

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-111525

(P2020-111525A)

(43) 公開日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7D 229/02 (2006.01)</b>	CO7D 229/02 CSP	2G054
<b>CO7D 495/04 (2006.01)</b>	CO7D 495/04 I03	4C071
<b>GO1N 21/78 (2006.01)</b>	GO1N 21/78 C	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2019-2254 (P2019-2254)  
 (22) 出願日 平成31年1月10日 (2019.1.10)

(71) 出願人 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 中島 大海  
 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷  
 キャンパス内  
 Fターム(参考) 2G054 CA23 CE02 EA03 GA04 GB02  
 4C071 AA01 BB01 CC02 CC21 EE13  
 FF04 GG06 HH08 JJ01 JJ05  
 LL05

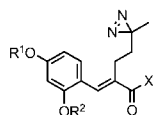
(54) 【発明の名称】 蛍光標識試薬、プローブ及びその中間体

(57) 【要約】

【課題】ラベル収率と蛍光強度を大幅に向上させた蛍光標識試薬の提供を目的とし、その中間体に特徴がある。

【解決手段】蛍光標識試薬の中間体として用いられる下記一般式 [ 1 ] で表される桂皮酸誘導体。

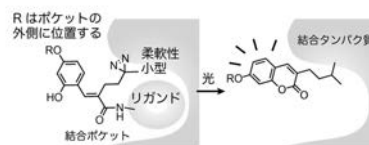
【化 1】



...[1]

「式中、R<sub>1</sub> は水素，低級アルコキシ基，アセチル基，アルキニル基のいずれかであり、R<sub>2</sub> は水素，低級アルコキシ基，アセチル基のいずれかであり、X は水酸基，低級アルコキシ基，アミノ基又はその誘導体のいずれかである。」

【選択図】 図 1

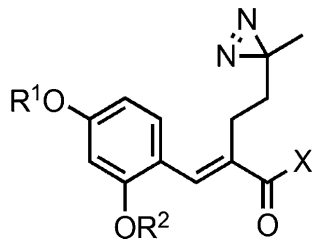


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

蛍光標識試薬の中間体として用いられる下記一般式 [ 1 ] で表される桂皮酸誘導体。

## 【化 1】



…[1]

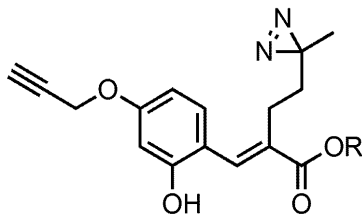
10

「式中、 $R_1$  は水素，低級アルコキシ基，アセチル基，アルキニル基のいずれかであり、 $R_2$  は水素，低級アルコキシ基，アセチル基のいずれかであり、 $X$  は水酸基，低級アルコキシ基，アミノ基又はその誘導体のいずれかである。」

## 【請求項 2】

蛍光標識試薬の中間体として用いられる下記一般式 [ 2 ] で表される桂皮酸誘導体。

## 【化 2】



…[2]

20

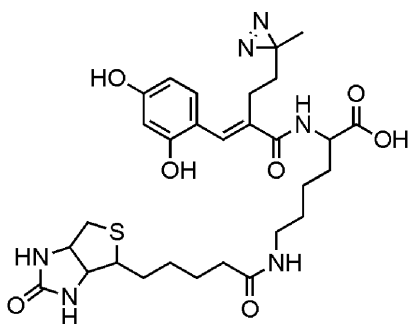
「式中、 $X$  は水酸基，低級アルコキシ基，アミノ基又はその誘導体のいずれかである。」

## 【請求項 3】

蛍光標識プローブを作成するのに用いられる下記式 [ 3 ] で示される桂皮酸誘導体。

30

## 【化 3】



…[3]

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、切断性を有する光親和性蛍光標識試薬に関し、特にその中間体に係る。

## 【背景技術】

## 【0002】

本発明者らは、先に蛍光性質量標識プローブ（特許文献 1）及びそれに関連した非特許文献 1～5 を発表している。

これらの先行技術は標的タンパク質の蛍光化標識を達成する光架橋試薬である。

50

特許文献 1 は、光架橋剤として最も汎用されているフェニルジアジリンが改良され、パラ位に二重結合、メタ位にヒドロキシ基を導入した桂皮酸骨格を有する。

360 nm 付近の紫外線 (UV) を照射するとジアジリンが分解して高反応性カルベンが生成し、瞬時に最も近傍に存在する分子と共有結合する。

さらに二重結合が光 E - Z 異性化すると、メタ位のヒドロキシ基が分子内求核反応してクマリン環を形成する。

従ってこの反応基をリガンド分子に装着した分子プローブにより、リガンドに結合する標的タンパク質と架橋し、リガンドを切除しつつ蛍光基クマリンのみを標識する技術である。

さらに同位体による質量差が加えられ、LC - MS 装置によるタンパク質の質量解析効率が向上した。

蛍光基形成を利用して細胞 (非特許文献 1) や標的タンパク質 (非特許文献 3) が蛍光可視化され、非特許文献 2 では切断特性を利用したラベルタンパク質濃縮と蛍光特性によりリガンド結合部位解析が効率化された。

非特許文献 5 では、結合部位情報からタンパク質のアロステリック構造変化が解析され、非特許文献 4 では、同位体特性が追加されて MS 解析に至る解析効率化が達成された。

また、光切断性蛍光標識プローブ及びそれに関連する非特許文献 6 を発表している。

これらの先行技術もタンパク質の蛍光標識を達成する光架橋試薬であるが、これら試薬はクマリン環に直接ジアジリン基が導入された蛍光標識剤である。

特許文献 2 は、タンパク質精製に有効な光切断性機能を有するが、非特許文献 6 では切断機能を持たない。

これらの化合物はジアジリン基により消光されている (光誘導電子移動) ため蛍光をほとんど示さないが、360 nm UV 照射でジアジリン基が分解して架橋反応が進行すると同時に蛍光強度が増大する。

非特許文献 6 では、標的タンパク質の蛍光ラベルに用いられた。

蛍光が増大すると、特許文献 2 のクマリン化合物は、313 nm UV 光、pH 9 以上のアルカリ性溶液で光切断反応を起こす。

これによりリガンドが切除され、タンパク質にはクマリンのみが付与される。これはタンパク質の精製および質量解析に非常に有用な機能となる。

特許文献 1 の反応基や特許文献 2、非特許文献 6 の光反応基を含め、汎用のフェニルジアジリン光反応基によるタンパク質ラベルは、迅速かつ非特異的ラベルが少ないという優れた特長を有するが、その収率は一般的に数%以下と極めて低いため、高発現量のタンパク質が主な適用範囲となる。

膜受容体やキナーゼをはじめとする主要な創薬対象タンパク質は極めて微量であることが多い。

膨大な生体分子が存在する中での微量解析は難しく、それら微量発現タンパク質に対応するにはこの反応基特性は十分ではない。

また、特許文献 1 と特許文献 2 の化合物から形成されるクマリン誘導体の発光強度は小さい。

膨大な夾雑物存在下で、先述の微量ラベルタンパク質のみを選択的に検出するにはこの蛍光特性では難しく、有用な蛍光特性が蛍光可視化や同定効率化に直接繋がらない恐れがあることから改善の余地があった。

【0003】

また、その他の文献としては非特許文献 7 ~ 12 がある。

分子標的タンパク質の同定技術では、標識方法、標識の機能、単離精製など操作効率に技術改良の焦点が置かれる。

相互作用する標的タンパク質への特異的な標識法には、主に化学的手法と光化学的手法の 2 つがある。

適応範囲の広さでは光化学的手法が優れており、他への非特異的ラベルが少ないという観点ではジアジリン基による光アフィニティーラベル法が優位である。

10

20

30

40

50

一般にラベル量は極微量であるため、物質単離精製技術や高感度標識が重要になる。

ラベルタンパク質の選択的濃縮ではビオチン基が最も多く、その他、パーフルオロ化合物（非特許文献7）、オリゴヌクレオチド（非特許文献8）、クリック反応基（非特許文献9）などのタグ導入法がある。

高感度標識としては放射性同位体（RI）や蛍光化合物が光学的高感度検出用タグとして利用され、また前述のビオチン基では化学発光検出法が使える。

RIでは最も高感度であるが装置類の放射能汚染が絶えず問題となる。

蛍光化合物では分子量が大きいものが多くリガンドの親和性を損なうこと、さらに光照射下で不安定であることが問題となる。

従ってビオチン基が汎用されるが、ビオチンは補酵素であるためその結合タンパク質が存在することや化合物の溶解性低下が問題となりやすい。

クリック反応基タグはそれらを改善したものであるが、光ラベル後に化学的処理によりビオチン基や蛍光基を導入する必要があり、極微量ではその反応効率に問題が生じる。

ビオチンタグでは精製担体から変性下で煮出す必要があるため、切断機能を組み込んだものも開発されている（非特許文献10）。

しかしこれら多機能化により必然的に分子は大きくなり、リガンドの親和性を減ずる可能性が大きい。

本発明の化合物はコンパクトな構造に光架橋、発蛍光性、光切断能など多機能が組み込まれている。

それら機能を利用したラベルペプチド解析による直接的な標的タンパク質同定法であり、ラベルアミノ酸の特定は結合構造情報に直結する点で優位である。

一方、上記先行手法論は基本的にラベルペプチドの直接同定は困難であるためラベル部位以外のペプチド情報から比較解析するが、微量では、多くの夾雑物の影響を受けて曖昧性が残る。また結合構造情報は得られない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特許第6145742号公報

【特許文献2】特開2017-43562号公報（特願2015-167367号）

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Tomohiro T, Kato K, Masuda S, Kishi H, Hatanaka Y, *Bioconjugate Chem.*, 2011, 22, 315&#8211;318)

【非特許文献2】Morimoto S, Tomohiro T, Maruyama N, Hatanaka Y, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 1811-1813

【非特許文献3】Tomohiro T, Inoguchi, H, Masuda, S, Yasumaru Hatanaka Y, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, 23, 5605&#8211;5608

【非特許文献4】Tomohiro T, Morimoto S, Shima T, Chiba, J, Hatanaka Y, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 13502-13505

【非特許文献5】Masuda S, Tomohiro T, Yamaguchi S, Morimoto S, Hatanaka Y, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, 25, 1675-1678

【非特許文献6】Tomohiro T, Yamamoto A, Tatsumi Y, Hatanaka Y, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 11551-11553.

【非特許文献7】Song Z, Zhang Q, *Org. Lett.*, 2009, 11, 4882- 4885

【非特許文献8】Li G, Liu Y, Chen L, Wu S, Li X, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 9544&#8211;9549

【非特許文献9】（総説）Das J, *Chem. Rev.*, 2011, 111, 4405&#8211;4417

【非特許文献10】（総説）Tomohiro T, Hatanaka Y, *Heterocycles*, 2014, 89, 2697-2727

【非特許文献11】Ong SE, Schenone M, Margolin AA, Li X, Do K, Doud MK, Mani DR,

10

20

30

40

50

Kuai L, Wang X, Wood JL, Tolliday NJ, Koehler AN, Marcaurette LA, Golub TR, Gould RJ, Schreiber SL, Carr SA, PNAS, 2009, 106, 4617-4622

【非特許文献 1 2】Yang L, Chumsae C, Kaplan JB, Moulton KR, Wang D, Lee DH, Zhou ZS. Bioconjug Chem. 2017, 28, 2302-2309

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

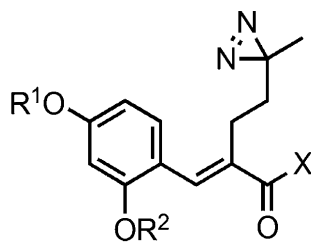
本発明は、ラベル収率と蛍光強度を大幅に向上させた蛍光標識試薬の提供を目的とし、その中間体に特徴がある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の蛍光標識試薬の中間体として用いられる桂皮酸誘導体は、下記一般式 [ 1 ] で表される。

【化 1】



...[1]

10

20

「式中、R<sub>1</sub> は水素、低級アルコキシ基、アセチル基、アルキニル基のいずれかであり、R<sub>2</sub> は水素、低級アルコキシ基、アセチル基のいずれかであり、X は水酸基、低級アルコキシ基、アミノ基又はその誘導体のいずれかである。」

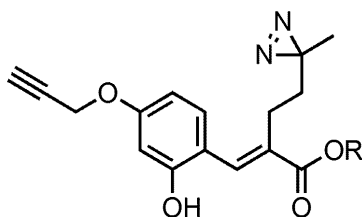
ここで、低級アルコキシ基とは、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、イソブトキシ基等の直鎖状又は分岐鎖状の C<sub>1</sub> - 6 アルコキシ基をいう。

また、アルキニル基とは、エチニル基、プロパルギル基（プロパ - 2 イン - 1 イル基）等、アルキンの水素原子を 1 個取り除いた 1 価の置換基をいう。

【0008】

また、中間体としては下記一般式 [ 2 ] で表される。

【化 2】



...[2]

30

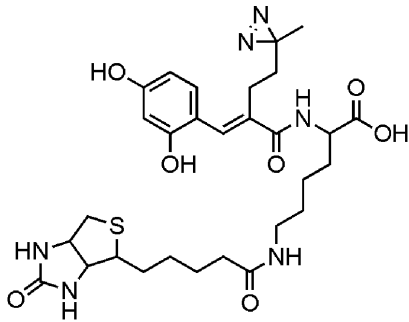
40

「式中、X は水酸基、低級アルコキシ基、アミノ基又はその誘導体のいずれかである。」  
一般式 [ 1 ] の R<sup>1</sup> にアルキニル基を導入することで、クリック反応等の機能を付加することができる。

【0009】

蛍光標識プローブの中間体としては、下記式 [ 3 ] で表される。

## 【化 3】



…[3]

10

蛍光標識プローブにビオチン基を導入すると、化学発光検出に有用となる。

## 【0010】

操作性や汎用性の観点から、単純に試料量を増やすのは得策ではない。

既存アフィニティー精製に基づいたMS解析によるキナーゼ同定での試料量（非特許文献11）を考慮すると、先行技術の100倍以上の大幅な効率改善は必須であり、ラベルタンパク質の絶対量を確保するにはラベル収率の大幅向上は解決すべき課題である。

一方、7-ヒドロキシクマリンなどの強い蛍光特性のラベルによるタンパク質検出感度は、MS解析を用いたタンパク質同定に必要とする数フェムトモル以下であることから（非特許文献12）、ラベルタンパク質同定を効率化し上記課題を解決するためには、蛍光検出感度の向上が重要な手段となる。

20

標的タンパク質を的確に架橋するための光反応基ジアジリンや、微量ラベルタンパク質を濃縮するために有用な切断特性などの有用な機能を保持しつつ、光反応基構造を抜本的に変えることで、ラベル収率と蛍光強度を大幅に向上させて上記課題を解決する。

ラベル収率（架橋反応収率）を下げる主な原因は、光反応基ユニットの剛直性とやや大きなサイズにある。

一般的に光反応基はリガンド構造のタンパク質との結合を阻害しないような場所に導入するため、図5に示すように結合ポケットの外側に位置し、その剛直性のためタンパク質と接触し難い。

ジアジリン基による光反応は多くがタンパク質周囲の水分子と反応して失活するため、通常、ラベル収率は数%に止まり、しばしば1%以下の収率になる。

30

本発明では、例えば図1に示すように、光切断・発蛍光を誘導するo-ヒドロキシ桂皮酸骨格に、光反応基ジアジリン基が組み込まれたアルキル鎖をオレフィン部位に導入した。

嵩張る桂皮酸部分はポケット外側に、光反応基である小型ジアジリン基をリガンド近くに配置させることで、脂質分子と同様にポケット構造に合わせて柔軟にポケット内部へ接近できる。

さらに桂皮酸骨格のpara位に新たなヒドロキシ基を導入し、光反応で形成する蛍光性化合物を7-ヒドロキシクマリン誘導体にするすることで、蛍光強度の大幅な向上を図ることができる。

40

7-ヒドロキシクマリン誘導体は細胞中タンパク質の蛍光可視化（イメージング）剤にも用いられており、強い蛍光を発することが知られている。

また、7-ヒドロキシ基は官能基導入が可能であり、例えば図2に模式的に示すようにアルキニル基を導入したものはクリック反応により更なる機能を付与することもできる。

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明に係る中間体を用いて蛍光標識プローブを作成すると、次のような作用、効果がある。

1. ジアジリン基光分解で生じるカルベンは極めて高反応性であり、ほとんどの相互作用系に対応する。

50

2. 光反応基ユニットが蛍光基に変化するため、別途、蛍光化合物を付与する必要がない。

3. この標識ペプチドは通常のペプチドにはないクマリン蛍光特性を持つ。

HPLCでその蛍光が検出されたピークが解析対象となるため判別しやすい。

4. 反応基自体は無蛍光性でありバックグラウンドが小さい。

5. 光照射という簡便操作でタンパク質を捕捉し、さらに精製担体から選択的に切断溶出できる。

6. リガンドは切断され低分子クマリン化合物のみが標識される。

質量分析の範囲が広がらず、高分解能が維持できる。

MS/MS解析ではリガンド分解によるシグナルの複雑化がない。

7. 多くのジアジリン基はタンパク質周囲の水分子と反応して失活し、一般的にラベル収率は数%を超えない。

ジアジリン基がタンパク質内部に存在する場合は70%を超える。

後述する化学式[4]に示したプローブでは、リガンドからやや離れた位置にあるにもかかわらず収率が20%と高い値を示した(図4)。

アルキルジアジリンは小型で柔軟な構造持ち、結合ポケット内側に存在し得るが、脂肪酸アルキル鎖と同様にタンパク質内に貫入する可能性が高く、従ってラベル収率の向上が見込める。

8. 図3にクマリン環に直接ジアジリン基を導入したものと、本発明に係る試薬を比較した結果を示す。

蛍光強度が大幅に増強し(約90倍)。

収率を合わせると約1000倍の効率化となる。

9. 特許文献1や特許文献2の化合物では、ジアジリン基は剛直な桂皮酸骨格あるいはクマリン骨格をはさんでリガンドの反対側にある。

タンパク質と反応して架橋するには、ジアジリン基が標的タンパク質に近づくための柔軟なスペーサーを、リガンドと反応基の間に導入する必要がある。

本発明試薬のジアジリン基はリガンドに近く、柔軟なアルキル鎖上にあるためスペーサーを導入する必要はなく、プローブ設計が単純化できる。

リガンド親和性が減弱する場合は、スペーサーを導入することも可能である。

10. 7-ヒドロキシ基への修飾が可能である。

アルキニル基を導入した化合物はクリック反応を用いて無保護で容易に機能性物質を導入できる。

11. フェニルジアジリンからアルキルジアジリンにして反応基部分を柔軟かつ小型化したことで、相互作用点により近い部分を標識する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明に係る蛍光標識試薬の作用を示す。

【図2】タンパク質との結合を示す。

【図3】蛍光強度の比較を示す。

【図4】ラベルの収率を示す。

【図5】従来例の結合例を示す。

【図6】従来例のラベル例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本化合物は光架橋試薬の中間体であり、例えば光アフィニティーラベル法による標的タンパク質標識に用いる。

本発明試薬は光照射により蛍光性化合物クマリンに変化し、架橋したタンパク質にクマリン蛍光特性を付与することができる。

オルトヒドロキシ桂皮酸骨格を有し、カルボニル基位炭素上のアルキル鎖にジアジリン基が導入されている。

10

20

30

40

50

桂皮酸のカルボキシル基には有機化合物や生体分子などのリガンドをアミド結合で直接導入することができる。

標的タンパク質へのリガンドの親和性が減弱する場合、あるいは合成上の必要性により、本発明試薬とリガンドとの間にスペーサー、あるいは官能基を導入することも可能である（例えばプローブ [ 4 ] を参照）。

ビオチン基を導入した試薬を使用すれば、ラベルタンパク質を化学発光による高感度検出やアビジン担体を利用した濃縮が可能である。

ラベルタンパク質を担体上に濃縮した後、光切断反応で担体から選択的に、温和に溶出できる。

この切断時には一般式 [ 1 ] における  $R_2$  は H である必要がある。

$R_1$  にプロパルギル基を導入したものは無保護で官能基を導入するクリック反応を適用できる（図 2）。

下記化合物 [ 4 ] は、炭酸脱水酵素（CA）の阻害剤ベンゼンスルホンアミドに本発明試薬を導入することで分子プローブを作製した例である。

この化合物を CA を含む溶液と混合した後、0 で 365 nm 光を照射するとジアジリン分解が起こり、タンパク質 CA と共有結合で架橋する。

250 W 高圧水銀灯で 30 秒程度照射すればよい。

プローブにはビオチン基が導入されているため、ラベルされた CA にはビオチンが付与されるため化学発光で高感度に検出できる。

図 4 に発光量からラベル収率を比較した結果を示す。

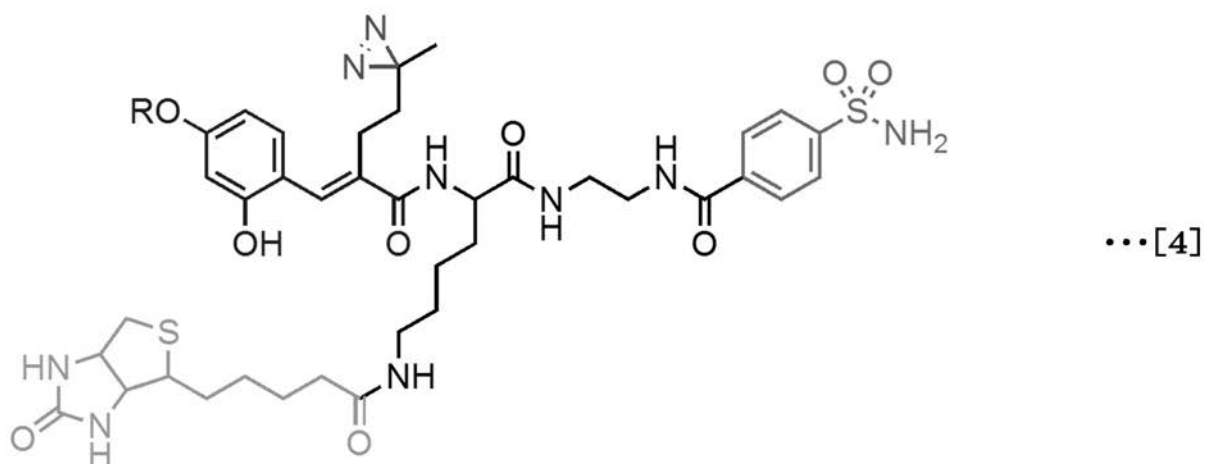
特許文献 1, 2 に比較して、約 10 倍増加している。

この分子プローブの CA に対する特異性はタンパク質の阻害剤を加えた実験を行い、発光の減少で確認することができる。

続いて、37（室温以上）に変えて再照射すると、図 1 に示したように桂皮酸二重結合の E - Z 異性化を介してオルト位ヒドロキシ基による分子内環化が進行し、ビオチン基およびリガンド部分が脱離し、クマリン環が架橋部位に形成される。

ラベルタンパク質は LC - MS 装置によりタンパク質解析が可能である。

【化 4】



10

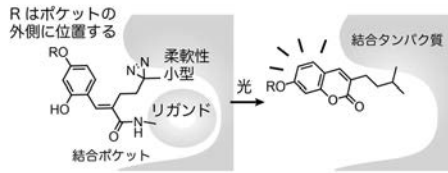
20

30

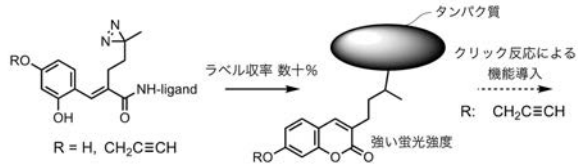
40



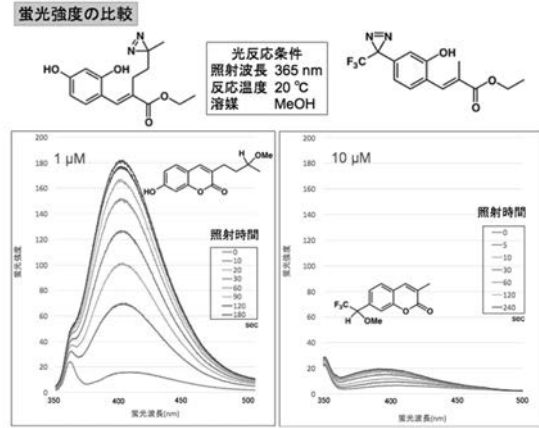
【 図 1 】



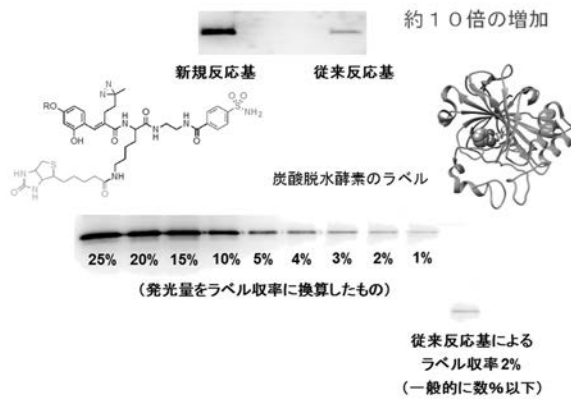
【 図 2 】



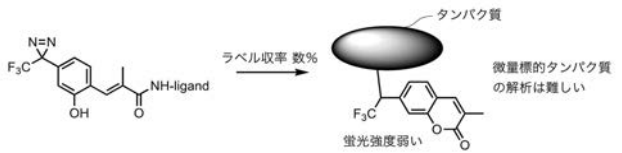
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 5 】

