

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6145742号
(P6145742)

(45) 発行日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(24) 登録日 平成29年5月26日(2017.5.26)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N 27/62		V
CO 7 D 229/02	(2006.01)	CO 7 D 229/02		

請求項の数 1 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2013-6647 (P2013-6647)
 (22) 出願日 平成25年1月17日(2013.1.17)
 (65) 公開番号 特開2014-137307 (P2014-137307A)
 (43) 公開日 平成26年7月28日(2014.7.28)
 審査請求日 平成27年12月25日(2015.12.25)

特許法第30条第2項適用 日本薬学会北鹿支部平成24年度第1回総会及び第124回例会(平成24年11月18日)で発表

(73) 特許権者 305060567
 国立大学法人富山大学
 富山県富山市五福3190
 (74) 代理人 100114074
 弁理士 大谷 嘉一
 (72) 発明者 友廣 岳則
 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷
 キャンパス内
 (72) 発明者 畑中 保丸
 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷
 キャンパス内
 審査官 伊藤 裕美

最終頁に続く

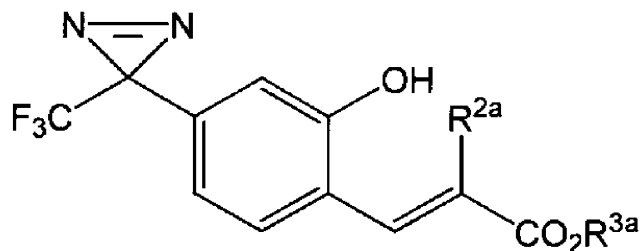
(54) 【発明の名称】 蛍光性質量標識プローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光性質量標識プローブ作成の中間体として用いられる下記一般式で表された桂皮酸型ジアジリン化合物。

【化1】



「式中、 R^{2a} は、臭素原子、エチル基、構成元素の一部が同位体標識されたエチル基のいずれかであり、 R^{3a} は、スクシンイミド基である。」

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質構造解析のための蛍光性質量標識プローブおよびその使用に関する

【背景技術】

【0002】

タンパク質への化学的、遺伝子工学的蛍光基導入法の著しい進展により、細胞機能の時空間的イメージングの新分野が築かれた。現在、このラベル化技術は癌治療を含め医療分野のみならず材料分野にも応用されつつある。汎用の蛍光化技術のほとんどは、標的タンパク質の末端や表面官能基に蛍光化合物を修飾する技術であり、主に細胞・組織内分布や生体分子複合体検出を対象としている。酵素や受容体など生理機能の可視化や、その制御を可能とする阻害剤開発には、結合ドメインへの蛍光ラベル化が極めて有効である。光アフィニティラベル法は、標的タンパク質機能部位への選択的蛍光ラベル化に適した技術である。この技術は、光を照射するだけでタンパク質機能部位に特殊ラベルを導入できる上に、現在解析が遅れている難結晶性膜タンパク質、弱相互作用系にも対応できる数少ない機能/構造解析ツールであり、新標的受容体探索ツールとしても重要視されている。

10

【0003】

光アフィニティラベル法を応用した技術として、クマリン形成型光クロスリンカーを用いる蛍光ラベル化法が開発されている（非特許文献1）

この技術は、分子間相互作用を利用し、基質（薬物）プローブ自体は無蛍光性であり、光反応で基質は切除され小さなクマリン誘導体のみ結合ドメインに標識される。この技術は、標的タンパク質の探索・同定、阻害剤スクリーニングや基質センサー、機能部位解析、細胞内物質の可視化などに応用が可能である。

20

【0004】

一方、創薬において、薬物受容体の特定は、リード化合物開発や薬理機序解明を含む第1ステージ開発研究の極めて重要なステップであり、さらに受容体における薬物結合部位の構造解析は、リード化合物の最適化に重要な指針を与える。結晶構造解析された受容体にはコンピュータを使った化合物スクリーニングが適応でき、効率の良い分子標的薬開発が可能となる。しかしながら、標的薬物受容体の多くは膜タンパク質であり、それらの単離や結晶化は極めて困難である。また、膜タンパク質に限らず、発現が終了した全タンパク質数に対し結晶構造解析やNMR解析の成功例は限られる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0005】

【非特許文献1】Bioconjugate Chem., 2011,22, 315-318.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

膜受容体やタンパク質複合体には質量分析によるプロテオミクス解析が進められているが、既存の化学プローブによる解析効率ではこれをカバーしきれない状況にある。既存の化学的解析法の最大のボトルネックは、ピコモルレベルのラベルペプチド精製・単離操作およびラベル部位の同定操作の煩雑化にある。

【0007】

40

化学ラベル法によるタンパク質同定・構造解析は順に、(1)基質(薬物)のプローブ化、(2)プローブ評価、(3)受容体タンパク質のラベル化とその評価、(4)ラベルタンパク質の精製・濃縮、(5)消化によるフラグメント化、(6)消化ペプチドの分離、(7)ラベルペプチドの特定、(8)ラベルペプチドの質量解析による同定、(9)必要に応じて、異なるプローブによる解析を行い機能部位を特定する。なお、消化フラグメント質量パターン(PMF: peptide mass fingerprinting)により、ラベルタンパク質の同定が可能である。従来法でも特に切断性ピオチン基を導入したプローブ法では(1)~(5)までの操作を効率よく行うことができる。しかし、消化操作により対象がタンパク質からペプチドになると、その精製効率は各ペプチド物性に大きく左右されるため、極微量スケールでは吸着によるわずかな損失が致命的となる。そのため、最終的なHPLC精製ではラ

50

ペプチドの特定すら極めて困難になる。また、比較対照実験によりその特定ができて、続くタンデム質量解析では、バックグラウンドレベル量では対象ピークの特定が極めて煩雑である。

【0008】

最近では、質量分析における高感度化が達成され、高機能LC-MS/MS（液体クロマトグラフィー精製 - タンデム質量検出）機器開発により極微量サンプルの全ピーク解析が可能な状況にある。しかし、機器の進展にもかかわらず、絶えず質量ピークの判定基準が問題になり、信頼性の高いデータ取得には対象ペプチドの判別の容易さがブレークスルーポイントである。

【課題を解決するための手段】

10

【0009】

本発明は、高性能化学プローブを導入してその解析精度と効率を一気に高め、未解析対象をカバーする技術である。具体的には、光反応性・選択精製機能・蛍光性・質量分析タグを全て兼ね備えるコンパクトな蛍光性質質量標識プローブを使用することで、上記操作を特別な操作を加えることなく単純化し、格段の高速解析を実現した。

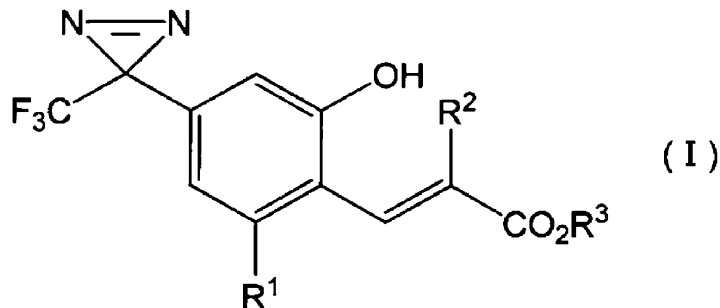
以下に本発明を詳細に説明する。

【0010】

蛍光性質質量標識プローブの作成には、以下の一般式（I）の桂皮酸型ジアジリン化合物を中間体として用いた。

【化1】

20



30

【0011】

「式中、 R^1 は、水素原子、ヒドロキシまたは低級アルコキシ基を、 R^2 は、水素原子、塩素原子、臭素原子または低級アルキル基もしくは構成元素の一部が同位体標識された低級アルキル基を； R^3 は、水素原子、低級アルキルまたはスクシンイミド基を、それぞれ、意味する。」

【0012】

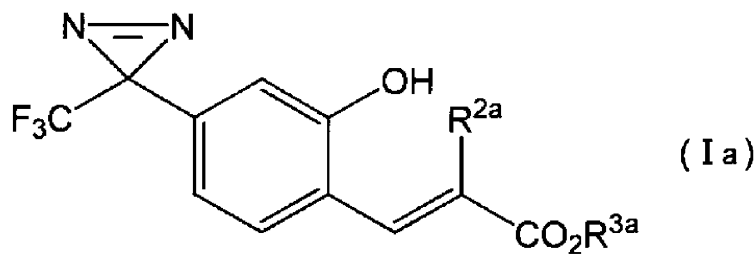
本発明において、低級アルキル基とは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチルおよびヘキシル基などの直鎖状または分岐鎖状の C_{1-6} アルキル基を意味する。

【0013】

40

一般式（I）の桂皮酸型ジアジリン化合物で、好ましいものは、下記の一般式（Ia）の桂皮酸型ジアジリン化合物が挙げられる。

【化2】



10

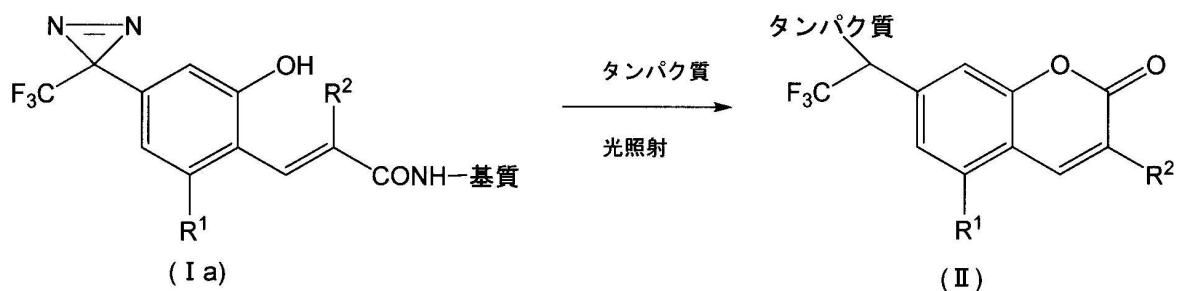
【0014】

「式中、 R^{2a} は、塩素原子、臭素原子または低級アルキル基もしくは構成元素の一部が同位体標識された低級アルキル基を； R^{3a} は、低級アルキルまたはスクシンイミド基を、それぞれ、意味する。」

【0015】

一般式(I)の桂皮酸型ジアジリン化合物は、光照射によりクマリン型化合物に変化することで、タンパク質が蛍光性化合物でラベルされる(以下、クマリンラベル化と称する)。

【化3】



20

【0016】

(a) 0 以下の低温下、ジアジリン基光反応により結合したタンパク質を共有結合により捕捉(クロスリンク)する。続いて、(b) 30 ~ 40 で光を再照射すると、桂皮酸骨格の光E-Z異性化と共に、オルト位ヒドロキシ基によって分子内環化が進行し、基質分子の脱離と共にクマリン環がクロスリンク部位に形成される。また、一般式(1)において R^3 がスクシンイミド基である桂皮酸型ジアジリン化合物を用いれば、エステル化により、容易に基質分子のアミノ基に反応基を導入できる。

30

ここで、光照射は、(a)ジアジリン基光反応において、0、350nm~360nmで、高圧水銀灯(250W)で10秒~5分、あるいはブラックライトランプ(60W)で2分~30分、(b)の環化反応において、室温から60、300nm~320nmで、高圧水銀灯(250W)で10秒~5分、あるいはブラックライトランプ(60W)では10分~60分である。

【0017】

クマリンラベル化されたペプチドは、通常のペプチドにはない波長の蛍光特性を持つため、その蛍光が検出されたピークは全て解析対象になる。また、 R^1 基にヒドロキシ基を有するクマリン型化合物は長波長化され、自家蛍光などのバックグラウンドが生じる場合に有効である。

40

【0018】

本発明の桂皮酸型ジアジリン化合物を使用する際は、 R^2 が同位体の置換基であることが好ましい。例えば、 R^2 が臭素原子である場合、その同位体比が1:1であるため、ラベル化されたペプチドを質量分析装置に供すれば、質量差(m/z)2u($z=1$)の二重線で現れる。

【0019】

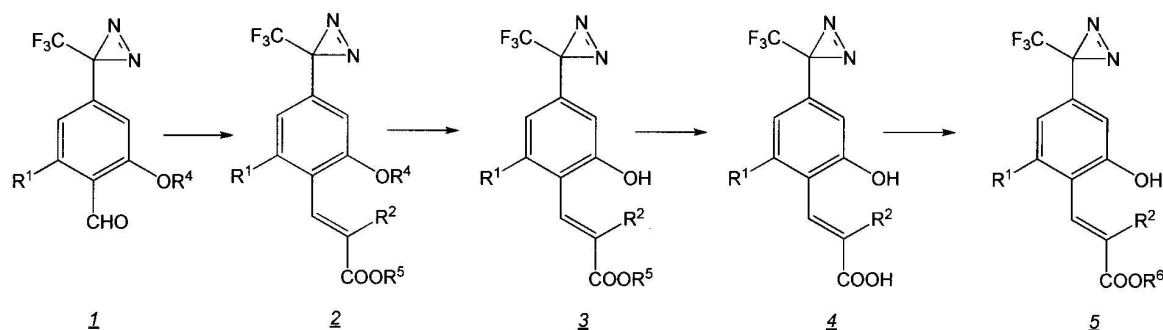
50

R^2 がエチル基を導入したプローブでは、 CH_2CH_3 と CD_2CD_3 の同量混合物を用いる。この置換基はジアジリン光反応性や環化反応には影響しない。これにより、ラベルされたペプチドは質量差 (m/z) $5u$ ($z=1$) の二重線で現れる。また、 R^2 にメチル基のものを併用すれば、エチル基と質量差 (m/z) $14u$ ($z=1$) が利用できる。特にペプチド解析では、臭素の2差に比べて後者の化合物は、ラベルピーク判定が明確になる。

【0020】

本発明の桂皮酸型ジアジリン化合物は、例えば、以下のような合成ルートで製造すればよい。

【化4】



【0021】

「式中、 R^4 および R^5 は、同一または異なって低級アルキル基を、 R^6 はスクシンイミド基などのアミンとの反応性基を、 R^1 および R^2 は上記したと同様の基を、それぞれ示す。」

【0022】

一般式2の化合物は、一般式1の化合物を、例えば、ホーナー・ワズワース・エモンズ反応(Homer-Wadsworth-Emmons reaction)に付すことにより製造することができる。

【0023】

一般式3の化合物は、一般式2の化合物を、例えば、三臭化ホウ素などのルイス酸で処理することにより製造することができる。

【0024】

一般式4の化合物は、一般式3の化合物を、例えば、アルカリを用いた加水分解反応に付すことにより製造することができる。

【0025】

一般式5の化合物は、一般式4の化合物に、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド等を水溶性カルボジイミドなど縮合剤の存在下に反応させることにより製造することができる。

【発明の効果】

【0026】

本発明の蛍光性質質量標識プローブの最大の特徴は、高感度の選択的精製に有利な蛍光基であることに加え、質量分析においても選択的検出が可能な質量差を有する標識であることである。これにより、従来法では極めて煩雑で困難だった操作過程、つまり極微量ラベルペプチドの精製や質量分析による配列解析において、操作を単純化することで損失を抑え、必ずしも高純度にしなくても極微量ラベルペプチドの高感度特定を可能にすることで大幅な時間短縮ができる。さらに、標的タンパク質ラベルまでの全ての操作は光照射のみで達成され、特別な濃縮操作を必要としないこと、特定のための対照実験を必要としないことなど、従来法に比べて著しい簡便化、単純化が達成できる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】本発明の概念図である。

【図2】従来法と本発明方法の比較を説明する図である。

【図3】消化フラグメントの HPLC 解析の図である。

【図4】質量差タグ化ペプチドのMS解析の図である。

【図5】質量差タグ化ペプチドのMS/MS配列解析の図である。

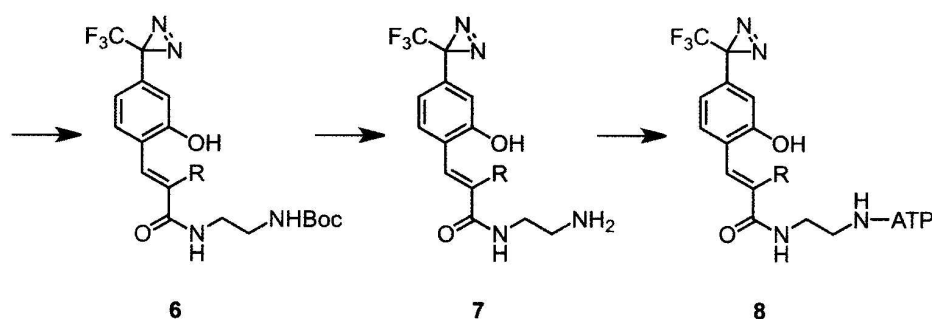
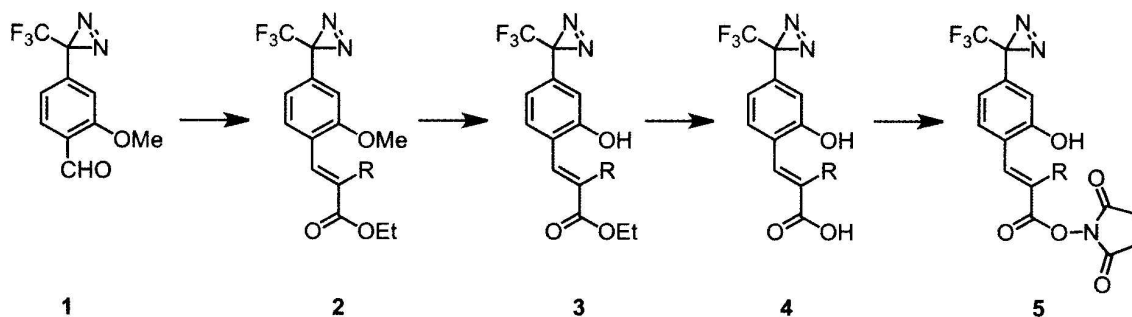
【発明を実施するための形態】

【0028】

以下、本発明を製造例・実施例等で説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

製造例 1

< 桂皮酸型ジアジリン活性エステルおよびアデノシン三リン酸(ATP)プローブの合成 > 10
【化5】



【0029】

(a) (E)-Ethyl

2-(2-methoxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene)butanoate (2a)

NaH (211mg, 6.15mmol)をジクロロメタン6

mLで懸濁したものにethyl

2-(diethoxyphosphoryl)butanoate (855 μ L)をジクロロメタン10 mLに溶かしたものを加

え、アルゴンガス雰囲気下、0 で攪拌した。その後、化合物1 [2-methoxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzaldehyde ; 740 mg]をジクロロメタン14mLで溶かし

たものを加え、1日攪拌した。酢酸エチルを加え、水で3回、飽和食塩水で1回洗浄後、無

水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧に溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム (酢酸エ

チル:ヘキサン=1:10)で精製し、黄色油状物質 (化合物2a ; 974mg,

94%, E/Z =5/1)を得た。

【0030】

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,

CDCl_3 , TMS) d 7.67 (s, 1H), 7.27 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.81

(d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.61 (s, 1H), 4.28 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.84

(s, 3H), 2.43 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.35 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 1.13

ppm (t, 3H, $J = 7.3$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,

20

30

40

50

CDCl₃, TMS) d 167.87, 157.57, 136.30, 132.91, 130.47, 129.91,
126.67, 122.04 (q, J = 275.15 Hz), 118.42, 108.21, 60.76, 55.58, 28.52
(q, J = 41.22 Hz), 21.11, 14.28, 13.93 ppm

¹⁹F-NMR (375 MHz,

CDCl₃, CFCI₃) d -65.46 ppm

ESI-MS (positive) [M + Na]⁺

= 365.1080 (理論値365.1084 C₁₆H₁₇F₃N₂NaO₃).

【 0 0 3 1 】

(b) (E)-Ethyl

2-(2-methoxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene) [3,3-²H₂,4,4,4-²H₃] 10

butanoate (2b)

上記 (a) のEthyl

2-(diethoxyphosphoryl)butanoateに代えて、 [²H₅]Ethyl

2-(diethoxyphosphoryl)butanoateを使用し、化合物2bを、収率
62% (E/Z = 5/1)で得た。

【 0 0 3 2 】

¹H-NMR (400 MHz,

CDCl₃, TMS) d 7.68 (s, 1H), 7.28 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.81

(d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.62 (s, 1H), 4.27 (q, 2H, J = 7.0 Hz), 3.84 20

(s, 3H), 1.35 ppm (t, 3H, J = 7.1 Hz)

ESI-MS (positive) [M + Na]⁺

= 370.1393 (理論値370.1397 C₁₆H₁₂²H₅F₃N₂NaO₃).

【 0 0 3 3 】

(c) (E)-Ethyl

2-(2-hydroxy-4-(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene)butanoate
(3a)

化合物2a (1.2g, 3.5mmol)をジクロロメタン20mLに溶かし、アルゴンガス雰囲気下、-40
で撹拌しながら、三臭化ホウ素 (1mL, 11mmol)をジクロロメタン15mLで希釈したものを
ゆっくりと加えた。室温で1日撹拌後、氷を加え反応を停止した。続いて、水で3回、飽
和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。残渣
をシリカゲルカラム (酢酸エチル:ヘキサン=1:5)で精製し、黄色固体(化合物3a ; 560mg,
49%)を得た。 30

【 0 0 3 4 】

¹H-NMR (400 MHz,

CDCl₃, TMS) d 7.59 (s, 1H), 7.20 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.72

(s, 1H), 6.72 (d, 1H, J = 4.6 Hz), 5.71 (s, 1H), 4.30 (q, 2H, J =

7.0 Hz), 2.40 (q, 2H, J = 7.3 Hz), 1.36 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 1.09

ppm (t, 3H, J = 7.6 Hz)

¹³C-NMR (100 MHz, 40

CDCl₃, TMS) d 168.43, 154.04, 137.87, 132.41, 130.81, 129.87,

124.28, 121.97 (q, J = 275.05 Hz), 118.14, 113.78, 61.32, 28.22 (q, J

= 41.22 Hz), 21.17, 14.16, 13.77 ppm

¹⁹F-NMR (375 MHz,

CDCl₃, CFCI₃) d -65.46 ppm

ESI-MS (positive) [M + H]⁺

= 329.1106 (理論値329.1108 C₁₅H₁₆F₃N₂O₃).

【 0 0 3 5 】

(d) (E)-Ethyl

2-(2-hydroxy-4-(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene) [3,3-²H₂,4,4,4- 50

²H₃]

butanoate (3b)

化合物2b を用い、(c)と同様にして、化合物3bを収率 69%で得た。

【 0 0 3 6 】

¹H-NMR (400 MHz,CDCl₃, TMS) d 7.57 (s, 1H), 7.20 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 6.72

(d, 1H, J = 7.3 Hz), 6.72 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.30 (q, 2H, J = 7.0 Hz), 1.36 ppm (t, 3H, J = 7.1 Hz)

ESI-MS (positive) [M + H]⁺= 334.1419 (理論値334.1421 C₁₅H₁₁²H₅F₃N₂O₃).

10

【 0 0 3 7 】

(e) (E)-2-(2-Hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene)butanoic acid (4a)

acid (4a)

化合物3a (452mg, 1.38mmol)をメタノール7mLに溶かし、アルゴンガス雰囲気下、-20 で攪拌しながら、2mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液20mLをゆっくりと加えた。1日攪拌後、減圧に溶媒を留去した。残渣に水を加え、酢酸エチルで3回洗浄した。希塩酸を加えpH1にした後、酢酸エチルで3回抽出、飽和食塩水で1回洗浄した。有機層を合わせ、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム (酢酸エチル:ヘキサン=1:5)で精製し、黄色固体 (化合物4a; 404 mg, 98%) を得た。

20

【 0 0 3 8 】

¹H-NMR (400 MHz,CD₃OD, TMS) d 7.71 (s, 1H), 7.31 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.71

(s, 1H), 6.66 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 2.43 (q, 2H, J = 7.3 Hz), 1.11 ppm (t, 3H, J = 7.3 Hz)

¹³C-NMR (100 MHz,CD₃OD, TMS) d 171.42, 157.34, 136.80, 134.71, 131.19, 126.24, 123.48

(q, J = 274.15 Hz), 117.84, 114.06, 29.31 (q, J = 40.21 Hz), 21.87, 14.18 ppm

30

¹⁹F-NMR (375 MHz,CD₃OD, CFCl₃) d -65.12 ppmESI-MS (positive) [M + Na]⁺= 323.0611 (理論値323.0614 C₁₃H₁₁F₃N₂NaO₃).

【 0 0 3 9 】

(f) (E)-2-(2-Hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene)

[3,3-²H₂,4,4,4-²H₃]butanoic acid (4b)

化合物3b を用い、(e)と同様にして、化合物4bを収率 93%で得た。

【 0 0 4 0 】

¹H-NMR (400 MHz,CD₃OD, TMS); d 7.72 (s, 1H), 7.32 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.72

(s, 1H), 6.66 ppm (d, 1H, J = 8.2 Hz)

ESI-MS (positive) [M + Na]⁺= 328.0927 (理論値328.0928 C₁₃H₆²H₅F₃N₂NaO₃).

40

【 0 0 4 1 】

(g) (E)-2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl

2-(2-hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene) butanoate

(5a)

化合物4a(323mg, 1.08mmol)とN-ヒドロキシスクシンイミド (312mg, 2.71mmol)をアセトニトリル5mLに溶かし、アルゴンガス雰囲気下、0 で攪拌した。水溶性カルボジイミド(5

50

50mg)をアセトニトリル8mLに溶かしたものを加え、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、酢酸エチルを加え、水で3回、飽和食塩水で1回洗浄した。有機層を分取し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧に溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム (酢酸エチル:ヘキサン=1:2)で精製し、黄色固体 (化合物5a ; 265mg, 51%)を得た。

【 0 0 4 2 】

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, TMS) d 7.88 (s, 1H), 7.26 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.74 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.70 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 2.90 (s, 4H), 2.50 (q, 2H, J = 7.3 Hz), 1.19 ppm (t, 3H, J = 7.3 Hz)
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, TMS) d 171.94, 164.63, 157.83, 138.77, 132.53, 132.11, 131.40, 124.94, 120.76 (q, J = 274.12 Hz), 118.00, 114.31, 29.36 (q, J = 40.21 Hz), 26.56, 22.29, 13.82 ppm
¹⁹F-NMR (375 MHz, CD₃OD, CFCI₃) d -65.06 ppm
 ESI-MS (positive) [M + Na]⁺
 = 420.0779 (理論値420.0778 C₁₇H₁₄F₃N₃NaO₅).

10

【 0 0 4 3 】

(h) (E)-2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl
 2-(2-hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene) [3,3-²H₂,4,4,4-²H₃]butanoate
 (5b)
 化合物4b を用い、(g)と同様にして、化合物5bを収率 53%で得た。

20

【 0 0 4 4 】

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, TMS) d 7.89 (s, 1H), 7.25 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.73 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 6.69 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 2.91 ppm (s, 4H)
 ESI-MS (positive) [M + Na]⁺
 = 425.1091 (理論値425.1092 C₁₇H₉²H₅F₃N₃NaO₅).

30

【 0 0 4 5 】

(i) (E)-tert-Butyl(2-(2-(2-hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene)butanamido)ethyl) carbamate (6a)
 tert-Butyl
 (2-aminoethyl)carbamate(47mg, 0.29mmol)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(40 μL, 0.23mmol)をアセトニトリル1mLに溶かし、化合物5a(88mg, 0.22mmol)のアセトニトリル溶液3mLを加えた。アルゴンガス雰囲気下、室温で1日攪拌し、減圧に溶媒を留去後、残渣に酢酸エチルを加え、飽和炭酸水素ナトリウムで2回、飽和食塩水で2回洗浄した。有機層を分取し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧に溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム(酢酸エチル:ヘキサン=1:2)で精製し、黄色固体 (化合物6a ; 72mg, 73%)を得た。

40

【 0 0 4 6 】

¹H-NMR (400 MHz, acetone-d₆) d 7.30 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 7.16 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.72 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.22 (s, 1H), 3.39 (q, 2H, J = 5.8 Hz), 3.25 (q, 2H, J = 5.8 Hz), 2.43 (q, 2H, J = 7.3 Hz), 1.38 (s, 9H), 1.03 ppm (t, 3H, J = 7.6 Hz)
¹³C-NMR (100 MHz, acetone-d₆, TMS) d 170.09, 157.27, 156.52, 142.03, 131.27, 130.00,

50

127.00, 126.47, 123.03 (q, J = 274.15 Hz), 117.83, 114.03, 78.86, 41.10, 39.57, 29.69 (q, J = 34.48 Hz), 28.56, 21.86, 13.67 ppm

¹⁹F-NMR (375 MHz,

acetone-d₆, CFCl₃) d -64.90 ppm

ESI-MS (positive) [M + Na]⁺

= 465.1719 (理論値465.1720 C₂₀H₂₅F₃N₄NaO₄).

【 0 0 4 7 】

(j)

(E)-tert-Butyl(2-(2-(2-hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene

10

[3,3-²H₂,4,4,4-²H₃]butanamido)ethyl)carbamate

(6b)

化合物5b を用い、(i)と同様にして、化合物6bを収率 74%で得た。

【 0 0 4 8 】

¹H-NMR (400 MHz,

acetone-d₆, TMS) d 7.33 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.19 (s, 1H), 6.82

(s, 1H), 6.73 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.19 (s, 1H), 3.41 (q, 2H, J =

5.8 Hz), 3.27 (q, 2H, J = 5.8 Hz), 1.40 ppm (s, 9H)

ESI-MS (positive) [M + Na]⁺

= 470.2033 (理論値470.2034 C₂₀H₂₀²H₅F₃N₄NaO₄).

20

【 0 0 4 9 】

(k) (E)-N-(2-Aminoethyl)-2-(2-hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene)

butanamide (7a)

化合物6a(34mg, 76 μmol)に窒素雰囲気下0 で、トリフルオロ酢酸4mLを加えた。その後室温で1時間攪拌した。減圧下に留去後、残渣をODSカラム (水:アセトニトリル=9:1)で精製し、白色固体

(化合物7a; 24mg,

92%)を得た。

【 0 0 5 0 】

30

¹H-NMR (400 MHz,

CD₃OD, TMS) d 7.28 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.24 (s, 1H), 6.72

(s, 1H), 6.67 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 3.56 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 3.12

(t, 2H, J = 6.0 Hz), 2.47 (q, 2H, J = 7.5 Hz), 1.08 ppm (t, 3H, J

= 7.6 Hz)

¹³C-NMR (125 MHz,

CD₃OD) d 173.27, 157.16, 140.82, 131.35, 131.15, 126.34, 123.53 (q, J

= 274.42 Hz), 117.97, 114.05, 40.94, 38.83, 29.49 (q, J = 40.48 Hz) ppm

¹⁹F-NMR (375 MHz,

CD₃OD, CFCl₃) d -65.15 ppm

40

ESI-MS (positive) [M + H]⁺

= 343.1378 (理論値343.1376 C₁₅H₁₈F₃N₄O₂).

【 0 0 5 1 】

(m)

(E)-N-(2-Aminoethyl)-2-(2-hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzylidene)butanamide

(7b)

化合物6b を用い、(k)と同様にして、化合物7bを収率 93%で得た。

【 0 0 5 2 】

¹H-NMR (400 MHz,

50

CD₃OD, TMS) d 7.28 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.24 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.67 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 3.56 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 3.11 ppm (t, 2H, J = 6.0 Hz)

¹³C-NMR (125 MHz,

CD₃OD) d 173.16, 156.98, 140.57, 131.19, 131.08, 126.19, 123.40 (q, J = 274.04 Hz), 117.92, 114.02, 40.77, 38.57, 29.23 (q, J = 40.60 Hz) ppm

¹⁹F-NMR (375 MHz,

CD₃OD, 標準物質

CFCl₃) d -65.21 ppm

ESI-MS (positive) [M + H]⁺

= 348.1690 (理論値348.1690 C₁₅H₁₃²H₅F₃N₄O₂).

【 0 0 5 3 】

(n) アデノシン三リン酸(ATP)プローブ(8a)

50mM ATPの250mM

MES buffer pH 6.8溶液(16 μL)、50mM 化合物7aの水溶液(8 μL, 0.4 μmol)、1M EDCI水溶液(2.0 μL)、250mM

MES buffer pH6.8(2.0 μL)、600 mMトリエチルアミンの250mM MES buffer pH6.8溶液(4.0 μL)を混合し、室温遮光して6時間反応させた。反応混合物を逆相HPLCで精製後、凍結乾燥してEDCI付加物を得た。100mM水酸化ナトリウム水溶液を450 μL加え、1時間37 で攪拌し、再度ODS C18カラムを用いてHPLCにより精製を行い、24時間、凍結乾燥して化合物8a

を得た。

【 0 0 5 4 】

HPLC : SHISEIDO

CAPCELLPAK C18 10 mm × 250 mm

溶液A : 50 mM

トリエチルアミン酢酸水溶液 (pH 7.0)

溶液B : 50 mM

トリエチルアミン酢酸溶液 (pH 7.0) / 80%アセトニトリル20%水

流速 4 mL/min

グラジエント0 min (A 100%, B 0%) 0.1 min (A 100%, B 0%) 40 min (A 50%, B 50%)

45 min (A 0%, B 100%) 50

min (A 0%, B 100%) 55 min (A 100%, B 0%)

EDCI付加物: 34.7

min, ESI-MS (positive)

[M + H]⁺

= 987.2648 (理論値987.2651 C₃₃H₄₉F₃N₁₂O₁₄P₃)

【 0 0 5 5 】

(o) アデノシン三リン酸(ATP)プローブ(8b)

化合物7b を用い、(n)と同様にして、化合物8bを得た。

【 0 0 5 6 】

35.5 min, ESI-MS

(negative) [M - H]⁻ = 830.1088 (理論値830.1083 C₂₅H₃₀F₃N₉O₁₄P₃).

EDCI付加物: ESI-MS

(positive) [M + H]⁺ = 992.2967 (理論値992.2965

C₃₃H₄₄²H₅F₃N₁₂O₁₄P₃).

化合物8b: ESI-MS (negative) [M - H]⁻ = 835.1400 (理論値835.1397 C₂₅H₂₅²H₅F₃N₉O₁₄P₃).

【 0 0 5 7 】

製造例 2

10

20

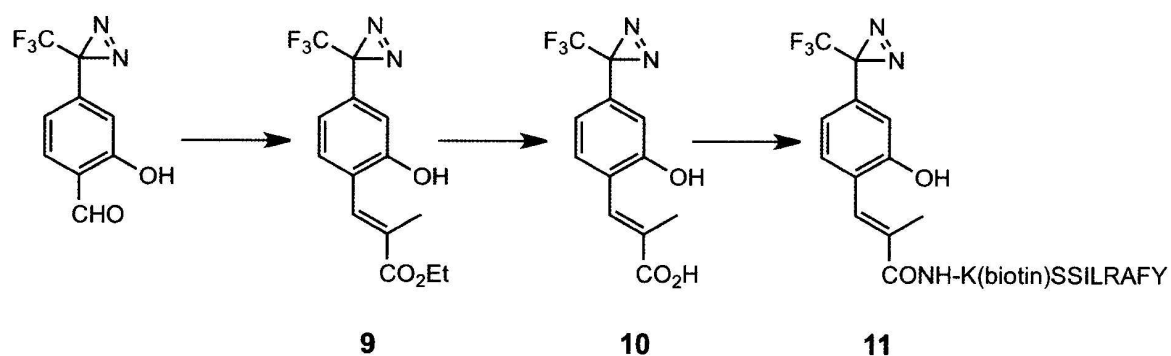
30

40

50

< ペプチド (SSILRAFY) プローブの合成 >

【化 6】



10

【 0 0 5 8 】

(p) (E)-Ethyl

3-[2-hydroxy-4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)phenyl]-2-methylacrylate (9).

2-hydroxy-4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)benzaldehyde(2.0g, 8.8mmol)をベンゼン40mLに溶かし、[1-(ethoxycarbonyl)ethylidene]

triphenylphosphorane (3.5g, 9.7mmol)を加えて、アルゴンガス雰囲気下、室温で終夜攪拌した。溶媒留去後、残渣をシリカゲルカラム (酢酸エチル:ヘキサン=5:1)で精製し、薄い黄色固体 (化合物9; 2.2g,

79%)を得た。

20

【 0 0 5 9 】

融点: 69-70

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS) 7.72 (1

H, s), 7.24 (1 H, d, J 8.1), 6.75 (s, 1 H), 6.70 (1 H, d, J 8.1), 4.29 (2 H, q, J 7.3), 2.00 (3H, s), 1.35 (3 H, t, J 7.3)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS)TM 168.8 (s), 154.2 (s), 133.1 (d),

131.3 (s), 130.8 (d), 130.4 (s), 124.4 (s), 122.6 (q, ¹J_{C-F}

273), 118.0 (d), 113.8 (d), 61.4 (t), 28.3 (q, ²J_{C-F}

41), 14.1 (q), 14.2 (q)

30

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃, CFCl₃)

TM-65.6 (3F, s); _{max}/nm() (MeOH) 352 (sh, 1,270)

HRMS

(EI) m/z [M]⁺ = 314.0872 (理論値 314.0878 C₁₄H₁₃F₃N₂O₃).

【 0 0 6 0 】

(q) (E)-2-Hydroxy-4-(3-Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]phenyl-2-methylacrylic

acid (10).

化合物9 (2.0g, 6.4mmol)をメタノール1mLに溶かし、3 M水酸化ナトリウム水溶液(50mL)を0 でゆっくり加え、室温で2時間攪拌した。冷3 M塩酸をゆっくり加えて酸性にした後、酢酸エチルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去した。残渣をクロロホルムで再結晶して薄い黄色鱗片状結晶を得た(化合物10; 1.52 g, 83%)を得た。

40

【 0 0 6 1 】

融点: 66-67

¹H-NMR

(500 MHz, CD₃OD, TMS) 7.78 (1 H, s), 7.36 (1 H, d, J 8.1),

6.72 (1 H, s), 6.65 (1 H, d, J 8.1), 1.99 (3 H, s)

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD, TMS) 171.8 (s), 157.5 (s), 135.0 (d),

131.9 (d), 131.4 (s), 130.5 (s), 126.3 (s), 123.6 (q, ¹J_{C-F}

273), 117.8 (d), 114.1 (d), 29.4 (q, ²J_{C-F}

50

41), 14.4 (q)

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CD_3OD , CFCl_3)TM-64.9 (3F, s); m_{max}/nm () (MeOH) 347 (sh, 1,100); HRMS (EI) m/z

$[\text{M}]^+$ 286.0565理論値 286.0565 $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$).

【 0 0 6 2 】

(r) ペプチドプローブ (11)

H-K(biotin)SSILRAFY-OHはAlko PEG

resin (0.78mmol/g, 50mg)を用いて、Fmoc固相合成法により合成機で製造した。

化合物10 (40mg, 0.14 mmol)のジメチルホルムアミド溶液1 mLに、N-hydroxysuccinimide (17mg, 0.15mmol) と1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (28mg,

10

0.15mL)を加えた。化合物10が消失した後、この反応液760 mLおよびトリエチルアミン(40 mL)を樹脂に加え、終夜、室温で振盪した。ジメチルホルムアミドおよびメタノールで洗浄後、トリフルオロ酢酸 (340mL)溶液 (m-クレゾール(20mL)、チオアニソール(20mL)およびトリイソプロピルシラン(20mL) を含む) で1時間インキュベートした。上静をエーテルで沈殿させ、沈殿物をODSを用いた逆相HPLCで精製した(リニアグラジエント2~60% アセトニトリル・水(0.1% TFAを含む)、50min、流速1mL/min)。37.6minのピークを採取し、凍結乾燥した。

HRMS (ESI+) m/z

$[\text{MH}]^+$ 1578.7294 理論値1578.7391 $\text{C}_{73}\text{H}_{103}\text{F}_3\text{N}_{17}\text{O}_{17}\text{S}$).

20

【 0 0 6 3 】

実施例 1

< グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の光アフィニティーラベル、LC-MS解析 >

GDH (0.2mg/mL), ATP probe

(8aおよび8b 各々0.2mM) のトリス - 酢酸緩衝液(50mM, pH8.0, 25 μL)を調整し、遮光下室温で1時間インキュベートした。波長365nm光を氷冷中15秒間照射した後、さらに37で15分間照射した。2 \times SDS-sample bufferを5 μL 加え、室温で1時間変性した後、サンプル全量を10%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、CBB染色を行い、対象バンドを1.5mLエッペンチューブに回収した。脱染色後、ヨウ化アセトアミドによる還元アルキル化を行い、リシルエンドペプチターゼ処理(37、18時間インキュベート)を行った。ゲルから消化物を抽出して、ZipTipを用いて脱塩、濃縮した(10 μL)。この溶液を用い、nan

30

oLC-MSⁿ解析を行った。

【 産業上の利用可能性 】

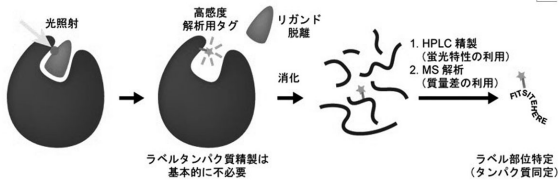
【 0 0 6 4 】

本発明方法は、従来法ではしばしば数年を要する解析を、数週間で終了することが可能である。しかも、複数ラベル部位の特定も可能であり、情報量が多い。操作も簡単であるため汎用性は高く、必要備品は光源(通常のブラックライトで十分)とHPLC、MS分析器のみである。さらに、異なるプローブを作製することにより、より正確な情報取得も迅速かつ簡便にできるため、開発期間の大幅な短縮によりコストダウンが期待できる。

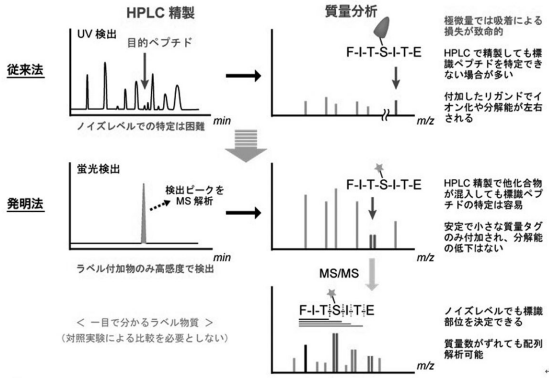
さらに、本発明方法は、創薬以外にも、基礎生物学から医療分野に至る広範囲の学術領域に有用である。

40

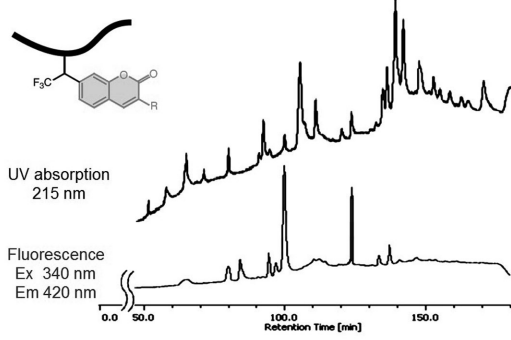
【 図 1 】



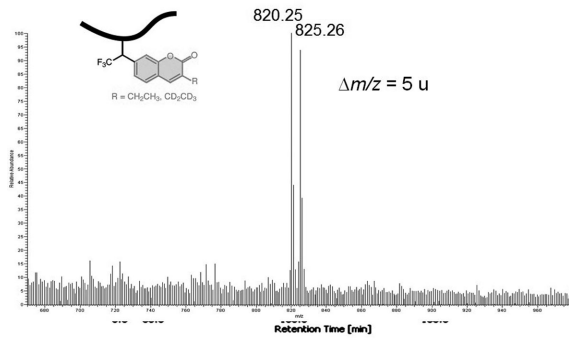
【 図 2 】



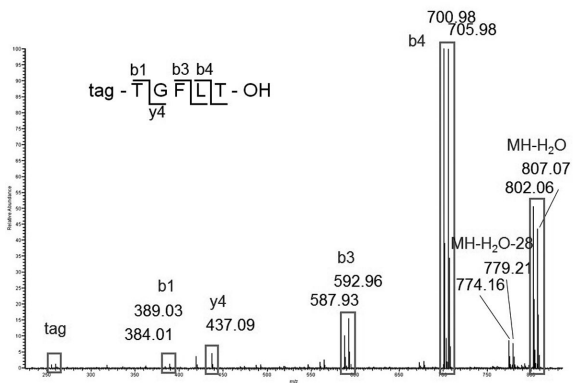
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特表2005-513506(JP,A)

特開2005-239577(JP,A)

Morimoto,S., Chemical Communications, 2013年 1月15日, 49/18, 1811-1813, 雑誌の発行日は2013年3月4日であるが、first published online 15 Jan 2013とされている。

猪ノ口裕二, 二段階光反応新規ATPプローブによるアクチオシンの蛍光ラベル化, 日本薬学会第131年会要旨集, 2011年 3月, 2, 第76頁 29G-am08

森本正大, ペプチド性新規光クロスリンカーによるタンパク質VSRへの蛍光基のトランスファー解析, 日本薬学会第131年会要旨集, 2011年 3月, 2, 第76頁 29G-am09

猪ノ口裕二, クマリン形成型ATP光プローブによるGDHのラベル化, 日本薬学会132年会要旨集, 2012年 3月28日, 第169頁 31E11-am13S

森本正大, 新規ペプチド性光プローブを用いたタンパク質VSRの結合解析, 日本薬学会132年会要旨集, 2012年 3月, 2, 第169頁 31E11-am14S

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/62 - 27/70

G01N 21/00 - 21/83

G01N 33/48 - 33/98

C07D 229/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)