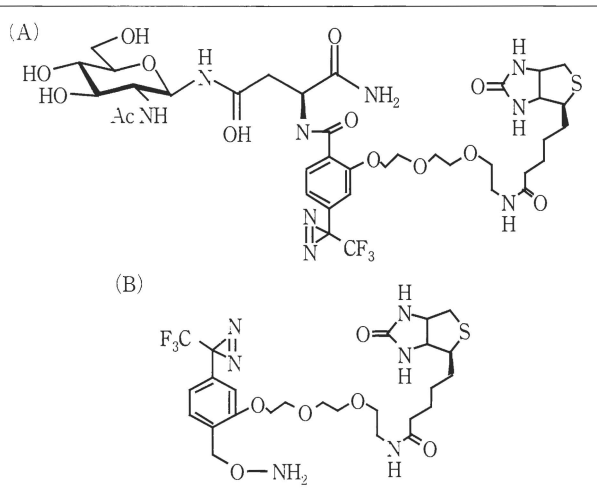


図 3 ■ ビオチン一体型 TPD

(A) β -1,4-ガラクトース転移酵素用 TPD. (B) 1 段階カルボニル(糖鎖)修飾用 TPD.

た。しかし、放射性同位元素化合物は、その合成や取り扱いの点で決して容易ではなく、それに代わる高感度検出法が求められていました。その中で、合成の項での反応を利用してビオチン一体型 TPD を合成し、アビジンとの特異的相互作用を利用することで化学発光による高感度な検出 (10^{-13} mol 以下) が可能であることが明らかとなりました^(6,7)。またビオチンを導入することにより、放射性同位元素ではできなかったラベルされた生体高分子の単離の過程の簡便化に成功し、遺伝子相同性による類推や、従来の放射性標識光アフィニティーラベル試薬では機能解明が難しかった、 β -1,4-ガラクトース転

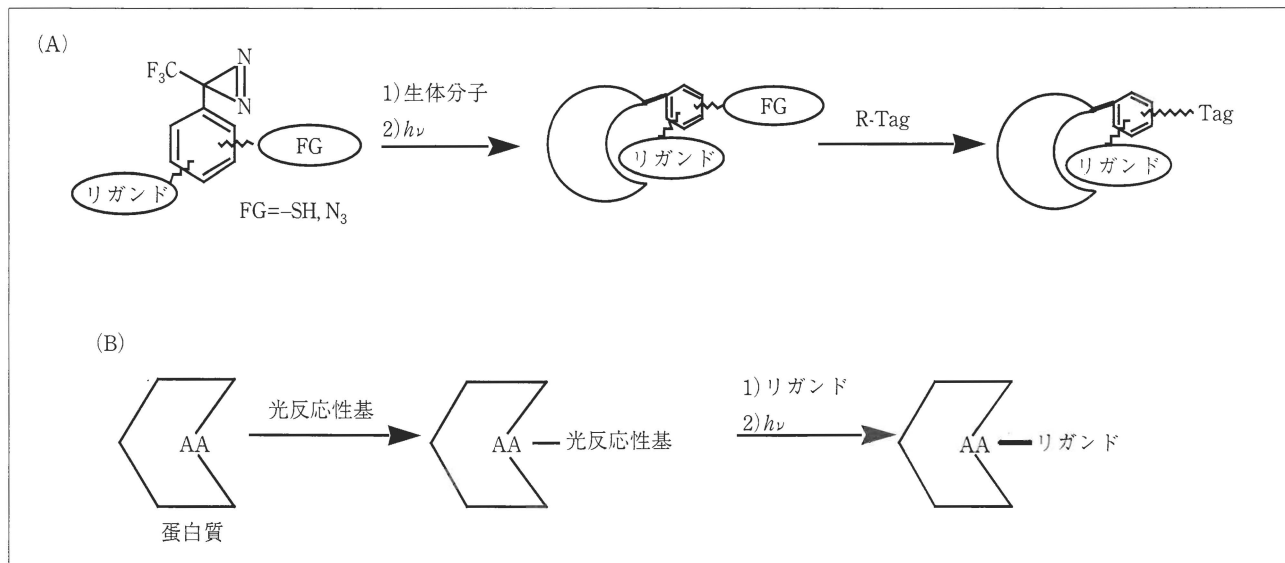


図 4 ■ 効率的な TPD 誘導体を用いた光アフィニティーラベル法

(A) 官能基 (FG) 特異的な反応を利用した照射後の有用 Tag 導入. (B) 蛋白質特定部位 (AA) の TPD 誘導体修飾による光反応性蛋白質の調製.

移酵素の基質結合部位が明らかにされました (図 3-A)。また、糖鎖群の簡便光反応性ビオチン化誘導体化反応も開発され、糖鎖関連生体分子の機能解析の効率化がはかられています (図 3-B)^(6, 8)。

光アフィニティーラベルには、天然リガンド骨格の修飾が必須であることから、その修飾を最小限にすることも試みられています。光ラベル試薬中に、後で修飾可能な最小限の官能基を入れることで、光照射後、ラベルされた分子上にある官能基を利用した反応により、検出に必要なタグを導入するものです (図 4-A)。この手法に求められるのは、水溶液中で効率良く進行する反応を選択することであり、現在までに、チオールへのヨードアセトアミド誘導体反応⁽⁹⁾やアルキルアジドを利用した、Staudinger-Bertozzi 反応⁽¹⁰⁾などによる有用検出タグ導入法が報告されています。

また、新たな試みとして、蛋白質中の特定残基修飾反応を利用して光反応性基を導入することで蛋白質側を光反応性とし、リガンド骨格側のどの部分が重要な役割を果たしているかを探索する手法も報告されています。(図 4-B)⁽¹¹⁾。

以上、光アフィニティーラベル法の改良状況をまとめましたが、これにとどまらず、改良の余地はまだ数多くあり、(有機)化学に立脚した手法の精査が、今後の生命

科学研究に求められる生体内 (混合系) における生理機能解明の一翼を担うことが期待されます。

- 1) H. Bayley : in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology : Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology", ed. by T. S. Work and R. H. Burdon, Elsevier, Amsterdam, 1983.
- 2) Y. Hatanaka, H. Nakayama & Y. Kanaoka : *Rev. Heteroatom. Chem.*, **14**, 213 (1996).
- 3) J. Brunner, H. Senn & F. M. Richards : *J. Biol. Chem.*, **255**, 3313 (1980).
- 4) M. Hashimoto, T. Komano, K. Nabeta & Y. Hatanaka : *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 140 (2005).
- 5) T. Kan, Y. Tominari, Y. Morohashi, H. Natsugari, T. Tomita, T. Iwatsubo & T. Fukuyama : *Chem. Commun.*, 2244 (2003).
- 6) Y. Hatanaka & Y. Sadakane : *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 271 (2002).
- 7) Y. Hatanaka, M. Hashimoto & Y. Kanaoka : *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 453 (1998).
- 8) Y. Hatanaka, U. Kempin & P. Jong-Jip : *J. Org. Chem.*, **65**, 5639 (2000).
- 9) T. Nagase, E. Nakata, S. Shinkai & I. Hamachi : *CHEM-EUR J.*, **9**, 3660 (2003).
- 10) T. Hosoya, T. Hiramatsu, T. Ikemoto, M. Nakanishi, H. Aoyama, A. Hosoya, T. Iwata, K. Maruyama, M. Endo & M. Suzuki : *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 637 (2004).
- 11) M. Kaneda, Y. Sadakane & Y. Hatanaka : *Bioconjug. Chem.*, **14**, 849 (2003).